

**Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch  
Apfelpolyphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen  
Kolonkarzinomzellen**

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

**Melanie Kern**

Betreuerin: **Prof. Dr. D. Marko**

Kaiserslautern, 2006

---

Für meine Eltern

und Tom

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

(5.02.1564 - 08.01.1642)

---

---

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 11.2005

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13.06.2006

**Prüfungskommission:**

Vorsitzender: Prof. Dr. W. R. Thiel

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. D. Marko

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

---

---

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen Januar 2003 und März 2005 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern und wurde am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie der Universität Karlsruhe (TH) im Zeitraum vom Juni bis November 2005 beendet.

Ich danke Fr. Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des interessanten Themas, für die stetige Diskussionsbereitschaft sowie für ihr in mich und meine Arbeit gesetztes Vertrauen, während der letzten dreieinhalb Jahre.

Des Weiteren danke ich Hr. Prof. Dr. G. Eisenbrand für die Übernahme des Co-Referates, sowie für die Unterstützung während meiner Promotionszeit in Kaiserslautern.

Danken möchte ich ebenfalls Hr. Prof. Dr. W. R. Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

---

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Theoretischer Teil</i></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Krebs und Ernährung</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Zelluläre Signalübertragung</b>	<b>6</b>
2.2.1	Die mitogen aktivierbare Proteinkinase (MAPK)-Kaskade	6
2.2.1.1	Das mitogen aktivierte Modul	7
2.2.1.2	Verknüpfung der MAPK-Kaskade mit anderen Signaltransduktionskaskaden	9
2.2.1.3	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	10
2.2.1.4	Extrazellulär regulierte Kinasen ERK1 und ERK2	13
2.2.2	Wnt-Signalweg	15
2.2.2.1	Die Glycogensynthasekinase 3 (GSK3)	16
2.2.2.2	$\beta$ -Catenin	- 20 -
2.2.3	Protein Kinase C (PKC)	21
2.2.3.1	Rolle der PKC Isoenzymformen in der Kolonkanzerogenese	25
2.2.3.2	PKC und Apoptose	26
2.2.3.3	PKC-Inhibitoren	27
<b>2.3</b>	<b>Der Zellzyklus</b>	<b>28</b>
<b>2.4</b>	<b>Apoptose</b>	<b>29</b>
2.4.1	Caspasen	30
<b>2.5</b>	<b>Polyphenole</b>	<b>34</b>
2.5.1	Hydroxyzimtsäurederivate	34
2.5.1.1	Bioverfügbarkeit	35
2.5.2	Flavonoide	37
2.5.2.1	Flavonoide und Dihydrochalkone des Apfels	40
2.5.2.2	Bioverfügbarkeit von Flavonoiden und Dihydrochalkonen	43
2.5.2.3	Chemoprotektive Wirkungen von Flavonoiden	47
2.5.2.4	Biologische Wirkungen von Apfelpolyphenolen	48
2.5.3	Postulierte Flavonoidabbauprodukte	54
<b>3</b>	<b><i>Problemstellung</i></b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Hemmung des Tumorzellwachstums in vitro durch Apfelextrakte und ausgewählte Polyphenole</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Apfelpolyphenolen auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und seine nachgeschaltete Signalkaskade</b>	<b>68</b>
4.2.1	Einfluss von Apfelinhaltsstoffen auf die Proteintyrosinkinaseaktivität (PTK) des EGFR	68
4.2.2	Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR durch Apfelpolyphenole	78
4.2.3	Modulation der extrazellulär regulierten Proteinkinasen (ERK1/2)	82
<b>4.3</b>	<b>Modulation des Wnt-Signalweges durch Apfelpolyphenole</b>	<b>89</b>
4.3.1	Beeinflussung der Aktivität isolierter Glycogensynthasekinase-3 $\beta$	89
4.3.2	Beeinflussung der zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität in HT29-Zellen	91
4.3.3	Beeinflussung des Proteingehaltes an GSK3 $\beta$ , $\beta$ -Catenin und phosphoryliertem $\beta$ -Catenin in HT29-Zellen	92
<b>4.4</b>	<b>Modulation der Proteinkinase C-Aktivität durch Apfelpolyphenole</b>	<b>96</b>
4.4.1	Direkte Hemmwirkung am Enzym	96
4.4.2	Modulation der zellulären PKC-Aktivität in HT29-Zellen	98
4.4.3	Untersuchungen zur Aktivität der PKC in humanen Darm-epithelzellen im Vergleich zu Tumorzelllinie HT29	101
<b>4.5</b>	<b>Induktion von Apoptose</b>	<b>104</b>

4.5.1	Bestimmung der Expression pro- und antiapoptotischer PKC-Isoenzyme in HT29-Zellen	104
4.5.2	Modulation der Expression der PKC-Isoformen $\alpha$ und $\delta$ durch Apfelpolyphenole	105
4.5.3	Modulation der Caspase-3-Aktivität durch Apfelpolyphenole	110
4.5.4	Bestimmung der DNA-Fragmentierung durch Apfelpolyphenole	112
<b>4.6</b>	<b>Zellzykluseffekte durch Apfelpolyphenole</b>	<b>115</b>
4.6.1	Synchronisierung der Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase des Zellzyklus	115
4.6.2	Synchronisation der Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase des Zellzyklus	118
<b>4.7</b>	<b>Zusammenfassende Tabelle zur zellulären Wirkung von Apfelpolyphenolen</b>	<b>123</b>
<b>4.8</b>	<b>Zelluläre Wirkungen von Flavonoidabbauprodukten</b>	<b>125</b>
4.8.1	Modulation des Wachstums von HT29-Zellen <i>in vitro</i> durch die Abbauprodukte der Flavonoide	127
4.8.2	Modulation der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA	128
<b>4.9</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion der zellulären Wirkungen von Apfelpolyphenole und potentiellen Abbauprodukten</b>	<b>134</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>145</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>148</b>
<b>6.1</b>	<b>Apfelsaftextrakte</b>	<b>148</b>
6.1.1	Apfelsaftextrakt AE01	148
6.1.2	Apfelsaftextrakt AE02	148
6.1.3	Tresterextrakt AE03B	149
6.1.4	Apfelsaftextrakt AE04	149
6.1.5	Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE02 und des Tresterextraktes AE03B	151
6.1.5.1	Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE02	151
6.1.5.2	Fraktionierung des Tresterextraktes AE03B	151
<b>6.2</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>153</b>
<b>6.3</b>	<b>Kultivierung von Monolayerkulturen</b>	<b>154</b>
<b>6.4</b>	<b>Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford</b>	<b>158</b>
<b>6.5</b>	<b>Untersuchungen zur Wachstumshemmung (Sulforhodamin B Test)</b>	<b>159</b>
<b>6.6</b>	<b>Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie</b>	<b>161</b>
<b>6.7</b>	<b>Methoden zur Untersuchung von Apoptoseinduktion</b>	<b>165</b>
6.7.1	Bestimmung von fragmentierter DNA mittels Cell Death Detection ELISA <sup>Plus</sup> (Roche)	165
6.7.2	Untersuchungen zur Caspase-3-Induktion	168
<b>6.8</b>	<b>Bestimmung der Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR)</b>	<b>173</b>
6.8.1	Kultivierung der Zellen	173
6.8.2	Isolierung und Aufreinigung des EGF Rezeptors	173
6.8.3	Beschichten von Mikrotiterplatten mit Substrat	175
6.8.4	Testung der einzelnen EGFR-Fraktionen auf ihre PTK-Aktivität	176
6.8.5	Aktivitätsuntersuchungen der EGFR-assoziierten Proteintyrosinkinaseaktivität (ELISA)	176
<b>6.9</b>	<b>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse</b>	<b>180</b>
<b>6.10</b>	<b>Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des EGFR und den extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2)</b>	<b>184</b>
6.10.1	Kultivierung der HT29-Zellen	185
6.10.2	Inkubation der HT29-Zellen mit den Testsubstanzen	185
6.10.3	Gewinnung der Zellproteine	185
<b>6.11</b>	<b>Bestimmung Proteinkinase C (PKC)-Aktivität</b>	<b>187</b>
6.11.1	Herstellung des PKC-haltigen zytosolischen Überstandes	187
6.11.2	Durchführung des PKC-Aktivitätsassays	187
6.11.3	PKC-Aktivitätsbestimmung nach Inkubation von HT29-Zellen	190

6.11.4	PKC-Aktivitätsbestimmung mit primären Kolonozyten	191
6.11.4.1	Aufarbeitung des Biopsiematerials	191
6.11.5	Untersuchungen zur Modulation der Expression der PKC-Isoformen PKC $\alpha$ und PKC $\delta$	192
6.11.6	Gewinnung der Zellproteine und Western Blot Analyse	192
<b>6.12</b>	<b>Bestimmung der Aktivität von immunopräzipitierter GSK3<math>\beta</math></b>	<b>194</b>
6.12.1	Zellkultivierung der HT29-Zellen	194
6.12.2	Gewinnung der Zellproteine	195
6.12.3	Aktivierung der Protein G-Sepharose	195
6.12.4	Kopplung des GSK3 $\beta$ -Antikörpers an die Protein G-Sepharose	195
6.12.5	Immunopräzipitation der GSK3 $\beta$	196
6.12.6	Bestimmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität	196
6.12.7	Bestimmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität nach Zellinkubation von HT29-Zellen	200
<b>6.13</b>	<b>Untersuchungen des Proteingehaltes von GSK3<math>\beta</math> und <math>\beta</math>-Catenin sowie des Phosphorylierungsstatus von <math>\beta</math>-Catenin in HT29-Zellen</b>	<b>200</b>
<b>6.14</b>	<b>Materialienverzeichnis</b>	<b>202</b>
<b>6.15</b>	<b>Geräte</b>	<b>208</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>211</b>
<b>8</b>	<b>Anhangsverzeichnis</b>	<b>250</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

A431	humane Vulvakarzinomzelllinie
AC	Adenylatzyklase
ACF	„aberrant Crypt Foci“
AE01	polyphenolreicher Apfelsaftextrakt (sortenrein)
AE02	polyphenolreicher Apfelsaftextrakt
AE03B	polyphenolreicher Tresterextrakt
AE04	polyphenolreicher Apfelsaftextrakt
AFC	7-Amino-4-trifluormethylcumarin
AG1478	spezifischer EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478
AICR	„American Institute for Cancer Research“
AIF	apoptoseinduzierender Faktor
AMP	Adenosinmonophosphat
AOM	Azoxymethan
AP-1	„activated protein-1“-Familie (Transkriptionsfaktoren)
Apaf-1	Adaptorprotein
APC	adenomatöses „Polyposis Coli“ Protein/Gen
APS	Ammoniumpersulfat
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
Bad, Bax, Bak, Bid	proapoptischen Proteine
Bcl-2	Familie von pro- bzw. antiapoptischen Proteinen
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCo-2	humane Kolonkarzinomzelllinie
CAK	CDK-aktivierende Kinasen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBG	zytosolische $\beta$ -Glukosidase
CCC	Gegenstromverteilungschromatographie
CD95 (Fas) / APO-1	Transmembranrezeptoren der TNF-Familie
Cdc25	Phosphatase Familie
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
c-fos	Onkogen
CK1	Caseinkinase 1
CKI	Inhibitoren der CDK
c-myc	Onkogen
CoA	Coenzym A
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CR	Cystein-reiches Motiv
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	cAMP-responsives Element bindendes Protein
Cyc	Cycline
D	Asparaginsäure
DAG	Diacylglycerol
DISC	apoptoseinduzierender Signalkomplex
Dkk	Faktor Dickkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMH	Dimethylhydrazin



DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
Dvl	„dishevelled“ Protein
E, Glu	Glutaminsäure
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR / ErbB1 / Her1	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	Ethylenglykolesigsäure
eIF2B	Proteinsyntheseinitiationsfaktor
Elk-1	Transkriptionsfaktor „Ets-like kinase“
ErbB2 / Her2	Rezeptortyrosinkinase
ErbB3 / Her3	Rezeptortyrosinkinase
ErbB4 / Her4	Rezeptortyrosinkinase
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinasen
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FKS	Fötale Kälberserum
GA	Gallussäure
GAL4	Transkriptionsfaktor
GBP / Frat	GSK bindendes Protein / „frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas“
GDP	Guanosindiphosphat
GF109203X	Bisindoylmaleimid, PKC-Inhibitor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Grb2	Adapterprotein „growth factor receptor-bound protein 2“
Grg	Proteine der Groucho-Familie
GS	Glykogensynthase
GSK	Glykogensynthasekinase
GTP	Guanosintriphosphat
HBA	Hydroxybenzoesäure
Hb-EGF	Heparin-bindendes EGF
HDAC	Histondeacetylase
HepG2	humane Leberkarzinomzelllinie
HNPCC	Lynch-Syndrom „Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“
HPA	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie
IK	inhibitorische Kinase
IKK	Kinasen des inhibitorischen Faktors IκB
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IκB	Inhibitor von NFκB
JNK/SAPK	c-Jun-N-terminale Kinase, stress-induzierbare MAPK
LDL	„low density Lipoprotein“
LiCl	Lithiumchlorid
LPH	Laktase-Phloridzin-Hydrolase

LRP	„Low density“ Lipoproteinrezeptor verwandte Proteine
MAPK	mitogen aktivierbare Proteinkinase
MAPKAP-K / p <sup>90rsk</sup>	MAPK-aktivierte Kinase
MAPKK	mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase
MAPKKK	mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase Kinase
MARCK	Zytoskelett-assoziiertes Protein „myristyliertes alaninreiches C-Kinase Substrat“
MEK1/2	MAPKK/ERK-Kinasen
MEM	Minimum Essential Medium
MRP2	„multidrug-resistance associated protein 2“
mTor	„mammalian Target of Rapamycin“
Na <sup>+</sup>	Natrium
NFκB	nuklärer Transkriptionsfaktor
P, PO <sub>4</sub>	Phosphatrest
p16, p15, p18, p19	Inhibitoren der INK-4 Familie
p21, p27, p57	CDK-Inhibitoren der CIP/KIP-Familie
p38	stressinduzierbare MAPK
p53	Tumorsuppressorgen
p70S6K	p70 ribosomale S6 Kinase-1
PA	Protocatechusäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	p21 aktivierende Kinase
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
PB1	Procyanidin B1
PB2	Procyanidin B2
PDE	Phosphodiesterase
PDK	Phosphoinositol-abhängige Proteinkinase
PEG	Polyethylenglykol
PHG	Phloroglucinol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKI	Proteinkinaseinhibitoren
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase
PS	Pseudosubstratregion
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PTK	Proteintyrosinkinase
Q-3-gal	Quercetingalaktosid, Hyperosid
Q-3-glc	Quercetinglukosid, Isoquercitrin
Q-3-rha	Quercetinrhamnosid, Quercitrin
Q-3-rut	Quercetinrutosid, Rutin
QUE	Quercetin
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinasen
Raf	Ser/Thr-Kinase
Ras	Onkogen, GTP-abhängiges Schalterelement

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SA	Syringasäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH1	zentrale Tyrosinkinasedomäne; Src-homologe Domäne 1
SLUT	Sulfotransferase
Sos	GDP/GTP-Austauschfaktor „son of sevenless“
SRB	Sulforhodamin B
SW620	humane Kolonkarzinomzelllinie
TCA	Trichloressigsäure
Tcf/Lef	„T-cell factor/lymphocyte enhancer factor“ Transkriptionsfaktorfamilie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- $\alpha$	„transforming growth factor $\alpha$ “
Thr /T	Threonin
TPA	Phorbolester, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TrCP	F-Box Protein
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuronyltransferase
UZ	Ultrazentrifuge
V	Valin
VA	Vanillinsäure
Y, Tyr	Tyrosinrest

## 1 Einleitung

Gesunde Ernährung, mit einem hohen Anteil an Obst und Gemüse wird assoziiert mit einem verminderten Risiko an Krebs zu erkranken [Knekt et al, 2002]. Tumore des Kolons und Rektums stellen die zweithäufigste Todesursache durch Krebserkrankungen in den westlichen Industrieländern, sowohl bei Männern als auch bei Frauen, dar. Weltweit werden jährlich ca. 800.000 Neuerkrankungen diagnostiziert [Parkin, 2002]. Gerade bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes scheinen, neben genetischer Disposition und Umweltfaktoren, vor allem Ernährungsgewohnheiten eine maßgebliche Rolle zu spielen [Rafter et al, 2004]. In den letzten Jahren hat das Gesundheitsbewusstsein in der Bevölkerung enormen Zuwachs gefunden. Der Prävention von Tumorerkrankungen kommt dabei ein großer Stellenwert zu. Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe mit chemopräventivem Potential sind deshalb von größtem Interesse für neue Entwicklungen auf dem stetig expandierenden Markt an Nahrungsergänzungsmitteln und funktionellen Lebensmitteln. Apfelsaft stellt mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 12,8 Litern pro Jahr, das meist konsumierte Fruchtgetränk in Deutschland dar [Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie, 2004]. Aus diesem Grund sollten im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Netzwerkes – „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung“ - Apfelinhaltsstoffe mit protektivem Potential gegen inflammatorische und maligne Erkrankungen des Kolons identifiziert und deren Wirkmechanismen untersucht werden.

Die Kanzerogenese ist assoziiert mit Veränderungen der Expression und/oder Aktivität von Elementen unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden, die in die Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und der Induktion von Apoptose eingreifen. Die Inhibierung solcher proliferationsassoziiierter Signaltransduktionskaskaden durch Lebensmittelinhaltsstoffe gilt als interessantes Ziel für eine mögliche Chemoprävention. Lebensmittel in ihrer komplexen Zusammensetzung beinhalten eine Reihe von so genannten „bioaktiven“ Inhaltsstoffen, von denen einigen, vor allem aus der Gruppe der Flavonoide, unter anderem antikanzerogene, antimutagene, antioxidative und/oder antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden [Depeint et al, 2002; Manach et al, 2004]. Epidemiologische Studien zeigten bereits eine inverse Korrelation zwischen der Tumorzinzidenz für das kolorektale Karzinom und der Aufnahme von Flavonoiden durch Obst und Gemüse [Witte et al, 1996].

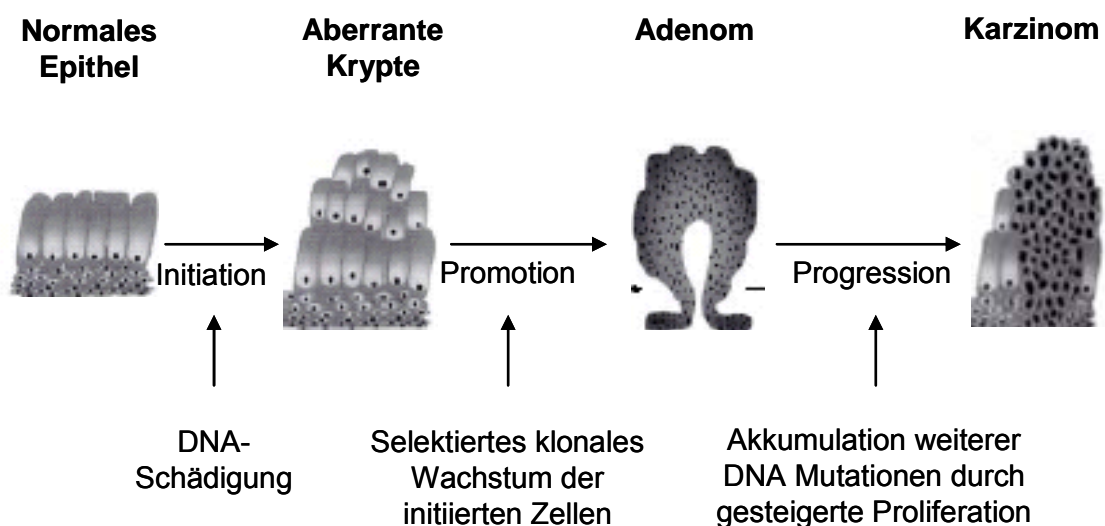
Die biologischen Wirkungen von Lebensmittelinhaltsstoffen *in vivo* sind abhängig von ihrer Bioverfügbarkeit. Ein vielfältiger Abbau von Flavonoiden durch die gastrointestinale Mikroflora *in vivo* ist beschrieben [Blaut et al, 2003]. Aufgrund der chemischen Instabilität von Polyphenolen kann auch unter *in vitro* Bedingungen ein Abbau nicht ausgeschlossen werden. Die zellulären Effekte von Polyphenolen werden bereits intensiv untersucht. So sind aus der Gruppe der Flavonoide bereits einige Anthocyanidine sowie das Flavonol Quercetin als Hemmstoffe des Wachstums humaner Kolonkarzinomzellen *in vitro* identifiziert worden [Marko et al, 2004; Kern et al, 2005]. Im Gegensatz dazu ist über die biologische Relevanz der Abbauprodukte von Flavonoiden wenig bekannt. Untersuchungen zum potentiellen Wirkmechanismus der Abbauprodukte, sowie ihr möglicher Beitrag zu den biologischen Wirkungen der ursprünglichen Flavonoide sind damit wesentlich für die Klärung des chemopräventiven Effektes der Flavonoide.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Krebs und Ernährung

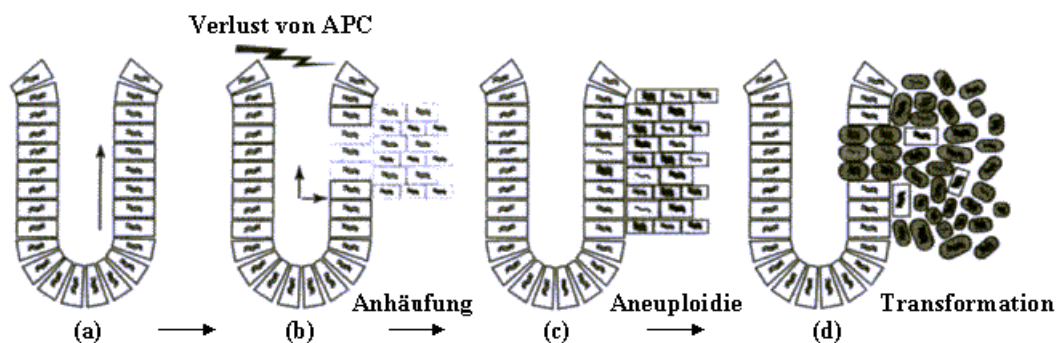
In den westlichen Industrieländern stellt Krebs die zweithäufigste Todesursache nach den Herzkreislauferkrankungen dar [Parkin, 2002]. Bösartige Tumore des Gastrointestinaltraktes (GIT) machen in der BRD mit ca. 80.000 Neuerkrankungen pro Jahr etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen aus, wobei Männer ungefähr 1,4-fach häufiger betroffen sind als Frauen. Etwa die Hälfte dieser Erkrankungen sind auf Karzinome des Kolons und Rektums zurückzuführen [Statistisches Bundesamt, 2003].

Zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen scheinen, zusätzlich zur genetischen Disposition und Umwelteinflüssen, vor allem Ernährungsfaktoren maßgeblich beizutragen. Der komplexe Zusammenhang zwischen Ernährung und Krebs wurde in den letzten Jahren vielfach diskutiert [Willet, 1995; Greenwald et al, 2000]. 35 % aller Krebserkrankungen können auf Ernährungsgewohnheiten zurückgeführt werden. Statistische Daten des amerikanischen Institutes für Krebsforschung (AICR) zeigen, dass im Falle des kolorektalen Karzinoms sogar 65-75 % der Neuerkrankungen durch gezielte Ernährung vermeidbar wären [AICR, 1997].



**Abbildung 1:** Stufenmodell der Kolonkanzerogenese [modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990].

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger, multifaktoriell bedingter Prozess, der meist viele Jahre dauert. Dieser Prozess wird in die drei Stadien Initiation, Promotion und Progression unterteilt (Abbildung 1) [Fearon und Vogelstein, 1990; Houlston, 2001; Frattini et al, 2004]. Die Kolonkanzerogenese verläuft über mehrere histopathologische Stufen ausgehend vom normalen Epithel über das hyperproliferierende Epithel zu Läsionen einzelner Krypten, den so genannten „aberrant Crypt Foci“ (ACF). Aus den ACF entwickeln sich zuerst Adenome, die anschließend Karzinome mit unkontrolliertem Wachstum und Metastasen ausbilden können [Gulliem et al, 1988]. Fearon und Vogelstein beschrieben mit einem Modell der kolorektalen Kanzerogenese (Abbildung 1) die häufigsten genetischen Veränderungen in der "Adenom – Karzinom – Sequenz" [Fearon und Vogelstein, 1990]. Als ein frühes Ereignis der Kolonkanzerogenese wird eine Mutation im "adenomatous polyposis coli" (APC)-Gen angesehen. Mutationen des APC-Gens führen zur vermehrten Promotion, weshalb APC als ein Schlüsselgen der Kolonkanzerogenese gilt (Abbildung 2) [Fearhead et al, 2001; Fode, 2002].



**Abbildung 2:** Möglicher Mechanismus der Tumorentstehung durch APC-Mutationen [nach Dikovskaya et al, 2001]. Normalerweise migrieren Dickdarmepithelzellen rasch Richtung Darmlumen (a). Bei Verlust von oder Mutationen in APC weichen die Zellen möglicherweise von ihrer Route ab (b) und werden aufgrund von Defekten während der Chromosomensegregation aneuploid (c). Dadurch kommt es zur Transkription proliferativer Gene (d).

Die Mehrzahl der Kolonkarzinome entsteht sporadisch unter dem Einfluss exogener Faktoren. Es werden nur ca. 10 % aller kolorektalen Tumore auf eine genetische Disposition zurückgeführt [Parkin, 2002].

Zu den genetischen Risikofaktoren zählen:

- familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) [Varesco, 2004; Strate und Syngal, 2005]
- erbliche kolorektale Karzinome ohne Polyposis, Lynch-Syndrom („Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“ (HNPCC)) [Jungck, 2000; Vasen, 2005]
- genetische Polymorphismen von Phase I- und Phase II-Enzymen [Sachse et al, 2002]

Als weitere Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom gelten chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Diabetes mellitus vom Typ II [Hu et al, 1999; Larrison et al, 2005; Limburg et al, 2005]. Den wichtigsten Risikofaktor stellt jedoch die Ernährung in Form der „Western Style Diet“ dar. Es handelt sich hierbei um eine Ernährungsform, die reich an tierischen Fetten, raffinierten Kohlenhydraten und arm an Obst, Gemüse sowie Ballaststoffen ist [AICR, 1997; English et al, 2004; Norat et al, 2005]. In der Literatur werden unter anderen folgenden Mechanismen zur Initiation und zur Promotion von Kolonkarzinomen durch die Ernährung diskutiert:

- Bildung von heterozyklischen aromatischen Aminen bei der Fleischzubereitung [Cross und Sinha, 2004; Sinha et al, 2005]
- Erhöhte Synthese von Gallensäuren durch Nahrungsfette, welche die durch die Mikroflora des GIT in tumorpromovierende sekundäre Gallensäuren metabolisiert werden [Bruce, 2000]
- Ein erhöhter Plasmainsulinspiegel, welcher bei übermäßiger Energiezufuhr zur Insulinresistenz führen kann, wodurch es zur konstitutiven Proliferation des Kolonepithels kommt [Schoen et al, 1999; Bruce, 2000]
- Übergewicht in Folge von physischer Inaktivität [Quadrilatero und Hoffman-Götz, 2003]

Das durchschnittliche Erkrankungsalter für ein kolorektales Karzinom liegt in Deutschland bei > 65 Jahren mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 50 % [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister, 2006]. Aufgrund des lebenslangen Einwirkens von Nahrungsbestandteilen auf das Kolonepithel gewinnt die Prävention durch die Ernährung immer mehr an Bedeutung. Als protektive Ernährungsfaktoren werden diskutiert:

- Omega-3-Fettsäuren [Roynette et al, 2004; Norat et al, 2005]
- Ballaststoffe [Pool-Zobel et al, 2002; Pool-Zobel, 2005]
- sekundäre Pflanzenstoffe (Polyphenole, Kapitel 2.5)
- Vitamine: Vitamin A, C und E [Jacobs et al, 2003; Stone et al, 2004]



## 2.2 Zelluläre Signalübertragung

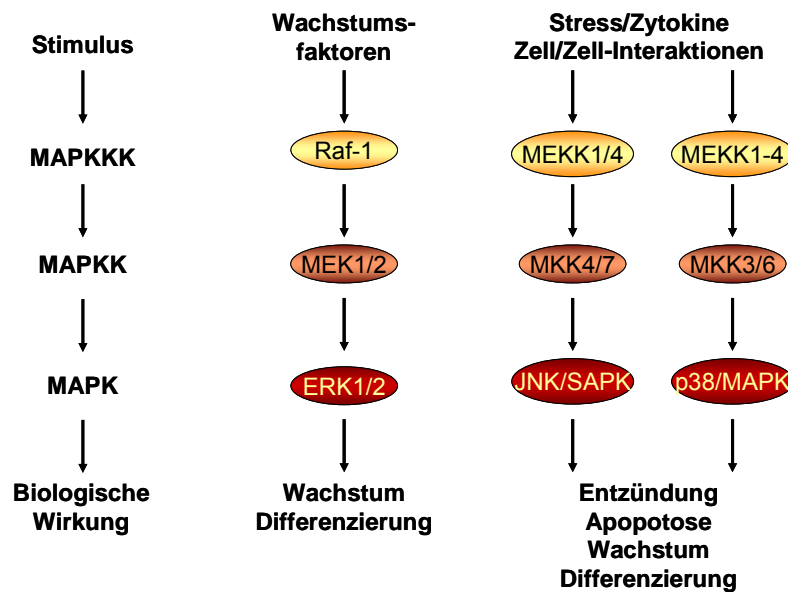
Für alle eukaryontischen Zellen ist die Kommunikation mit der Zellumgebung im Hinblick auf ihre Differenzierung, Proliferation und der Induktion von Apoptose von essentieller Bedeutung. Die extrazellulären Informationen werden beispielsweise vermittelt durch:

- Ionen
- Komponenten der extrazellulären Matrix
- Wachstumsfaktoren
- Neurotransmitter
- Hormone

Mit Hilfe membranständiger Rezeptoren und nachgeschalteten Signalelementen wird ein Stimulus durch so genannte Signaltransduktionskaskaden weitergeleitet und/oder amplifiziert und dadurch z. B. das Genexpressionsprofil der Zelle moduliert [Thiel und Rössler, 2005; Djahansouzi et al, 2004].

### 2.2.1 Die mitogen aktivierbare Proteinkinase (MAPK)-Kaskade

Die mitogen aktivierbare Proteinkinase (MAPK)-Kaskade kann in zwei Module unterteilt werden, die sich in ihrer Aktivierung unterscheiden. Das eine Modul wird durch Wachstumsfaktoren (mitogen) aktiviert, das andere Modul durch Stress, Zytokine oder Zell-Zell-Interaktionen. Beide Module sind in ihrem prinzipiellen Aufbau identisch (Abbildung 3). Das extrazelluläre Signal wird über einen Transmembranrezeptor auf eine nachgeschaltete Kinasekaskade, bestehend aus drei hintereinander geschalteten Kinasen, übertragen. Durch die Kinasen wird das Signal in den Zellkern weitergeleitet, wo es zur Modulation der Expression spezifischer Zielgene kommt. In der vorliegenden Dissertation wurde nur die Modulation des mitogen aktivierbaren Moduls durch Apfelpolyphenole untersucht, weshalb der Aufbau des Stress-aktivierbaren Moduls nicht näher erläutert wird [Djahansouzi et al, 2004].

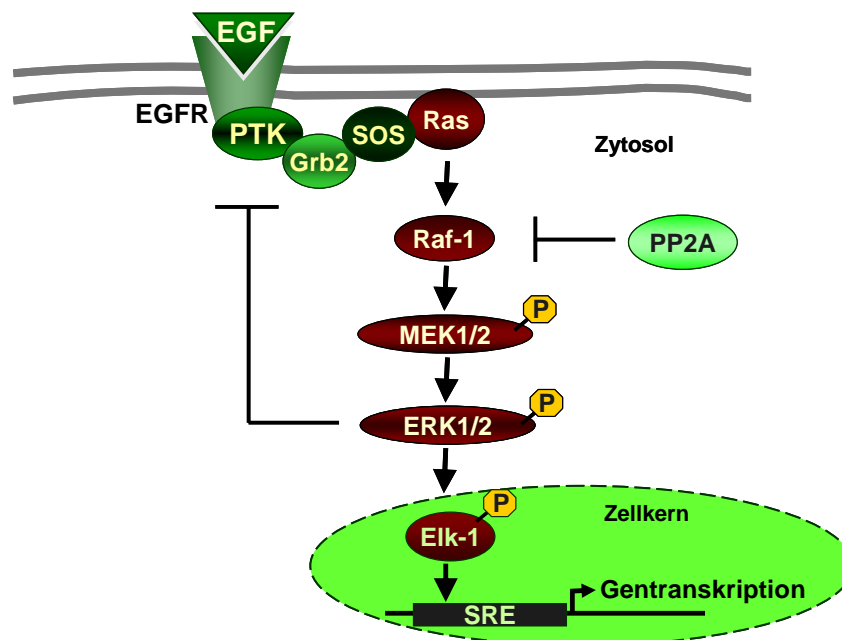


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der mitogen-aktivierbaren Proteinkinase (MAPK)-Kaskade [Cell Signalling Technology™]. Erk, extrazellulär-regulierte Kinasen; MAPK, mitogen aktivierbare Proteinkinase; MAPKK, mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase; MAPKKK, mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase Kinase; MEK/MKK, MAPK/Erk-Kinasen; JNK/SAPK, c-Jun-N-terminale Kinase/ Stress-aktivierbare Proteinkinase, Raf-1/MEKK, Serin/Threonin-spezifische mitogen-aktivierbare Proteinkinase Kinase (MEK/MKK) Kinasen.

### 2.2.1.1 Das mitogen aktivierte Modul

Ein extrazellulärer Ligand wie z. B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) bindet an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Durch Rezeptordimerisierung kommt es zur Aktivierung der intrinsischen Proteintyrosinkinase (PTK) (Abbildung 4). Dabei werden die Tyrosinreste durch den Dimerisierungspartner phosphoryliert und dienen als Bindungsstellen für Adapterproteine mit einer SH2-Domäne [Lemmon et al, 1994; Nioche et al, 2002]. Zu diesen gehört das Adapterprotein Grb2, („growth factor receptor-bound protein 2“), welches somit die Translation des GDP/GTP-Austauschfaktors „son of sevenless“ (Sos) ermöglicht [Batzer et al, 1994]. Das Schalterelement Ras wird durch Sos in seine aktive Form überführt, indem GDP gegen GTP ausgetauscht wird [Sonderman et al, 2004]. Ras bindet wiederum Raf-Kinasen, eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen (MAPKKK), die dadurch an die Zellmembran rekrutiert werden und dort maximal aktiv werden [Mason et al, 1999; Hilger et al, 2002]. Es sind bislang die drei Raf-Isoformen Raf-1, A-Raf und B-Raf beschrieben [Hagemann und Rapp, 1999; Beeram et al, 2003]. Alle drei Isoformen

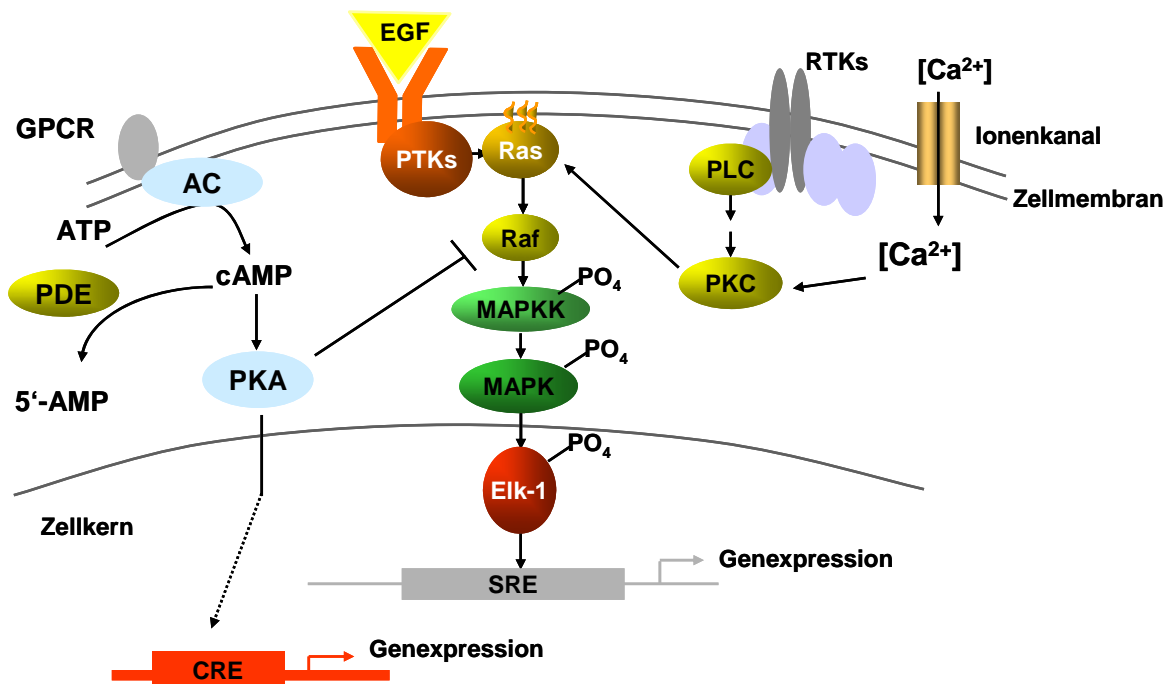
interagieren mit Ras und phosphorylieren MEK1 und MEK2 (MEK1/2, MAPKK/ERK-Kinasen). MEK1/2 aktivieren durch Phosphorylierung des Tyrosin-Glutaminsäure-Threonin Motivs die extrazellulär regulierten Kinasen ERK1/2 (p44/p42 oder MAPK, Kapitel 2.2.1.4). ERK1/2 sind Serin/Threonin-Kinasen mit mehr als 50 identifizierten Substraten [Joneson et al, 1998]. ERK1/2 besitzen als zelluläre Substrate den EGFR und Sos, die somit negativ autoregulierte werden [Silver et al, 2004]. Ein nukleäres Substrat von ERK1/2 ist der Transkriptionsfaktor Elk-1, der nach Phosphorylierung an die Promotorregion seiner Zielgene binden kann. Dies führt zur Transkription von Onkogenen wie z. B. c-fos und c-myc [Wang und Prywes, 2000; Wilkinson und Millar, 2000]. Gegenspieler der Proteinkinasen sind spezifische Phosphatasen, wie z. B. die Proteinphosphatase PP2A für Raf-1 [van Rossum et al, 2001].



**Abbildung 4:** Die mitogen aktivierte Proteinkinasekaskade (MAPK), Elk-1, Transkriptionsfaktor („Ets-like kinase“); ERK, extrazellulär regulierte Kinasen; Grb2, „growth factor receptor-bound protein 2“; MEK, MAPK/ERK-Kinasen; PP2A; Proteinphosphatase; PTK, Proteintyrosinkinase; Raf-1/MEKK, Serin/ Threonin-spezifische Kinase; Sos, „son of sevenless“, GTP-Austauschfaktor; SRE, Serum-responsives Element.

### 2.2.1.2 Verknüpfung der MAPK-Kaskade mit anderen Signaltransduktionskaskaden

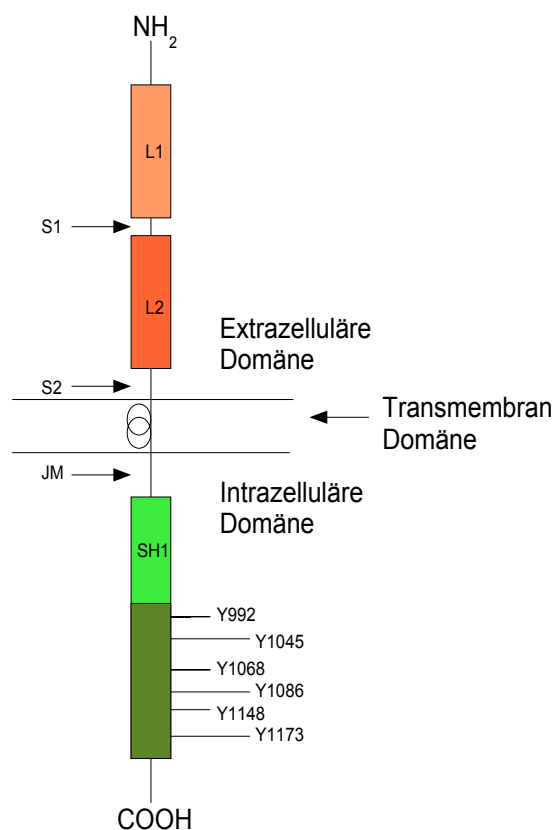
Durch so genannte „Crosstalks“ können Elemente der MAPK-Kaskade durch andere Signalwege moduliert werden (Abbildung 5). Dies erfolgt bevorzugt auf der Ebene von Raf-1. Beispielsweise kann Raf-1 durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg oder durch die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden [Clark et al, 2004]. Im Gegensatz dazu wird Raf-1 durch die Proteinkinase A (PKA), einem Schlüsselenzym des cAMP-Signalweges, durch eine Phosphorylierung an den Serinen 43, 259 und 621 inhibiert. Die Phosphorylierung an Ser 259 scheint hierbei die Entscheidende zu sein [Dhillon et al, 2002].



**Abbildung 5:** Schema zum „Crosstalk“ zwischen cAMP-Signalweg, der Proteinkinase C und MAPK-Kaskade. AC, Adenylatzyklase; AMP, Adenosinmonophosphat; ATP, Adenosintriphosphat; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; Ca<sup>2+</sup>, Kalzium; CRE, cAMP-responsives Element; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; Elk-1, Transkriptionsfaktor; GPCR, G-Protein-gekoppelter Rezeptor; MAPK, mitogen aktivierbare Proteinkinase; MAPKK, mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase; PDE, zyklische 3', 5' Nukleotidphosphodiesterase; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; PO<sub>4</sub>, Phosphatrest; PTKs, Proteintyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR); Raf, Serin/Threonin-Kinase; Ras, GTP-abhängiges Signalelement; RTK, Rezeptortyrosinkinasen; SRE, Serum-responsives Element.

### 2.2.1.3 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Zur ErbB-Familie, einer Familie von Rezeptortyrosinkinasen (RTK), gehören der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB1 (Her1, Abbildung 6), ErbB2 (Her2/neu), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4). Der ErbB1 wird im Folgenden als epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) bezeichnet. Er wurde erstmals von Carpenter et al, [1978] beschrieben und wird von einem einzelnen Gen kodiert, welches auf Chromosom 7p11-13 lokalisiert ist.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Struktur des EGFR [modifiziert nach Bazley and Gullick, 2005]. Der monomere EGFR besitzt eine extrazelluläre Domäne, bestehend aus zwei Ligandenbindungsdomänen L1/2 und zwei cysteinreichen Domänen (S1/S2), eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Kinasedomäne. JM, Juxtamembrandomäne; Y, Tyrosinrest

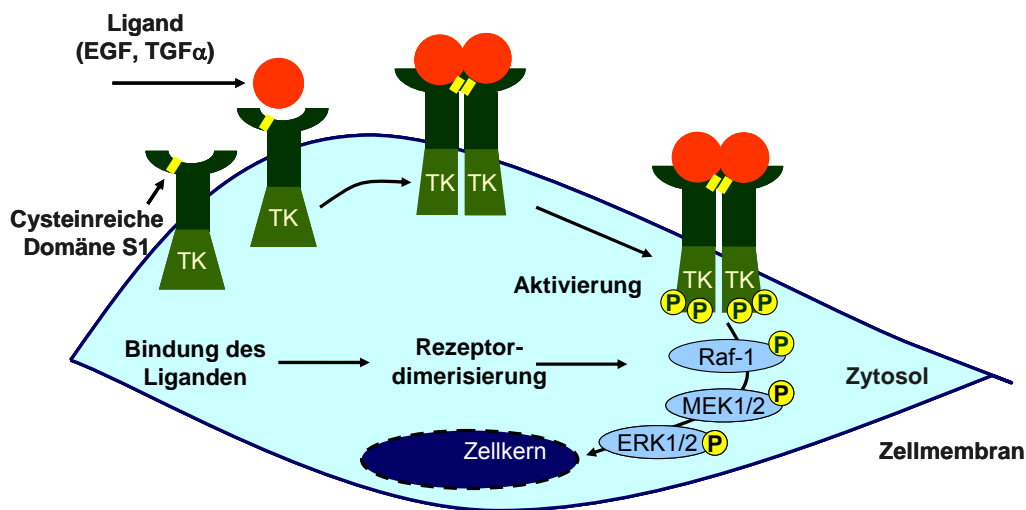
Der EGFR ist ein 1186 Aminosäuren großes Glykoprotein mit einer zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer glykosylierten, extrazellulären Ligandenbindungsdomäne (Abbildung 6).

Die Ligandenbindungsdomäne besteht aus vier Subdomänen L1, S1 und L2, S2. S1 und S2 sind homologe cysteinreiche Domänen. L1 und L2 bilden die Ligandenbindungsbereiche [Garrett et al, 2002; Ogiso et al, 2002].

Die intrazelluläre Domäne wird in drei Regionen aufgeteilt [Gullick, 2001; Garret et al, 2002; Ogiso et al, 2002; Bazley and Gullick, 2005]:

- Juxtamembrandomäne
- nicht-katalytischer carboxyterminaler Teil: beinhaltet die sechs Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung von Adapterproteinen, wie z. B. Grb2, sowie für Motive für die Initialisierung und Degradierung des Rezeptors
- Zentrale Tyrosinkinasedomäne SH1 (Src homologe Domäne 1): Notwendig für die Phosphorylierung und damit Aktivierung der sechs carboxyterminalen Tyrosinreste (Y)

Bislang konnten elf Liganden von Rezeptoren der ErbB-Familie identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem EGF, der „transforming growth factor alpha“ (TGF $\alpha$ ), Amphiregulin, Heparin-bindendes EGF (Hb-EGF) und die Neuregulin-Unterfamilie [Olayioye et al, 2000; Gullick, 2001; Bazley and Gullick, 2005]. In Abwesenheit von Liganden ist der monomere Rezeptor inaktiv. Bindet der Ligand, z. B. im Falle von EGF im Verhältnis 1:1, an den Rezeptor, kommt es, aufgrund einer Interaktion zwischen der cysteinreichen Domäne (S1-Domäne) des EGFR mit der S1-Domäne eines zweiten EGF-Rezeptors zur Homodimerisierung (Abbildung 7). Jede S1-Domäne bildet nach Ligandenbindung eine extrazelluläre Dimerisierungsschleife, die für die Dimerisierung der Rezeptoren verantwortlich ist [Garett et al, 2002; Ogiso et al, 2002]. Der EGFR bildet bei seiner Aktivierung sowohl Homo- als auch Heterodimere mit weiteren Rezeptoren der ErbB-Familie aus [Wells, 1999; Yarden und Sliwkowski, 2001; Fan et al, 2005]. In allen ErbB-Rezeptoren ist die Dimerisierungsschleife homolog; dies ist die Voraussetzung für eine Dimerisierung mit weiteren Rezeptoren der ErbB-Familie. Für ErbB2 wird wegen seiner ligandenunabhängigen Aktivität eine konstitutive Aktivierung postuliert [Half et al, 2004]. ErbB2 ist aufgrund seiner konstitutiven Aktivität der bevorzugte Dimerisierungspartner des EGFR.



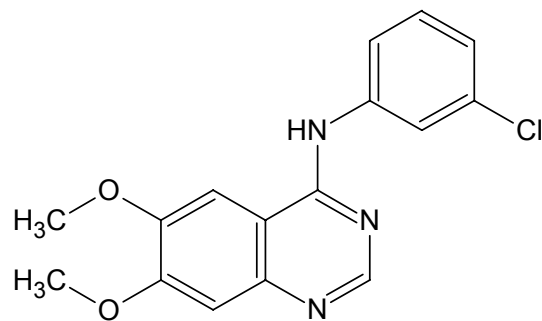
**Abbildung 7:** Dimerisierung des EGFR nach Ligandenbindung und Aktivierung der Proteinkinasekaskade [modifiziert nach [http://www.astrazeneca.no/images/medica/0403\\_EGFR\\_fig4ny.gif](http://www.astrazeneca.no/images/medica/0403_EGFR_fig4ny.gif)]. EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; ERK, extrazellulär-regulierte Kinasen, MEK, MAPK/ERK-Kinase, Raf-1, Serin/Threonin-Kinase; TGF $\alpha$ , „transforming growth factor  $\alpha$ “; TK, Tyrosinkinase

In einer Vielzahl von Tumoren, wie z. B. der Brust, des ZNS und des Kolons ist der EGFR stark überexprimiert und gilt daher als Zielprotein für Antitumorthérapien [Stern, 2003; Layfield et al, 2003; Mamot und Rochlitz, 2005]. Eine erhöhte EGFR-Expression und Aktivität korreliert häufig mit einer schlechteren Prognose und Therapierbarkeit [Mamot und Rochlitz, 2005]. Außerdem scheint eine erhöhte Rezeptordichte mit einer gesteigerten Produktion von Liganden einherzugehen, mit der Folge einer autokrinen Stimulation [Mamot und Rochlitz, 2005]. Es gibt bislang drei Strategien zur Modulation des EGFR, die in der Tumorthérapie zur Anwendung kommen könnten:

1. Monoklonale Antikörper, die die Ligandenbindungsdomäne blockieren, wie z. B. Cetuximab (Merck) [Cunningham et al, 2004]
2. Inhibitoren der intrinsischen Proteintyrosinkinaseaktivität, z. B. Gefitinib (Iressa<sup>TM</sup>) [Lynch et al, 2004]
3. Antikörper-basierende Immunokonjugate, wie z. B. Immunotoxine oder Immunoliposomen [Mamot et al, 2003]

Nur die Ansätze unter Punkt eins und zwei haben bisher die Phase III der klinischen Studien erreicht [Mamot und Rochlitz, 2005].

Tyrphostine (Quinazolinderivate) hemmen spezifisch die Tyrosinkinasedomäne der ErbB-Familie und somit deren Aktivierung via EGF-induzierter Autophosphorylierung [Osherov et al., 1993; Daub et al., 1997]. Tyrphostin AG1478 (4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin, Abbildung 8) ist ein potenter und spezifischer Inhibitor des EGFR ( $IC_{50}$ -Wert (isolierter EGFR) = 3 nM) [Osherov & Levitsky, 1994]. ErbB2 wird hingegen nur marginal ( $IC_{50}$ -Wert (isolierter ErbB2) > 100  $\mu$ M) gehemmt [Osherov & Levitsky, 1994].



**Abbildung 8:** Struktur des spezifischen EGFR-Inhibitors Tyrphostin AG1478

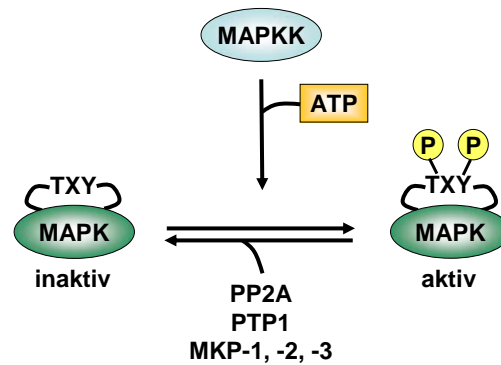
#### 2.2.1.4 Extrazellulär regulierte Kinasen ERK1 und ERK2

Die Proteinkinasen ERK1/2 wurden 1991 erstmals beschrieben [Boulton und Cobb, 1991]. ERK1/2 sind MAP-Kinasen mit einem Molekulargewicht von 44 bzw. 42 kDa und sind in ihrer Struktur zu 85 % homolog [Pearson et al, 2001]. In der nicht stimulierten Zelle liegen sie im Zytoplasma an Mikrotubuli assoziiert vor. Sie werden durch die vorgeschalteten MAPK-Kinasen (MEK1/2 oder MKK) aktiviert [Ashworth et al, 1992]. Die Aktivierungsschleife von ERK1/2 besteht aus einem Motiv aus Threonin (T)/X/Tyrosin (Y), wobei X häufig Glutaminsäure ist (Abbildung 9) [Pearson et al, 2001]. Die Phosphorylierung des Tyrosin- und Threonin-Restes führt zu einer 1000-fach höheren Enzymaktivität im Vergleich zur un- bzw. monophosphorylierten Form [Robbins et al, 1993].



ERK1/2 besitzen mehr als 50 sowohl zytosolische als auch nukleäre Substrate, wie z. B.:

- Zytosolische Substrate:
  - Phospholipase A2 [van Rossum et al, 2001]
  - Topoisomerase II $\alpha$  [Shapiro, 1999]
  - Proteinkinasen: MAP Kinase interagierende Kinase (Mnk) [Parra et al, 2005]
- Nukleäre Substrate:
  - AP-1 („activated protein-1“) Familie (c-jun, c-fos) [Wang und Prywes, 2000]
  - Ets-Domäne Proteine (Elk-1) [Wilkinson und Millar, 2000]

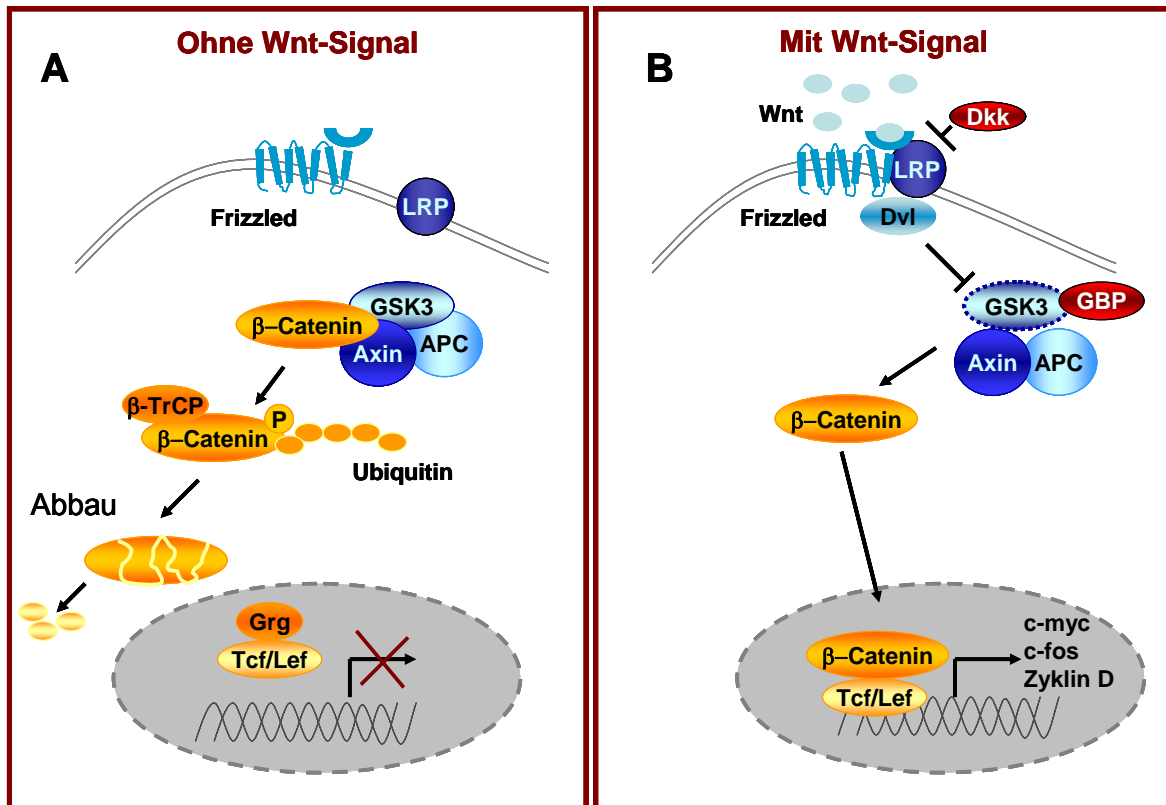


**Abbildung 9:** Darstellung der Aktivierung von MAPK-Enzymen durch doppelte Phosphorylierung, [modifiziert nach Cobb und Goldsmith, 1995]. ATP, Adenosintri-phosphat; MAPK, mitogen aktivierte Proteinkinase/ERK1/2; MAPKK, mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase; PP2A, PTP1 und MKP, Proteinphosphatasen; TXY, Thr-X-Tyr-Konsensus-Sequenz..

### 2.2.2 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg (Abbildung 10) spielt eine wichtige Rolle für die Zellproliferation, die Morphologie und die Zellmotilität [Frame und Cohen, 2001]. Ein Aktivierungsstimulus wird über Wnt-Faktoren, cysteinreiche Glykoproteine, die mit dem „Frizzled“-Rezeptor interagieren, vermittelt. Bislang wurden 19 humane Isoformen an Wnt-Proteinen identifiziert [Chtarbova und Müller, 2003]. Der Mechanismus der Wnt-Signalweiterleitung durch den „Frizzled“-Rezeptor ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ergebnisse an *Drosophila melanogaster* zeigten, dass „low density“ Lipoproteinrezeptor-verwandte Proteine (LRP) als Co-Rezeptoren des „Frizzled“-Rezeptors entscheidend sind für den Wnt-Signalweg [Tamai et al, 2000 und 2004]. Die Bindung von Wnt an LRP kann durch den Faktor Dickkopf (Dkk) inhibiert werden. Die Bindung von Wnt-Glykoproteinen an den „Frizzled“-Rezeptor (Abbildung 10B) führt zur Dimerisierung des Rezeptors mit LRP und zur Aktivierung des „dishevelled“ Proteins (Dvl). Dvl hemmt die Glykogensynthasekinase-3 (GSK3) und somit die Phosphorylierung der GSK3-Substrate [Kishida et al, 2001; Tamai et al, 2004]. Es wird ein Mechanismus über das GSK3-bindende Protein (GBP)/FRAT („frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas“) postuliert. Dvl soll dabei die Bindung von GBP/FRAT an die GSK3 bewirken. GSK3 liegt dadurch nicht mehr vollständig assoziiert im Proteinkomplex vor und ist somit nicht mehr in der Lage,  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung zum Abbau zu markieren [Fraser et al, 2002]. Nicht-phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern und bindet an Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie. Nach der Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes an die DNA wird die Transkription von Zielgenen wie z. B. Cyclin D1, c-myc und c-jun induziert [Novak et al, 1999; Behrens, 2000].

In Abwesenheit von Wnt-Faktoren (Abbildung 10A) wird  $\beta$ -Catenin durch die Caseinkinasen 1 (CK1) an Ser<sup>45</sup> und durch die im Proteinkomplex aktiv vorliegende GSK3 an Ser<sup>41</sup>, Ser<sup>37</sup> und Ser<sup>33</sup> phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt zur Markierung des  $\beta$ -Catenins mit Ubiquitin durch das F-Box Protein  $\beta$ TrCP und nachfolgend zum proteasomalen Abbau [Ougolkov et al, 2004]. Somit liegt in Abwesenheit eines Wnt-Signals kein  $\beta$ -Catenin im Zellkern vor. Die Tcf/Lef-Proteine sind assoziiert an Moleküle der Groucho-Familie (Grg), welche die Transkription von Zielgenen unterdrücken (Abbildung 10A) [Brantjes et al, 2001; Lepourcelet und Shivdasani, 2002].

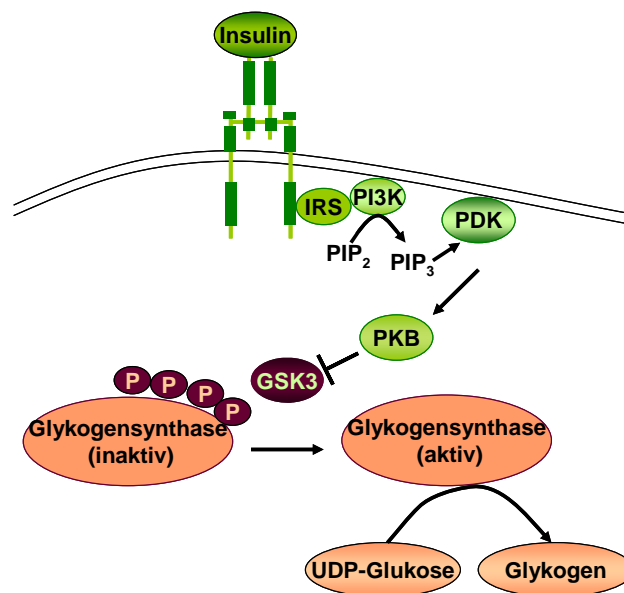


**Abbildung 10:** Der Wnt-Signalweg [modifiziert nach Oving und Clevers, 2002], **A:** ohne Wnt-Signal; **B:** Nach Wnt-Bindung. APC, „adenomatous polyposis coli“ Tumorsuppressorgen; c-fos und c-myc, Onkogene; Dkk, Faktor Dickkopf; Dvl, „dishevelled“ Protein; GBP, GSK3-bindendes Protein; Grg, Protein der Groucho-Familie; GSK3, Glykogensynthasekinase-3; LRP, Lipoproteinrezeptor-verwandte Proteine; Tcf/Lef, „T-cell factor/lymphocyte enhancer factor“ Transkriptionsfaktorfamilie; TrCP, F-Box Protein.

Mutationen im Wnt-Signalweg zählen zu den frühen Ereignissen der Kolonkanzerogenese. Die oft in der Kanzerogenese mutierten drei Gene, kodieren die Proteine APC, β-Catenin und Axin. Alle diese Mutationen führen letztendlich zu einer Akkumulation von β-Catenin und somit zu einer permanenten Stimulierung proliferationsassoziierter Gene [Oving und Clevers, 2002; Kolligs et al, 2002; Chtarbova und Müller, 2003].

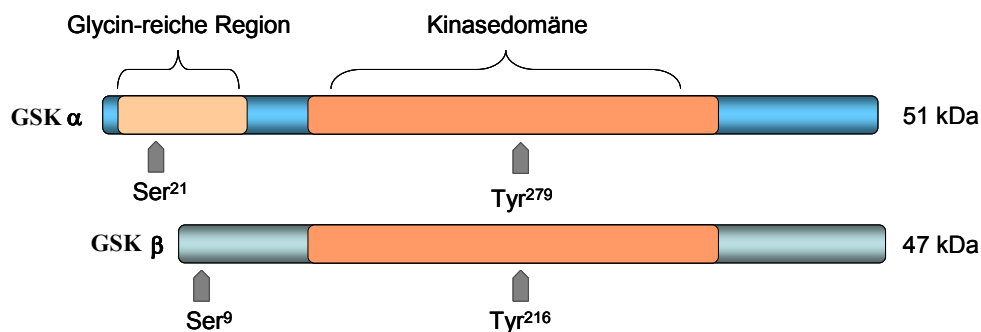
### 2.2.2.1 Die Glykogensynthasekinase-3 (GSK3)

Die GSK3 wurde erstmals beschrieben als das Enzym, welches die Glykogensynthase (GS), ein Schlüsselenzym der Glykogensynthese, durch Phosphorylierung inaktiviert (Abbildung 11) [Embi et al, 1980].



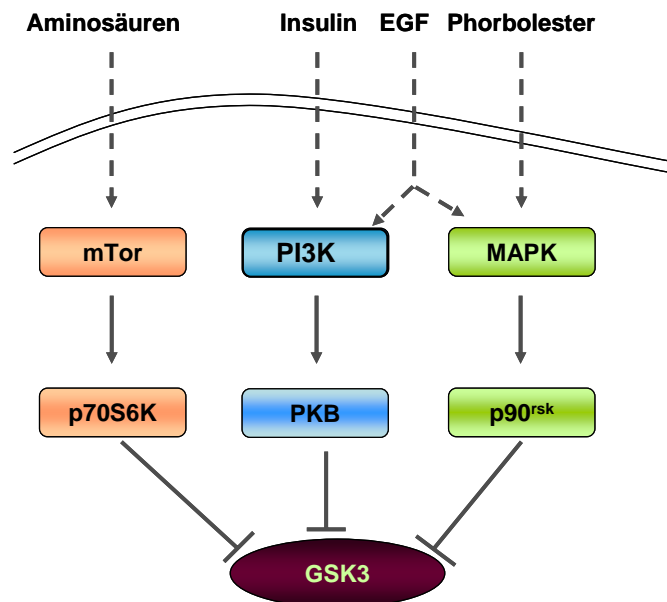
**Abbildung 11:** Insulin-stimulierte Glykogensynthese durch GSK3-Inhibierung [modifiziert nach Frame und Cohen, 2001]. GSK3, Glykogensynthasekinase-3; IRS, Insulinrezeptorsubstrat; PDK, Proteinkinase; PI<sub>3</sub>K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP, Phosphatidylinositolphosphat; PKB, Proteinkinase B; UDP, Uridindiphosphat.

Es gibt zwei Isoenzymformen der GSK3 in Säugerzellen, GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  (Abbildung 12), welche ubiquitär exprimiert werden. Die Isoformen sind zu 97 % in ihrer Kinasedomäne homolog, unterscheiden sich jedoch außerhalb dieser Domäne deutlich dadurch, dass GSK3 $\alpha$  einen glycinreichen Rest in der N-terminalen Region aufweist. Des Weiteren wird eine GSK3 $\beta$  Splice-Variante (GSK3 $\beta_{II}$ ) beschrieben, die jedoch nur geringfügig exprimiert wird (~ 15% des Gesamtstatus) [Mukai et al, 2002].



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des Aufbaus der humanen GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  [Doble und Woodgett, 2003]. Die mit den Pfeilen markierten Aminosäuren stellen die Phosphorylierungsstellen dar.

Beide Isoformen der GSK3 werden durch die Proteinkinase B (PKB) nach deren Aktivierung im PI3K-Signalweg (Abbildung 13) an Ser<sup>21</sup> (GSK3 $\alpha$ ) oder an Ser<sup>9</sup> (GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert [Tuhackova et al, 1999; Beaulieu et al, 2004]. GSK3 kann ebenso durch die mitogen aktivierbare Proteinkinase aktivierende Kinase-1 (p90<sup>rsk</sup>) phosphoryliert werden (Abbildung 13). Des Weiteren wird GSK durch EGF-, PI3K- oder MAPK-vermittelt phosphoryliert [Shaw und Cohen, 1999]. Die p70 ribosomale S6 Kinase-1 (p70S6K) phosphoryliert ebenfalls GSK3 $\alpha$  an Ser<sup>21</sup> bzw. GSK3 $\beta$  an Ser<sup>9</sup> *in vitro* (Abbildung 13). Es wird vermutet, dass diese Inhibierung durch Aminosäuren in humanen Myozyten induziert wird [Armstrong et al, 2001]. Die Phosphorylierung der GSK3-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  an den beschriebenen Serinen führt immer zu einer Aktivitätshemmung.



**Abbildung 13:** Darstellung der GSK3 $\beta$ -inhibierenden Signalwege [modifiziert nach Cohen und Frame, 2001]. EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; GSK3, Glykogensynthasekinase-3; MAPK, mitogen-aktivierbare Proteinkinase; mTor, „mammalian target of rapamycin“; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B, p70S6K, p70 ribosomale S6 Kinase-1; p90<sup>rsk</sup>, mitogen aktivierbare Proteinkinase aktivierende Kinase-1.

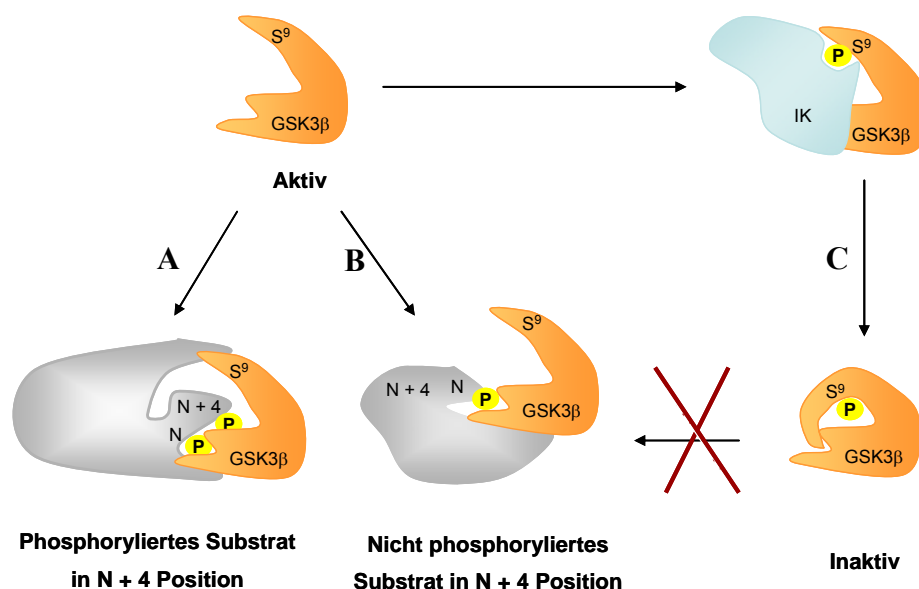
Als wichtige Substrate der GSK3 sind zu nennen:

- Transkriptionsfaktoren: Protoonkogen c-jun, cAMP-responsives Element bindendes Protein (CREB) [Boyle et al, 1991; Fiol et al, 1994]
- Eukaryontischer Proteinsynthese-Initiationsfaktor (eIF2B) [Welsh et al, 1998]
- Zytosolische Proteine: Axin,  $\beta$ -Catenin, ATP-Zitratlyase, Glykogensynthase [Cohen und Frame, 2001]

Die Phosphorylierung der Substrate basiert hauptsächlich auf dem so genannten „Priming-Phosphat“, d. h. das Substrat besitzt ein Ser/Thr-X-X-X-pSer/pThr-Motiv, dabei steht X für eine beliebige Aminosäure. Die Spezifität des Substrates ist abhängig von dem phosphorylierten Ser oder Thr in der  $n + 4$  Position, wobei  $n$  für die Phosphorylierungsstelle der GSK3 steht (Abbildung 14A). Dieses Motiv besitzen u. a. folgende GSK3-Substrate: GS, eIF2B und ATP-Zitratlyase [Hughes et al, 1992; Welsh und Proud, 1993].

Im Gegensatz dazu werden für die Phosphorylierung von Axin und  $\beta$ -Catenin (keine  $n + 4$  Substrate) hoch affine Interaktionen mit der GSK3 im Multiproteinkomplex (Abbildung 14B) postuliert [Doble und Woodgett, 2003].

Durch die Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  an Ser<sup>9</sup> entsteht ein intramolekulares Pseudosubstrat, welches sich an die positiv geladene Bindungstasche anlagert. Dadurch kommt es zur Blockierung der katalytischen Tasche und die Phosphorylierung von GSK3-Substraten ist somit unterbunden (Abbildung 14C) [Frame et al, 2001].



**Abbildung 14:** Regulation der GSK3 $\beta$ -Aktivität durch Phosphorylierung an Ser<sup>9</sup> [modifiziert nach Doble und Woodgett, 2003]. In der unstimulierten Zelle ist die GSK3 $\beta$  konstitutiv aktiv und somit in der Lage, ihre unterschiedlichen Substrate zu phosphorylieren (A + B). Nach Phosphorylierung an Ser<sup>9</sup> durch inhibitorische Kinasen (IK), wie z.B. der Proteinkinase B (PKB), kann aufgrund der Blockierung der Bindungstasche durch den N-Terminus der GSK3 $\beta$  kein Substrat mehr binden. Die GSK3 $\beta$  als Pseudosubstrat ist somit ein kompetitiver Inhibitor für ihre Substrate (C).

Die GSK3 wird aufgrund ihrer Schlüsselrolle im Wnt-Signalweg in einer Vielzahl von Krankheiten als möglicher Angriffspunkt angesehen, so z. B. bei Tumorerkrankungen oder bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Alzheimer. Die Hemmung der GSK3-Aktivität durch Lithium wird bei der Therapie von manischer Depression angewendet [Gould und Manji, 2002]. Lithium ist ein GSK3-Inhibitor, der nicht-kompetitiv zu ATP die GSK3 $\beta$ -Aktivität ( $K_i$  2 mM) hemmt [Ryves and Harwood, 2001; Zhang et al, 2003]. Weitere GSK3-Inhibitoren sind in Tabelle 1 aufgelistet.

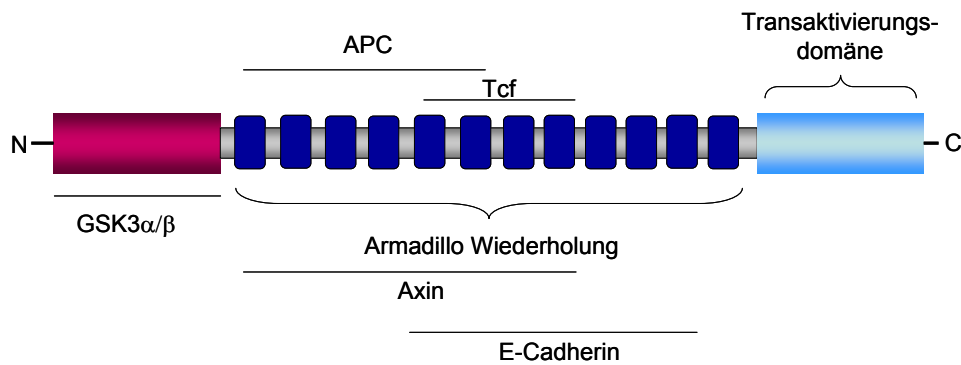
**Tabelle 1:** Verschiedene Klassen von GSK3-Inhibitoren [Doble und Wodgett, 2003].

Inhibitorklasse	Inhibitor	Wirkprofil
Aloisine	Aloisin A, Aloisin B	ATP-kompetitiv
Hymenialdisin	Dibromohymenialdisin	ATP-kompetitiv
Indirubine	5,5'-Dibromoindirubin Indirubin-3'monoxim	ATP-kompetitiv
Lithium	Lithium	Konkurriert mit $Mg^{2+}$ , Phosphorylierung an Ser <sup>21/9</sup> über PI3K-Signalweg (PKB)
Maleimide	SB-216763, SB-415286	ATP-kompetitiv

### 2.2.2.2 $\beta$ -Catenin

Die Primärstruktur von  $\beta$ -Catenin besteht aus drei Domänen (Abbildung 15) [Hecht et al, 1999]

- Die aus 130 Aminosäuren bestehende N-terminale Domäne enthält die Phosphorylierungsstelle für GSK3 $\alpha/\beta$ .
- Die zentrale Domäne setzt sich aus 550 Aminosäuren zusammen und besteht aus den so genannten Armadillo Wiederholungen (12 x 42 Aminosäuren). Diese Domäne beinhaltet die Bindungsstellen für die Substrate Axin, APC, Cadherin und Tcf/Lef.
- Die C-terminale Region aus 110 Aminosäuren enthält die Transaktivierungsdomäne. Diese Region bindet die transkriptionalen Co-Aktivatoren.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung von  $\beta$ -Catenin und seiner Bindungspartner [angelehnt an Oving und Clevers, 2002].

Bis zu 50 % der Kolontumore ohne APC-Mutation weisen Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen auf. Die Mutationen schützen  $\beta$ -Catenin vor Phosphorylierungen durch GSK3 $\beta$  in der N-terminalen Region und damit vor seinem Abbau [Oving und Clevers, 2002]. Es kommt dadurch zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellzytoplasma und zur nachfolgenden Translokation in den Zellkern, was schließlich zur Bildung des aktiven  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef-Komplexes und zur konstitutiven Aktivierung von Wnt-abhängigen Genen führt [Hart et al, 1999; Lustig und Behrens, 2003; Behrens und Lustig, 2004]. In der Gesamtheit aller kolorektalen Karzinome sind dies jedoch weniger als 10 % [Kolligs et al, 2002].

### 2.2.3 Protein Kinase C (PKC)

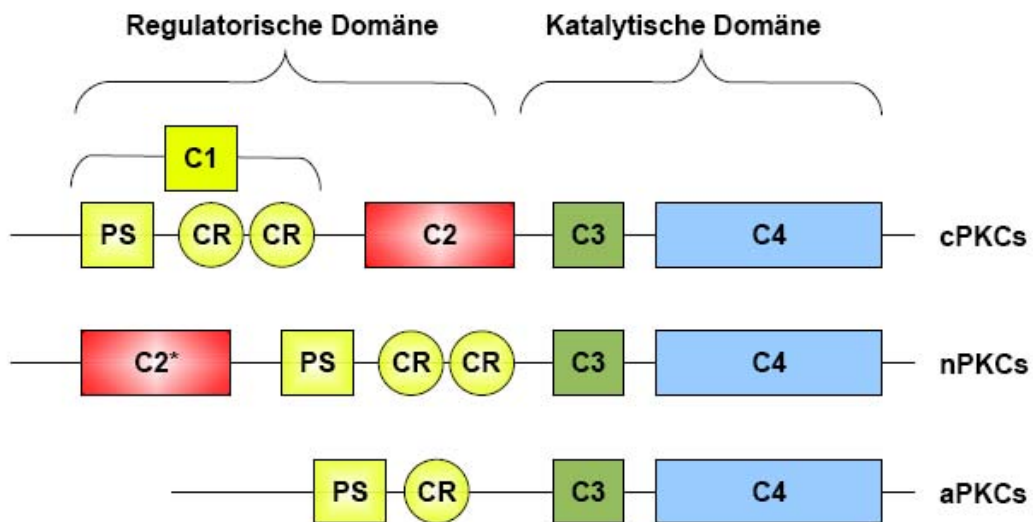
Die Proteinkinase C (PKC) steht für eine Familie von Serin/Threonin Kinasen. Bislang wurden elf humane Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 68 und 83 kDa identifiziert, die sich in ihrer Struktur und in ihren enzymatischen Eigenschaften unterscheiden [Mellor and Parker, 1998; Buchner, 2000]. PKC Isoenzyme sind in einer Vielzahl von intrazellulären Signalwegen involviert und spielen unter anderem eine wichtige Rolle sowohl bei mitogenen Prozessen und der Tumorenstehung als auch bei der Differenzierung und der Induktion von Apoptose [Dekker und Parker, 1994; Attar et al, 1996].

Aufgrund ihrer Struktur und Aktivierbarkeit wird die PKC Isoenzymfamilie in drei Klassen unterteilt (Abbildung 16).



1. Konventionelle PKC Isoformen (cPKC $\alpha$ ,  $\beta_{I/II}$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ): Bei PKC  $\beta_I$  und  $\beta_{II}$  handelt es sich um „Splice“-Varianten. Die cPKCs sind  $Ca^{2+}$ - und Phospholipid-abhängige Kinasen.
2. Neuartige PKC Isoformen (nPKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ): Sie sind  $Ca^{2+}$ -unabhängig und benötigen Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin zur Aktivierung
3. Atypische PKC Isoenzymformen (aPKC $\zeta$ ,  $\iota/\lambda$ ): PKC $\lambda$  ist das humane Homologe der PKC $\iota$  der Maus. Die aPKCs sind  $Ca^{2+}$ - und DAG-unabhängig und nicht durch Phorbolster aktivierbar [Newton 1995 und 2003]

Strukturell besitzen alle PKC Isoformen sowohl eine C-terminale katalytische als auch eine N-terminale regulatorische Domäne (Abbildung 16). Die regulatorische Domäne besteht aus einer Pseudosubstratregion (PS) und Sequenzen für die Interaktion mit den Aktivatoren der PKC wie z. B. Phospholipiden oder Diacylglycerol. Die cPKC Isoformen enthalten vier homologe Domänen (C1 – C4), die durch variable Isoform-spezifische Domänen unterbrochen sind [Newton, 1995; Dempsey et al, 2000]. Die C1-Domäne besteht in cPKC-Enzymen, die eine DAG- oder Phorbolsterbindungsregion aufweisen, meist aus zwei cysteinreichen Regionen. Am N-terminalen Ende dieser Region befindet sich die Pseudosubstratbindungsstelle (PS), die im inaktiven Zustand des Enzyms die Substratbindungsstelle (in C4) blockiert [Dutil und Newton, 2000]. Die  $Ca^{2+}$ - und Phosphatidylserinbindungsstellen befinden sich in der aus fünf Aspartatresten bestehenden Domäne C2 [Sutton und Sprang, 1998]. Die C3 und C4 Domänen beinhalten die ATP- und Substratbindungsstelle. Die nPKCs besitzen eine C2-ähnliche Domäne an der N-terminalen Seite der C1 Domäne. Es fehlen jedoch die Aspartatreste, weshalb die nPKCs  $Ca^{2+}$ -unabhängig sind. Den aPKC-Isoenzymen fehlt die C2 Domäne und ihre C1 Domäne besteht nur aus einer cysteinreichen Region, weshalb sie nicht durch DAG und Phorbolster, sondern nur durch Phosphatidylserin aktiviert werden können [Newton, 1995 und 2003].

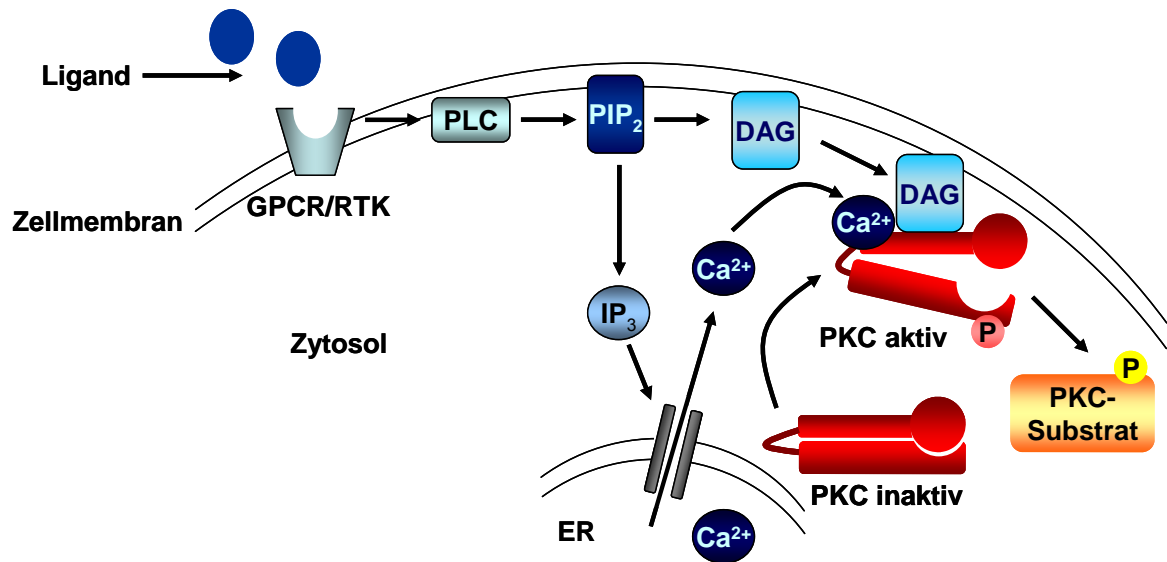


**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur (C1-C4) der PKC Isoenymfamilie [modifiziert nach Dempsey et al, 2000]. Die PKC-Aktivatoren Diacylglycerol und Phorbolster binden an das cysteinreiche Motiv (CR) in der C1 Domäne der cPKCs und nPKCs. Die C2 Domäne der cPKCs beinhaltet die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle. Die nPKCs besitzen nur eine C2-ähnliche Domäne (C2\*) und sind dadurch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. PS, Pseudosubstratregion; C3, ATP-Bindungsstelle; C4, Substratbindungsstelle.

Im inaktiven Zustand bindet die Pseudosubstratbindungsstelle der C1 Domäne an die Substratbindungsstelle der C4 Domäne. Es wird angenommen, dass es durch Bindung von PKC-Aktivatoren (DAG oder Phorbolestern) zu Konformationsänderungen kommt und somit die Substratbindungsstelle von der Pseudosubstratbindungsstelle freigegeben wird [Dutil und Newton, 2000]. Dabei werden der Bindung der Co-Faktoren DAG, Phospholipide und  $\text{Ca}^{2+}$  zwei Funktionen zugesprochen: 1) Die Stabilisierung der PKC-Struktur und der Substratbindungstasche und 2) die Förderung der Membranassoziation [Dempsey et al, 2000].

Die Aktivierung der zytosolischen PKC erfolgt hauptsächlich durch deren Translokation an die Zellmembran mittels rezeptorvermittelter Signale (Abbildung 17). Diese Aktivierung der PKC wird kontrolliert durch die Co-Faktoren DAG, Phosphatidylserin und  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Co-Faktor vermittelte PKC-Aktivierung kann durch G-Protein-abhängige Signalwege (Abbildung 17) oder Rezeptortyrosinkinasen und der damit verbundenen Aktivierung von Phospholipase C (PLC) ausgelöst werden. Die Isoenzyme der PLC sind Schlüsselenzyme des Phosphatidylinositolmetabolismus. Die PLC $\beta$  wird aktiviert durch G-Protein-vermittelte Signale; die PLC $\gamma$  durch Rezeptortyrosinkinasen. Durch die Aktivierung der PLC kommt es zur Bildung von Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und DAG aus zellmembran-

assoziiertem Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>). IP<sub>3</sub> führt zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den zellulären Speichern. Die Bindung von Ca<sup>2+</sup> und DAG an die regulatorische Domäne der PKC führt zur Translokation der PKC an die Zellmembran und zu deren Aktivierung durch die Freigabe der Substratbindungsstelle (Abbildung 17) [Koivunen et al, 2006].



**Abbildung 17:** Darstellung der PKC-Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen, [modifiziert nach Koivunen et al, 2006]. Ca<sup>2+</sup>, Kalzium; DAG, Diacylglycerol; ER, endoplasmatisches Retikulum; GPCR, G-Protein-gekoppelter Rezeptor; IP<sub>3</sub>, Inositoltriphosphat; PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositoldiphosphat; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; RTK, Rezeptortyrosinkinase.

Ein weiterer essentieller Schritt bei der Aktivierung der PKC ist die Phosphorylierung an drei homologen Regionen im aktiven Zentrum ihrer katalytischen Domäne. Durch die initialisierende Phosphorylierung der PKC durch die Phosphoinositol-abhängige Proteinkinase (PDK1) kommt es zur schnellen Autophosphorylierung an zwei weiteren Phosphorylierungsstellen, z. B. an Thr<sup>641</sup> und Ser<sup>660</sup> im Falle der PKC $\beta$ <sub>II</sub>, welche mit einer Membrandissoziation des aktivierten Enzyms verbunden ist [LeGood et al, 1998; Dempsey et al, 2000]. Die nPKCs werden nur nach Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) durch PDK1 phosphoryliert [Belham et al, 1999]. Die Phosphorylierung des Threoninrestes in der Aktivierungsschleife der nPKCs durch die PKD1 scheint von besonderer Bedeutung für die rezeptorvermittelte Aktivierung der PKC zu sein, jedoch ist der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt [Seki et al, 2005]. Ebenfalls wird eine Aktivierung der PKC Isoenzyme durch Protein-Protein-Interaktionen beschrieben. Ein Beispiel

dafür ist die Bindung der PKC an „Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen“(RACKs). Diese RACKs ermöglichen die Translokation der PKC zu ihrem Wirkort in der Zelle [Dempsey et al, 2000; Park et al, 2004]. Des Weiteren erhöhen RACK-Proteine die Substratphosphorylierung der PKC durch die Stabilisierung der aktiven Form [Mochly-Rosen, 1995; Ron und Kazanietz, 1999]. Die PKC Isoenzyme besitzen eine Vielzahl sowohl von zytosolischen als auch nukleären Substraten, von denen nur einige Beispiele in der Tabelle 2 aufgelistet sind

**Tabelle 2:** Beispiele für Substrate der PKC

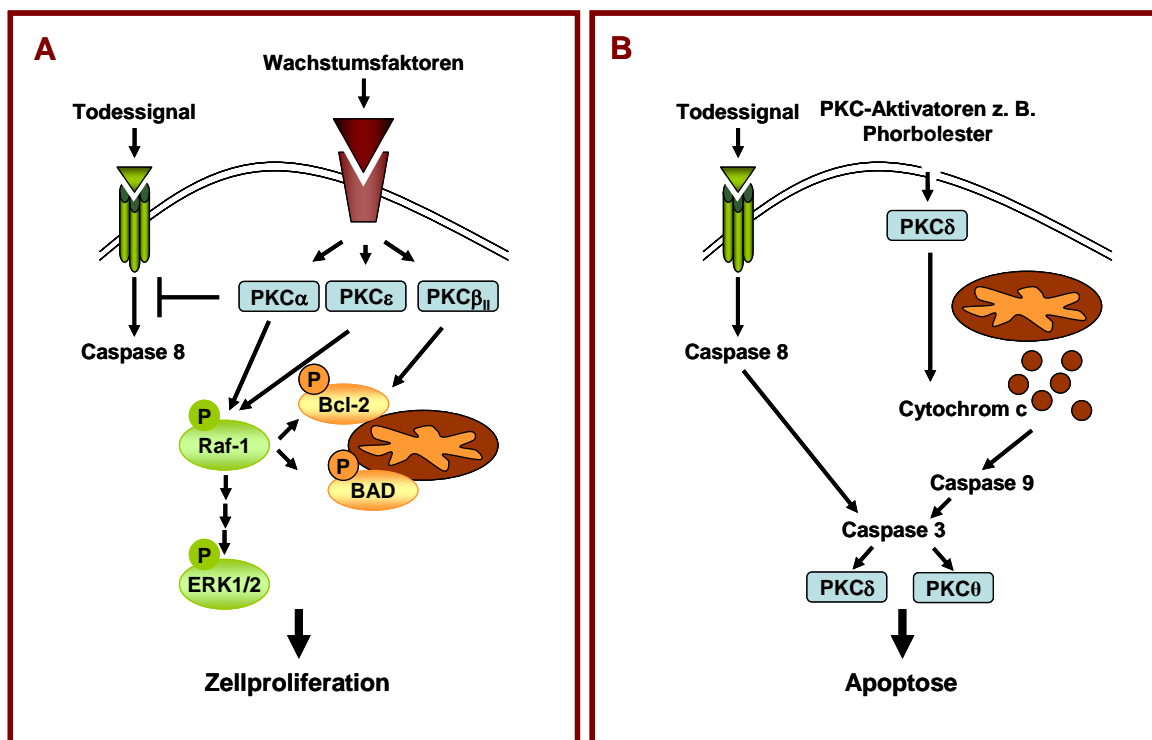
Zytosolische Substrate	Nukleäre Substrate
myristyliertes alaninreiches PKC-Substrat (MARCKS) [Arbuzova et al, 2002]	Topoisomerasen II [Austin und Marsh, 1998; Plo et al, 2002]
Elemente der Ras/ERK/MAPK Kaskade [Clark et al, 2004]	Tumorsuppressorprotein p53 [Magnelli und Chiarugi, 1997]
I $\kappa$ B-Kinasen (IKK) [Lin et al, 2000; Storz und Toker, 2003]	c-fos Serum-responsives Element [Soh et al, 1999; Soh und Weinstein, 2003]

### 2.2.3.1 Rolle der PKC Isoenzymformen in der Kolonkanzerogenese

PKC Isoenzyme scheinen eine besondere Rolle in der Kolonkanzerogenese zu spielen, wobei die spezifische Wirkweise der einzelnen Isoenzyme im Kanzerogeneseprozess noch nicht hinreichend aufgeklärt ist [Gökmen-Polar et al, 2001]. In aberranten Krypten sowie in Kolontumoren ist der Proteingehalt der „Splice“-Variante PKC $\beta_{II}$  stark erhöht im Vergleich zu ihrer Expression im nicht transformierten Epithelgewebe [Murray et al, 1999, Davidson et al, 2000]. Im Gegensatz dazu ist die Expression der cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta_I$ ) im Gewebe von Kolontumoren stark erniedrigt [Gökmen-Polar et al, 2001]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die PKC $\beta_{II}$  die GSK3 $\beta$ -Aktivität hemmt. Jedoch wird der Einfluss der PKC-abhängigen GSK3-Inaktivierung auf die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Gentranskription noch kontrovers diskutiert [Goode et al, 1992; Chen et al, 2000]. Die Überexpression von PKC $\beta_{II}$  in transgenen Mäusen führt sowohl zu einer Hyperproliferation von Kolonepithelzellen als auch zu einer erhöhten Tumorfrequenz [Murray et al, 1999; Dempsey et al, 2000]. Zusammenfassend scheint eine erhöhte Expression an PKC $\beta_{II}$  ein frühes Ereignis in der Kolonkanzerogenese zu sein, wodurch es zu einer gesteigerten Proliferation von Epithelzellen durch Wnt-vermittelte Gentranskription kommt (Kapitel 2.2.2) [Dempsey et al, 2000; Gökmen-Polar et al, 2001].

### 2.2.3.2 PKC und Apoptose

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod (Kapitel 2.4). PKC-Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung. Dabei wirken einzelne Isoformen der PKC entweder stimulierend auf die Zellproliferation (Abbildung 18A) oder proapoptotisch (Abbildung 18B). Zu den antiapoptotischen Isoenzymen werden die PKC $\alpha$ , PKC $\beta_{II}$ , PKC $\epsilon$  sowie die atypischen Isoenzyme PKC $\nu$ ( $\lambda$ ) und PKC $\zeta$  gezählt, [Dempsey et al, 2000; Cesaro et al, 2001; Mandil et al, 2001]. Der Isoform PKC $\delta$ , aber auch der PKC $\theta$ , werden proapoptotische Wirkweisen zugesprochen [Basu, 2003]. Bei einsetzender Apoptose wird die PKC $\delta$  durch ein proteolytisch wirkendes Protein (Caspase-3, Kapitel 2.4.1) in ein katalytisches Fragment gespalten, welches die DNA-Fragmentierung fördert und weitere Caspasen im Apoptoseprozess aktivieren kann [Mandil et al, 2001; Cerda et al, 2001; Gutcher et al, 2003; Basu, 2003]. Des Weiteren wird ein Mechanismus zur direkten Modulation der Cytochromausschüttung durch die PKC $\delta$  diskutiert [Basu, 2003].



**Abbildung 18:** Regulation der Apoptose durch PKC-Isoformen [modifiziert nach Gutcher et al, 2003]. PKC Isoformen, die beteiligt sind an proliferativen Prozessen (A) bzw. an der Induktion von Apoptose (B). Bad, proapoptotisches Protein; Bcl-2, antiapoptotisches Protein; ERK, extrazellulär regulierte Kinasen; PKC, Proteinkinase C; Raf-1, Serin/Threoninkinase.

### 2.2.3.3 PKC-Inhibitoren

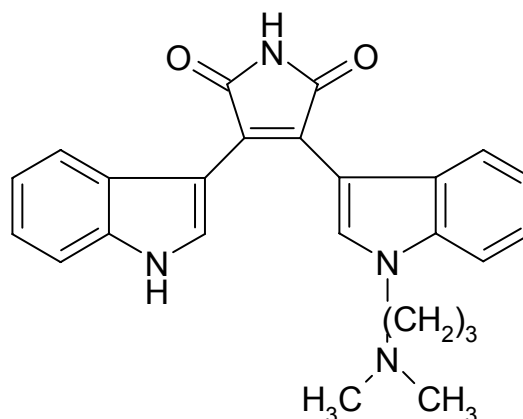
Es werden zwei Ansätze zur Hemmung der PKC-Aktivität beschrieben (Tabelle 3):

1. Inhibierung der katalytischen Domäne: Inhibitoren konkurrieren mit ATP um die Bindungstasche [Caponigro et al, 1997]
2. Inhibierung der regulatorischen Domäne: Diese Hemmstoffe konkurrieren häufig um die DAG/Phorbolsterbindungsstelle oder blockieren die PKC-Phospholipid-interaktion [Caponigro et al, 1997]

**Tabelle 3:** Inhibitoren der PKC [Caponigro et al, 1997]

Inhibitoren der katalytischen Domäne	Inhibitoren der regulatorischen Domäne
Hydroxystaurosporin (UCN-01)	Calphostin C
Suramin	Sphingosin
Bisindoylmaleimid (GF109203X) [Toullec et al, 1991]	Tamoxifen

Bisindoylmaleimid GF109203X (2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(1*H*-indol-3-yl)-maleimid) (Abbildung 19) hemmt die Aktivität rekombinanter PKC im niedrigen nanomolaren Bereich ( $IC_{50} = 10 \text{ nM}$ ). Es handelt sich bei GF109203X um einen spezifischen kompetitiven Inhibitor der ATP-Bindungstasche sämtlicher PKC Isoenzyme *in vitro* [Toullec et al, 1991]. Im Gegensatz zu den Staurosporinen besitzt GF109203X jedoch eine viel geringere Hemmwirkung auf die Aktivität von cAMP-abhängigen Kinasen oder Proteintyrosinkinasen.

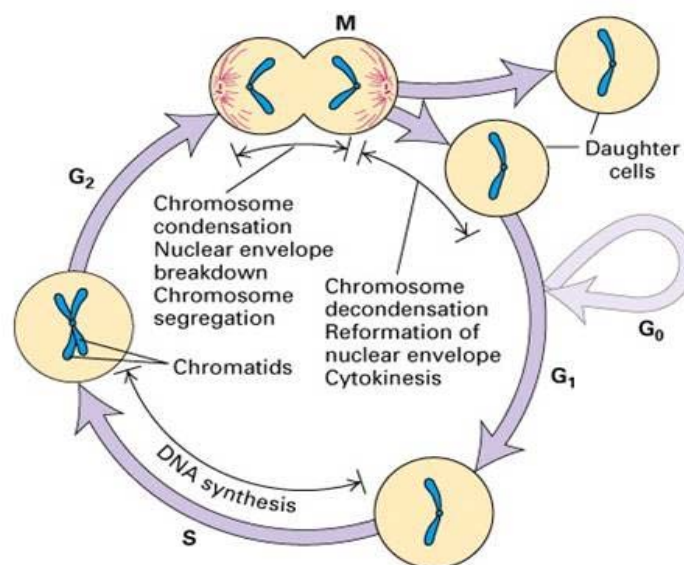


**Abbildung 19:** PKC-spezifischer Inhibitor Bisindoylmaleimid GF109203X

## 2.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus lässt sich in vier Hauptphasen unterteilen:  $G_1$  (G, „gap“, Lücke)-Phase, S (Synthese)-Phase,  $G_2$ -Phase und M (Mitose)-Phase (Abbildung 20). In der  $G_1$ -Phase, der Wachstumsphase, wächst die diploide Zelle und synthetisiert die Substrate für die Nukleinsäurebiosynthese. Bei Fehlen von Wachstumsfaktoren bzw. von Substraten oder nach Ausdifferenzierung verweilt die Zelle in der  $G_0$  (Ruhe)-Phase, bis sie ein Signal zur Weiterführung des Zellzyklus erhält. In der S-Phase erfolgt die Replikation der DNA.

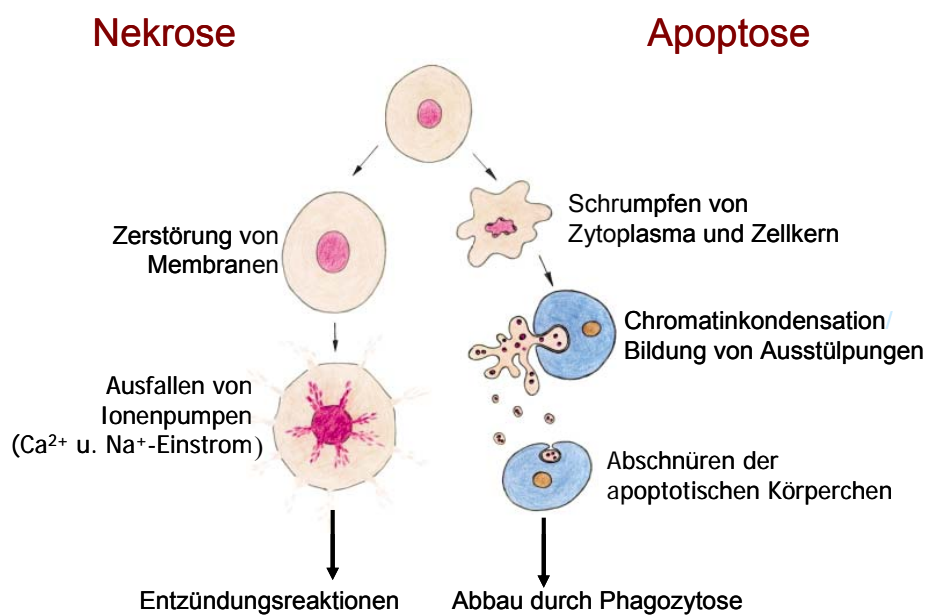
In der sich anschließenden  $G_2$ -Phase stellt die Zelle ihren Stoffwechsel auf die bevorstehende Mitose ein und überprüft, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen wurde. Die Zellteilung findet in der M-Phase statt, die nochmals in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese unterteilt wird. Dabei entstehen zwei identische Tochterzellen. Als Kontrollpunkte im Zellzyklus dienen der Restriktionspunkt in der  $G_1$ -Phase, der  $G_2/M$ -Kontrollpunkt und der Spindelkontrollpunkt in der M-Phase, an denen ein fehlerfreies Ablaufen des Zellzyklus überprüft wird. Werden Defekte festgestellt, geht die Zelle normalerweise in einen Zellzyklusarrest über und ermöglicht somit Reparaturenzymen, vorhandene Fehler zu korrigieren. Ist der Defekt irreparabel, wird Apoptose eingeleitet bzw. falls er nicht repariert wird, kann es zu Mutationen kommen [Sherr, 1996; Senderowicz und Sausville, 2000].



**Abbildung 20:** Stadien des Zellzyklus [<http://www.mh-hannover.de/institute/biochemie/Vorlesung>].  $G_0$ , Ruhephase;  $G_1$ , Wachstumsphase; S, Synthesephase;  $G_2$ , „Mitosevorbereitungsphase“; M, Mitosephase.

## 2.4 Apoptose

Beim Zelltod wird zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden (Abbildung 21). Die Nekrose ist der Zelltod, wie er unter anderem bei physischen oder chemischen Schädigungen auftritt. Durch die Schädigung einzelner Zellmembrankompartimente erfolgt eine Störung der Osmoregulation, was wiederum in einem Ausfall von Ionenpumpen mündet, so dass Natrium und Kalzium ungehindert in die Zelle eindringen können, bis diese durch Osmose platzt. Der Zellinhalt, der auch lysosomale Enzyme enthält, läuft in die Zellumgebung und aktiviert somit das Immunsystem, wodurch es zu Entzündungsreaktionen kommt [Hengartner, 2000; Ferri und Kroemer, 2000; Van Cruchten und Van den Broeck, 2002; Kanduc et al, 2002].



**Abbildung 21:** Darstellung von Apoptose und Nekrose [Hug, 2000]. Bei der Nekrose schwellen das Zytoplasma (rosa) und der Zellkern (rot) durch Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Einstrom an, bis sie platzen. Es kommt zu Entzündungsreaktionen. Bei der Apoptose schrumpfen Zytoplasma und Zellkern. Der Abbau findet durch Phagozytose (Phagozyten, blau) der entstehenden apoptotischen Körperchen statt.

Die Apoptose ist der zelluläre Prozess, der zum programmierten Zelltode führt. Die Funktion der Apoptose ist die „Opferung“ einzelner degenerierter Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus. Dabei bleiben die Zellmembranen im Gegensatz zur Nekrose erhalten. Aufgrund der Schrumpfung der Zellen bei der Apoptose kommt es zu Zellmembranver-



änderungen, wie z. B. die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Membran. Diese Veränderungen werden von Phagozyten erkannt und die Zellen durch Phagozytose beseitigt [Hengartner, 2000; Ferri und Kroemer, 2000; Van Cruchten und Van den Broeck, 2002; Kanduc et al, 2002].

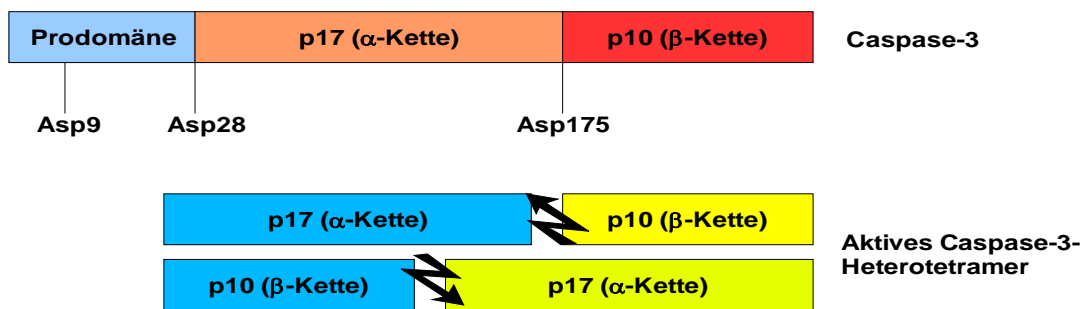
Eine Fehlregulation der Apoptose wird mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie z. B., Virusinfektionen, Autoimmun-, neurodegenerativen und Krebserkrankungen. Veränderungen der Expression bzw. Aktivität von Elementen (z. B. Liganden, Caspasen, Caspasesubstrate) der Apoptosesignalkaskaden gehen ebenfalls mit verschiedenen Krankheitsbildern einher. So werden Alzheimer und Parkinson assoziiert mit einem Zelltod durch Fehlregulation der Caspaseaktivität [Hartmann et al, 2001; Tacconi et al, 2004]. Im Gegensatz dazu scheinen inaktivierende Mutationen im Caspase-8-Gen eine Rolle beim invasiven kolorektalen Karzinom zu spielen [Kim et al, 2003]. Aufgrund der zentralen Rolle der Apoptose in der Kanzerogenese ist ein Hauptziel bei der Entwicklung von Chemotherapeutika, die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Apoptosesignalen wiederherzustellen und somit Apoptose zu induzieren [Debatin, 2004].

### 2.4.1 Caspasen

Alle apoptoseinduzierende Signalwege führen zur Aktivierung von Caspasen, einer Enzymfamilie von cysteinreichen aspartatspezifischen Proteasen, die durch Autoproteolyse oder durch andere Caspasen aus inaktiven Procaspasen hervorgehen. Die Caspasen zerlegen das Zellgerüst und die Kernmatrix und aktivieren Endonukleasen, welche die DNA in Polymere von 180 kDa zerteilen (apoptotische DNA-Leiter). Es wurden bislang 13 humane Caspasen identifiziert, wobei die Caspasen-2, -3, -6 bis -10 und -12 Bestandteile des Apoptoseprozesses sind. Sie werden nochmals in die Subfamilie der Initiatorcaspasen (Caspase-8 und -9) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilt. Eine weitere Subfamilie, bestehend aus Caspase-1, -4, -5 und -14, spielt eher bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle [Talanian et al, 1997; Ho und Hawkins, 2005].

Die Caspasen liegen als inaktive Proenzyme mit einem Molekulargewicht von 30 – 50 kDa vor. Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen besitzen im inaktiven Zustand unterschiedliche Prodomänen am N-terminalen Ende. An die langen Prodomänen der Initiatorcaspasen können aktivierende Proteine (z. B. FADD bzw. Apaf) binden, während den kurzen Pro-

domänen der Effektorcaspasen noch keine besondere Rolle zugeordnet werden konnte. Durch Abspaltung dieser Prodomänen und der intramolekularen Spaltung in eine große Untereinheit ( $\alpha$ -Kette) und eine kleine Untereinheit ( $\beta$ -Kette) erfolgt die proteolytische Aktivierung einer Procaspase zur aktiven Caspase (Abbildung 22) [Cohen, 1997; Tawa et al, 2004; Ho und Hwak, 2005].



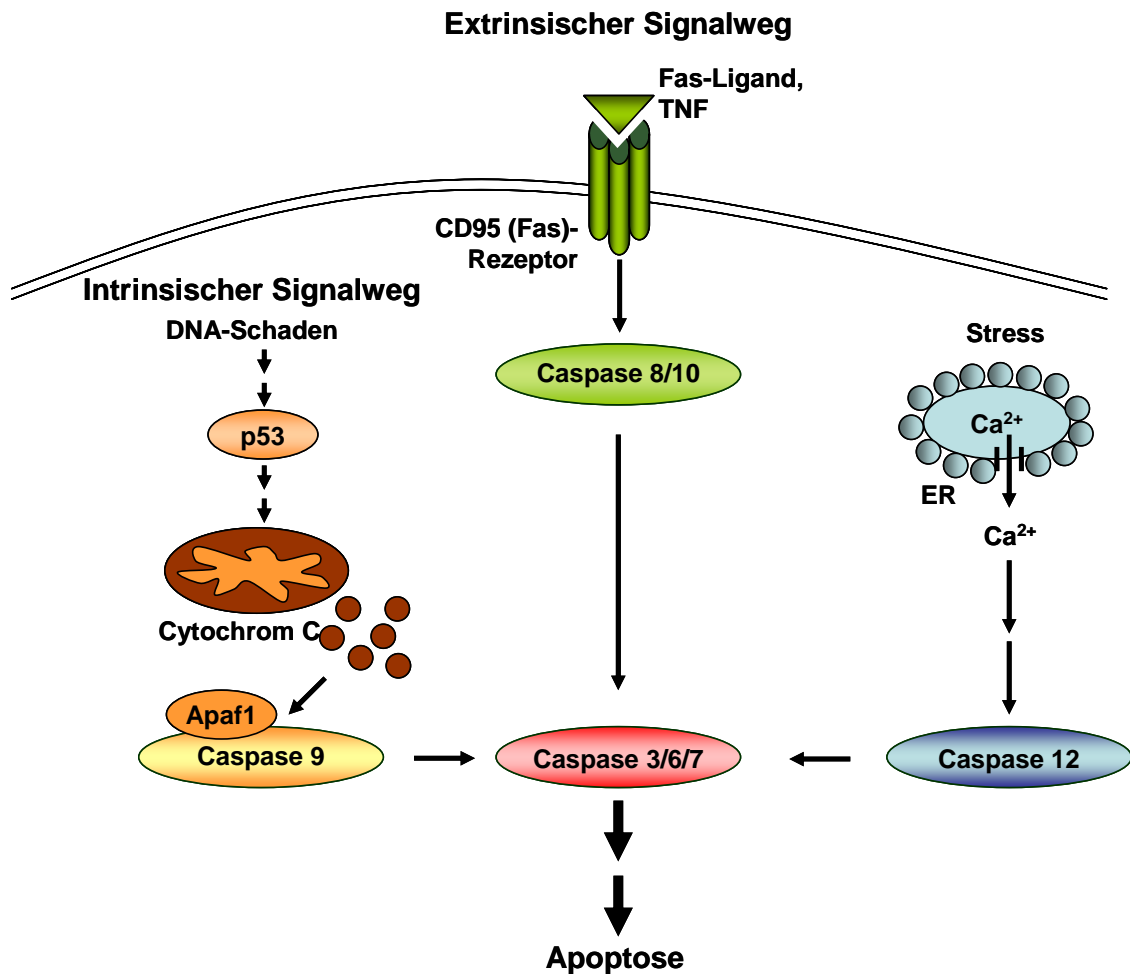
**Abbildung 22:** Struktur der Caspase-3 [Cohen, 1997]. Die Aktivierung erfolgt durch Spaltung des N-terminalen Peptides am Aspartat ( $\text{Asp}^{28}$ ) und in der konservierten Region an  $\text{Asp}^{175}$ . Die aktive Caspase besteht aus zwei großen und kleinen Untereinheiten. Das aktive Zentrum wird durch zwei verschiedene Untereinheiten zweier Moleküle gebildet (gekennzeichnet durch den Pfeil).

Es sind mittlerweile einige Caspasesubstrate charakterisiert, die aufgrund ihrer Funktion in verschiedene Klassen eingeteilt werden.

- Procaspasen [Ho und Hawkins, 2005]
- Pro- und antiapoptotische Proteine (z. B. Bax, Bid, Bcl-x<sub>1</sub>) [Cory und Adams, 2002]
- Strukturproteine (z. B. Lamin) [Brodie und Blumberg, 2003; Herzog et al, 2004]
- Elemente von Signaltransduktionskaskaden und DNA-Reparaturmechanismen (z. B. p21 aktivierende Kinase (PAK), PKC $\delta$  oder Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP)) [Pieper et al, 1999; Chan et al, 2000; Creda et al, 2001]

Apoptose kann durch drei Wege induziert werden (Abbildung 23) [Cohen, 1997; Kraus, 2003]:

1. Intrinsisch durch Anregung von Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom C durch z. B. DNA-Schädigung
2. Extrinsisch durch Aktivierung von Transmembranrezeptoren z. B. CD95 (Fas oder APO-1), aus der Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren
3. Aktivierung der Caspase-12 durch stressvermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum



**Abbildung 23:** Schematische Darstellung der drei Signalwege der Apoptoseinduktion: Extrinsisch, intrinsisch und stressvermittelt; [modifiziert nach Kraus, 2003]. Apaf-1, Adaptorprotein;  $Ca^{2+}$ , Kalzium; CD95, Transmembranrezeptor der Superfamilie der TNF-Rezeptoren; ER, endoplasmatisches Retikulum; p53, Tumorsuppressorgen/-protein; TNF, Tumornekrosefaktor.

### Intrinsischer Signalweg

Das apoptotische Signal wird durch proapoptische Proteine, wie z. B. Bax oder Bak, zum Mitochondrium geleitet. Dabei translozieren die Proteine vom Zytosol an die äußere Membran des Mitochondriums und es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C. Der exakte Mechanismus der Cytochrom C-Freisetzung ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass durch Oligomerisierung der Bax/Bak-Proteine eine „Pore“ in der Mitochondrienmembran entsteht, durch die Cytochrom C ins Zytosol translozieren kann [Cohen, 1997; Cryns und Yuan, 1998; Crompton, 1999]. Dort kommt es zur Ausbildung eines Komplexes, bestehend aus Cytochrom C, dem Adaptorprotein Apaf-1, ATP und der Procaspase-9 (Apoptosom). Aus diesem Komplex wird proteolytisch die Caspase-

9 freigesetzt. Die Caspase-9 induziert wiederum die proteolytische Spaltung der Procaspase-3 in die Effektorcaspase-3. Außer Cytochrom C werden noch weitere apoptoseinduzierende Proteine (apoptoseinduzierender Faktor (AIF), Endonukleasen und Smac/Diablo-Proteine) aus dem Mitochondrium freigesetzt [Cohen, 1997; Cryns und Yuan, 1998].

### **Extrinsischer Signalweg**

Der extrinsische Signalweg wird aktiviert durch Ligandenbindung an Transmembranrezeptoren (z. B. Fas/CD95) der Superfamilie von TNF-Rezeptoren [Schulze-Osthoff et al, 1998]. Nach Ligandenbindung an den CD95-Rezeptor kommt es zur Ausbildung des „apoptoseinduzierenden Signalkomplexes“ (DISC) bestehend aus einem CD95-Rezeptor-Trimer und Adaptermolekülen (z. B. FADD: „Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne“). Dieser führt direkten Aktivierung von Caspase-Kaskaden [Cohen, 1997; Cryns und Yuan, 1998; Schulze-Osthoff, 1998]. Daneben existiert auch ein extrinsischer Signalweg der Apoptose über Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien induziert. Dabei aktiviert die Caspase-8 proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (z. B. Bid), was wiederum, über einen noch unbekanntem Mechanismus die Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium verursacht [Schulze-Osthoff et al, 1998; Zhang et al, 2005].

## 2.5 Polyphenole

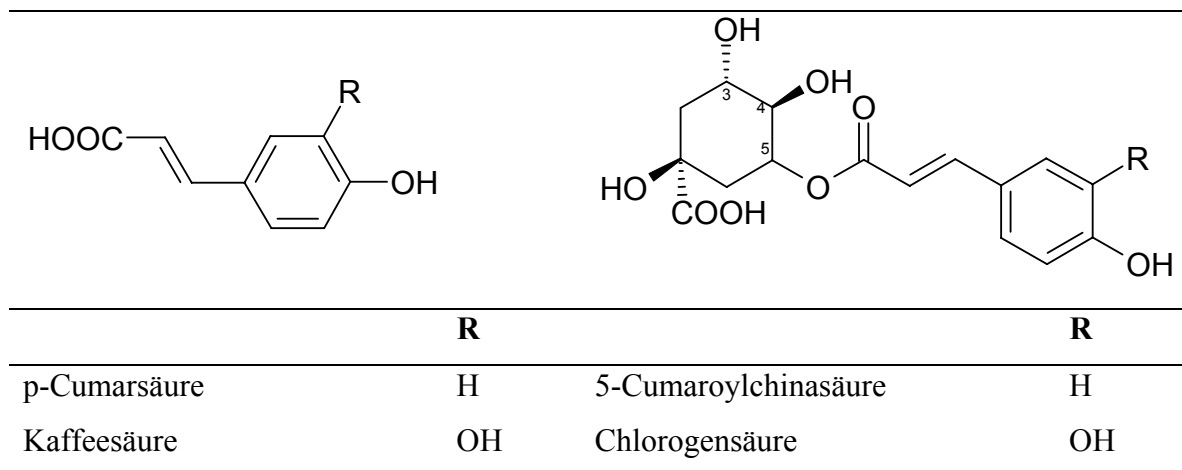
Polyphenole sind weit verbreitete sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Sie dienen der Pflanze unter anderem als Schutz gegen Pilz- und Bakterienbefall sowie als Signalsubstanz. In vielen Obst- und Gemüsearten tragen die Polyphenole zu Geschmack und Aussehen bei. Äpfel beinhalten Polyphenole der Gruppen:

- Phenolcarbonsäuren: Hydroxyzimtsäuren (Kapitel 2.5.1)
- Flavonoide (Kapitel 2.5.2)
- Dihydrochalkone (Kapitel 2.5.2)

Die Polyphenole sind wie folgt in den Kompartimenten des Apfels verteilt: Die Flavonolglykoside des Quercetins (Kapitel 2.5.1.3) und die Anthocyane sind fast ausschließlich in der Schale zu finden. Die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin und deren Oligomere, die Procyanidine (Kapitel 2.5.1.3), kommen hauptsächlich in der Schale vor, sind jedoch zu geringeren Anteilen auch im Parenchym und Kerngehäuse vorhanden. Chlorogensäure (Kapitel 2.5.1) und Phloretin glykoside (Kapitel 2.5.1.3) befinden sich im Kerngehäuse und im Fruchtfleisch [Thielen et al., 2004].

### 2.5.1 Hydroxyzimtsäurederivate

In der Abbildung 24 sind die Strukturen in Äpfeln und Apfelsaft vorkommender Hydroxyzimtsäuren dargestellt [van der Sluis et al, 2002; Thielen et al, 2004; Schäfer et al, 2006]. Hydroxyzimtsäuren liegen in der Pflanze meist mit organischen Säuren und Kohlenhydraten verestert vor [Herrmann, 1989]. Die Chlorogensäure, ein Ester aus Kaffeesäure und L-Chinasäure, und ihre beiden Stellungsisomere, die Neo- und Kryptochlorogensäure (nicht gezeigt), sind ubiquitär vorkommende Phenolcarbonsäuren in Früchten [Watzl und Reckemmer, 2001]. Im Apfelsaft stellt die Chlorogensäure sogar das mengenmäßig wichtigste Polyphenol dar [van der Sluis et al, 2002; Thielen et al, 2004; van der Sluis et al, 2004]. Phenolcarbonsäuren kommen meist in den Randschichten der Pflanzen vor und tragen zur Stabilität der Zellwände in den Schalen bei. Die biologischen Wirkungen der Hydroxyzimtsäuren werden mit den biologischen Wirkungen der Flavonoide in Kapitel 2.5.2.1 zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 24:** Strukturen ausgewählter Hydroxyzimtsäurederivate

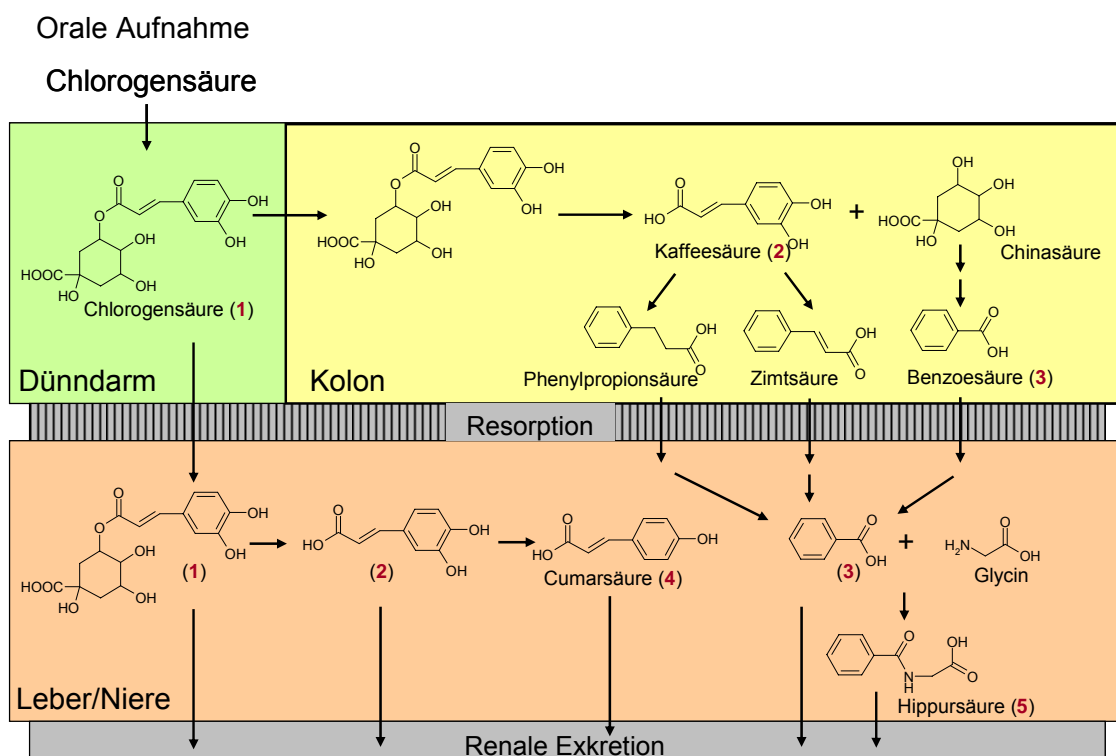
### 2.5.1.1 Bioverfügbarkeit

Nicht veresterte Hydroxyzimtsäuren, wie z. B. die Kaffeesäure, werden im Dünndarm und im Dickdarm resorbiert. Kaffeesäure konnte über einen Zeitraum von 90 min im menschlichen Plasma nach der Aufnahme von 1,1 l Apfelwein nachgewiesen werden, jedoch in sehr geringen Konzentrationen [DuPont et al, 2002]. Nach oraler Gabe von Kaffeesäure an Ratten konnte auch freie Kaffeesäure im Plasma detektiert werden, jedoch in einer um einen Faktor zehn niedrigeren Konzentration als die entsprechenden Metabolite (Glukuronide, Sulfate und Ferulasäure) [Azuma et al, 2000]. Diese Versuche sprechen für eine schnelle Resorption und Metabolisierung von Kaffeesäure.

Bei Ileostomapatienten konnte 67 % der aufgenommenen Chlorogensäure und 5 % der Kaffeesäure im Ileostomabeutel nachgewiesen werden [Olthof et al, 2001]. Nach Gabe von Apfelsaft an Ileostomapatienten wurden ebenfalls Anteile von Chlorogensäure (10,2 %) in der Ileostomaflüssigkeit wieder gefunden, jedoch keine Kaffeesäure [Kahle et al, 2005], was auf eine vorwiegende Resorption der Kaffeesäure im Dünndarm hinweisen würde.

Im Gegensatz zur Kaffeesäure scheinen 50 % oral aufgenommener Chlorogensäure intakt den Dünndarm zu passieren [Azuma et al, 2000]. Deshalb wird eine Metabolisierung der Ester von Hydroxyzimtsäuren durch Esterasen der Dickdarmmikroflora mit anschließender Resorption im Dickdarm postuliert. *Escherichia coli*, *Bifidobacterium lactis* sowie *Lactobacillus gasseri* wurden als Dickdarmbakterien charakterisiert, die z. B. die Chlorogensäure hydrolysieren können [Couteau et al, 2001]. Das Spaltprodukt der Chlorogensäure, die Kaffeesäure (Abbildung 25) wird dann im Dickdarm als Benzoessäure resorbiert [Azuma et

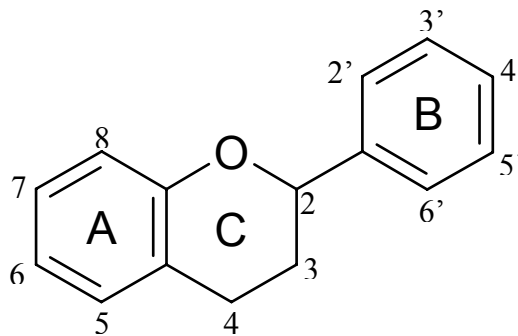
al, 2000]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass nur 0,3 % der aufgenommenen Chlorogensäure im Urin in Form von freier Kaffeesäure wieder ausgeschieden werden [Olthof et al, 2001], was auf eine weitere Metabolisierung hinweist. In einer weiterführenden Studie konnten Olthof et al. [2003] zeigen, dass Chlorogensäure durch die Mikroflora des Kolons zur Hippursäure (Abbildung 25) metabolisiert wird. Mit Chlorogensäure gefütterte Ratten scheiden ebenfalls nur einen geringen Anteil an Chlorogensäure und Kaffeesäure mit dem Urin wieder aus. Als Hauptausscheidungsprodukte nach Chlorogensäureaufnahme konnten auch bei dieser Studie Hippursäure und des Weiteren m-Cumarsäure (Abbildung 25) detektiert werden [Gonthier et al, 2003].



**Abbildung 25:** Postulierter Metabolismus nach oraler Aufnahme von Chlorogensäure modifiziert nach [Olthof et al, 2003]. Als Hauptausscheidungsprodukte wurden m-Cumarsäure (4) und Hippursäure (5) identifiziert.

### 2.5.2 Flavonoide

Flavonoide sind ubiquitär vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Das lateinische Wort flavus = gelb weist darauf hin, dass die meisten Flavonoide in ihrer reinen Form von gelblicher Farbe sind. Flavonoide besitzen ein gemeinsames 2-Phenylchromangrundgerüst, das Flavan (Abbildung 26). Es besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C).

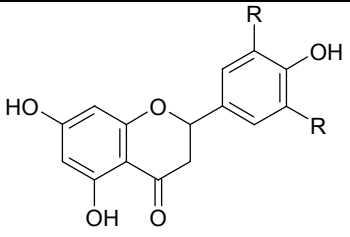
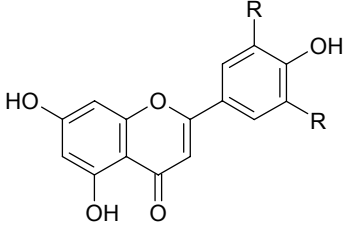
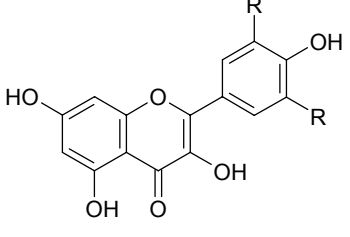
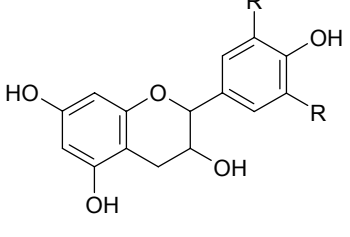
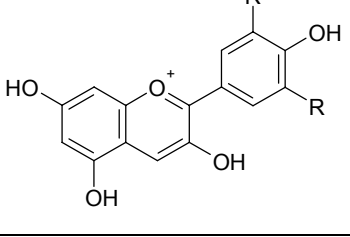
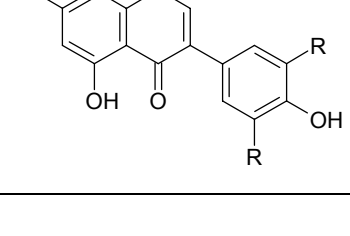


**Abbildung 26:** Struktur des Flavans (2-Phenylchromangrundgerüst)

Aufgrund des Hydroxylierungs- und Oxidationsgrades des C-Ringes können die Flavonoide in die sechs Gruppen der Flavonole, Flavone, Flavanone, Flavan-3-ole, Anthocyanidine und Isoflavone (Tabelle 4) aufgeteilt werden. Mittlerweile sind ca. 8000 verschiedene Strukturen charakterisiert worden. In der Natur liegen die meisten Flavonoide jedoch nicht in freier Form als Aglyka, sondern als Flavonoidglykoside vor [Harborne, 1986]. Bevorzugt ist die Hydroxygruppe in C-3-Position der Flavonoide glykosyliert. Daneben kommen auch C-5, C-7- und C-4'-Glykoside vor. Meist sind die Zucker Glukose, Galaktose, Rhamnose, Xylose oder Arabinose  $\beta$ -glykosidisch mit dem Aglykon verknüpft. Glykosylierungen erhöhen die Polarität der Flavonoide, was entscheidend für deren Speicherung in den Vakuolen der Pflanzen ist [Aherne und O'Brien, 2002]. Flavonoide bieten der Pflanze Schutz vor äußeren schädlichen Einflüssen (Pathogene, Fäulnisorganismen, UV-Strahlung, oxidativer Stress). Die höchsten Konzentrationen der Flavonoide befinden sich aufgrund der UV-abhängigen Bildung in den äußeren Blättern der Pflanzen oder in den Schalen in Samen von Früchten. [Scalbert et al, 1999; Aherne und O'Brien, 2002]. Der Flavonoidgehalt von Pflanzen und den aus ihnen resultierenden Lebensmitteln ist abhängig von äußeren Faktoren, wie z. B. Standort, Reifegrad, Lichteinfluss und Temperatur sowie von Lese-, Lager und Verarbeitungsbedingungen [Aherne und O'Brien, 2002].



**Tabelle 4:** Übersicht über die Hauptgruppen der Flavonoide [Watzl und Rechkemmer, 2001]

Flavonoidgruppe	Struktur	Vorkommen
<b>Flavanone</b>		Zitrusfrüchte
<b>Flavone</b>		Sellerie Paprika
<b>Flavonole</b>		Äpfel Zwiebeln
<b>Flavan-3-ole</b>		Grüntee Kakao
<b>Anthocyanidine</b>		Beeren Rotwein
<b>Isoflavone</b>		Sojabohne Sojaerzeugnisse

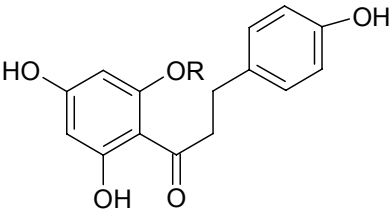
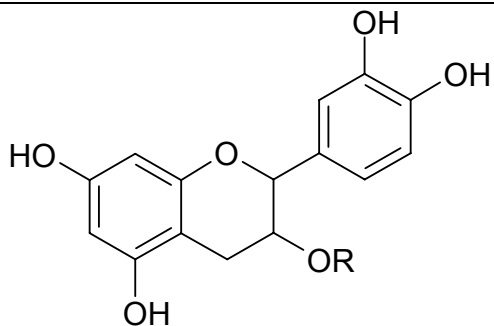
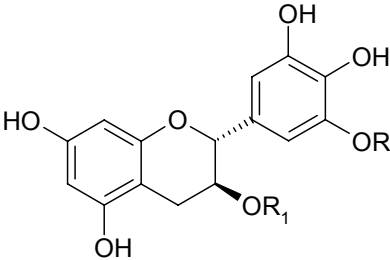
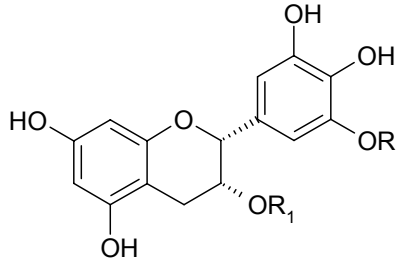
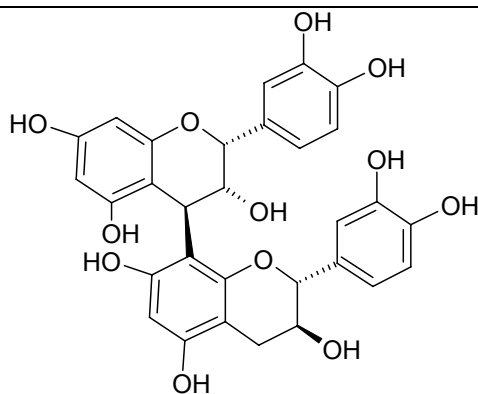
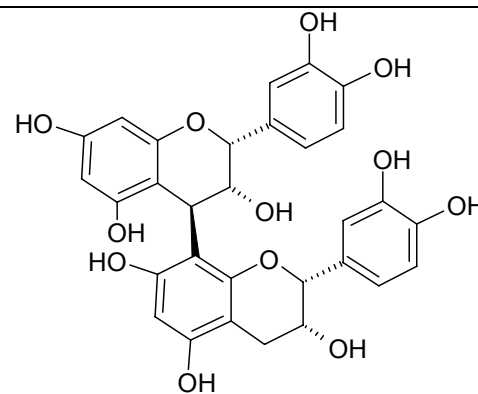
Innerhalb der Flavonoide sind die Flavonole die mengenmäßig dominante Stoffgruppe in Früchten [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Die Hauptvertreter dieser Klasse sind Quercetin (Kapitel 2.5.2.1) und Kämpferol. Flavone (z. B. Luteolin und Apigenin) liegen nur in wenigen Nahrungspflanzen, wie z. B. Kräutern vor [Hertog et al, 1993]. Zitrusfrüchte enthalten hauptsächlich Flavanone, wie z. B. Naringenin und Hesperetin. Flavanone sind meist an Position C-7 mit einem Disaccharid glykosyliert, welches im Fall von Naringin für den bitteren Geschmack der Grapefruit verantwortlich ist [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Orangensaft enthält zwischen 200 - 600 mg/l Hesperidin [Tomas-Barberan et al, 2001]. Genistein und Daidzein gehören zur Klasse der Isoflavone (Tabelle 4). Sie kommen insbesondere in Sojabohnen (580-3800 mg/kg Frischgewicht) und den daraus hergestellten Produkten vor [Cassidy, 2003]. Catechine sind Flavan-3-ole in monomerer Form; als Polymere werden sie als Procyanidine bezeichnet. (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (EC) sind vorwiegend in Früchten (Kapitel 2.5.2.1), (-)-Epigallocatechin (EGC) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) dagegen sind in grünem Tee zu finden [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Anthocyanidine stellen die größte Gruppe an wasserlöslichen Farbpigmenten mit dem Farbspektrum rot-blau-schwarz dar [Hou, 2003; Watzl et al, 2002]. Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden weisen Anthocyanidine bei saurem pH-Wert eine positive Ladung am C-Ring auf (Tabelle 4) [Hou, 2003]. Verzehrt werden Anthocyane, die Glykoside der Anthocyanidine, hauptsächlich über Rotwein und rote Beeren sowie über bestimmte Blatt- und Wurzelgemüse (Auberginen, Kohl, Bohnen, Zwiebeln, Radieschen) [Kahkonen und Heinonen, 2003]. Heidelbeeren enthalten bis zu 420 mg Anthocyane /100 g Frischgewicht [Watzl et al, 2002; Kahkonen und Heinonen, 2003]. In der Schale von roten Äpfeln können bis zu 100 mg/100 g Frischgewicht enthalten sein, dagegen ist der Gehalt bezogen auf den Gesamtpfel mit 10 mg/100 g Frischgewicht eher gering [Kahkonen et al, 2001]. Aufgrund der großen strukturellen Vielfalt der Flavonoide und dem breiten Spektrum an Daten zur biologischen Wirksamkeit wird im folgenden Kapitel 2.5.2.1 schwerpunktmäßig auf die Flavonoide und Dihydrochalkone des Apfels eingegangen.

### 2.5.2.1 Flavonoide und Dihydrochalkone des Apfels

Äpfel zählen mit zu den wesentlichen Flavonoidquellen in den westlichen Industrieländern. In den USA werden bis zu 22 % der Gesamtflavonoidmenge durch Äpfel aufgenommen, wobei hier der Konsum von flavonoidreichen Nahrungsergänzungsmitteln nicht berücksichtigt wurde [Vinson et al, 2001]. In Finnland sind Äpfel und Zwiebeln die Hauptquelle für Flavonoide; in den Niederlanden stehen Apfelpolyphenole an dritter Stelle hinter den Flavonoiden aus Tee und Zwiebeln [Hertog et al, 1993; Knekt et al, 1997]. In Deutschland ist der Apfelsaft das meist konsumierte Fruchtgetränk mit 12,8 l pro Kopf im Jahr [Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie, 2004]. Der Pro-Kopf-Verbrauch an Äpfeln liegt in Deutschland bei 17 kg; wird der Apfelsaft mit einbezogen, steigt der Verbrauch auf über 30 kg [<http://www.bgbm.fu-berlin.de>]. Der Gesamtpolyphenolgehalt von Äpfeln kann bis zu 2 g/kg Frischgewicht betragen [Scalbert und Williamson, 2000].

In den untersuchten polyphenolreichen Apfelextrakten AE01, AE02, AE03B und AE04 (Kapitel 6.1), die aus Apfelsäften verschiedener Sorten, Jahrgänge und durch unterschiedliche Herstellungsverfahren gewonnen wurden, konnten Dihydrochalkone und Flavonoide aus den Klassen der Flavonole und der Flavan-3-ole sowie deren Dimere, die Procyanidine B1 und B2, identifiziert werden (Tabelle 9; Abbildung 27). Das Flavonol Quercetin kommt als freies Aglykon nicht in Äpfeln vor, sondern als Quercetinglykosid in Konzentrationen von 2 – 26 mg/100 g Frischgewicht im Bezug auf das Aglykon [Hertog et al, 1993; Justesen et al, 1998; McGhie et al, 2005]. Die Quercetinglykosidkonzentrationen im Apfelsaft variieren stark mit der Apfelsorte. So werden im Apfelsaft aus reinen Tafeläpfeln nur geringe Gehalte bis zu 5 mg/l beschrieben [Hertog et al, 1993, van der Sluis et al, 2004], wohingegen in Apfelsäften aus Mostapfelsorten Gehalte an Quercetinglykosiden bis 27 mg/l gefunden wurden [Kahle et al, 2005]. Die tägliche Gesamtaufnahme von Flavonolen wird auf 7 - 35 mg/Tag geschätzt [Sampson et al, 2002; Hertog et al, 1993, Knekt et al, 2002]. Flavan-3-ole kommen in der Nahrung als Monomere, Oligomere und Polymere vor. Von den Monomeren, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sind keine Glykoside beschrieben [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Sie können jedoch mit einem Gallatrest in 3-Position ((-)-Epicatechingallat (ECG), EGCG) verknüpft sein. Äpfel enthalten in etwa 100 mg Flavan-3-ole/kg Frischgewicht [van der Sluis et al, 2004]. Der Gehalt von dunkler Schokolade liegt mit 500 mg Flavan-3-ole/kg deutlich höher. Die tägliche Aufnahme wird auf 17,1 -

38,6 mg monomere Flavan-3-ole in den USA geschätzt [Lakenbrink et al, 2000]. Procyanidine sind Oligomere (bis zu  $n = 48$ ) der Catechine, verbunden über C-4 und C-8 (oder C-6) [Gu et al., 2003]. Sie sind mit entscheidend für Geschmack und Astringenz von Tee, Wein und Fruchtsäften [Tsao et al, 2003; Gu et al., 2003]. Der Procyanidingehalt von Äpfeln ist abhängig von der Sorte und variiert von 70 – 150 mg/100 g Frischgewicht [Tsao et al, 2003]. Die höchsten Procyanidinkonzentrationen befinden sich in den Apfelschalen [Kahle et al, 2005]. Das Flavan-3-ol-Dimer Procyanidin B1 und das Monomer EC sind als Hauptflavan-3-ole des Apfels beschrieben [Tsao et al, 2003]. Die tägliche Aufnahmemenge an Monomeren sowie an Dimeren und Trimeren Flavan-3-olen wird insgesamt auf 18 - 50 mg/d geschätzt [Gu et al, 2003]. Ein charakteristischer Apfelinhaltsstoff ist das Phloretinlukosid Phloridzin [Guyot et al, 2003; Thielen et al, 2004]. Phloridzin und das korrespondierende Aglykon Phloretin gehören zur Gruppe der Dihydrochalkone. Phloridzin befindet sich hauptsächlich in der Apfelschale (80 - 420 mg/kg), aber auch im Fruchtfleisch (16 - 20 mg/kg) [Escarpa und Gonzalez, 1998]. Der Phloridzingeht von Apfelsaft beträgt zwischen 5 - 40 mg/l [Guyot et al, 2003; Suárez et al, 2005].

Dihydrochalkone			Flavonole		
					
	<b>R</b>			<b>R</b>	
Phloretin	H		Quercetin	H	
Phloridzin	$\beta$ -D-glc		Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	$\beta$ -D-glc	
			Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	$\beta$ -D-gal	
			Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	$\beta$ -L-rha	
			Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	$\beta$ -L-rha- $\beta$ -D-glc	
Flavon-3-ole					
					
	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>		<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>
(+)-Catechin	H	H	(-)-Epicatechin	H	H
			(-)-Epicatechingallat	H	Gallat
			(-)-Epigallocatechin	OH	H
			(-)-Epigallocatechingallat	OH	Gallat
Procyanidine					
					
	Procyanidin B1 (-)-Epicatechin (4 $\beta$ →8)-(+)-Catechin			Procyanidin B2 (-)-Epicatechin (4 $\beta$ →8)-(-)-Epicatechin	

**Abbildung 27:** Flavonoide des Apfelsaftextraktes AE02 sowie einige strukturverwandte Verbindungen (Epigallocatechin, Epicatechingallat und Epigallocatechingallat)

### 2.5.2.2 Bioverfügbarkeit von Flavonoiden und Dihydrochalkonen

Die gesundheitsfördernden, wie auch die möglichen negativen Effekte der Flavonoide (Kapitel 2.5.2.4) sind abhängig von der Aufnahme und der systemischen Verteilung. Die Datenlage zur Resorption und Biotransformation von Polyphenolen im Dünndarm ist insgesamt limitiert.

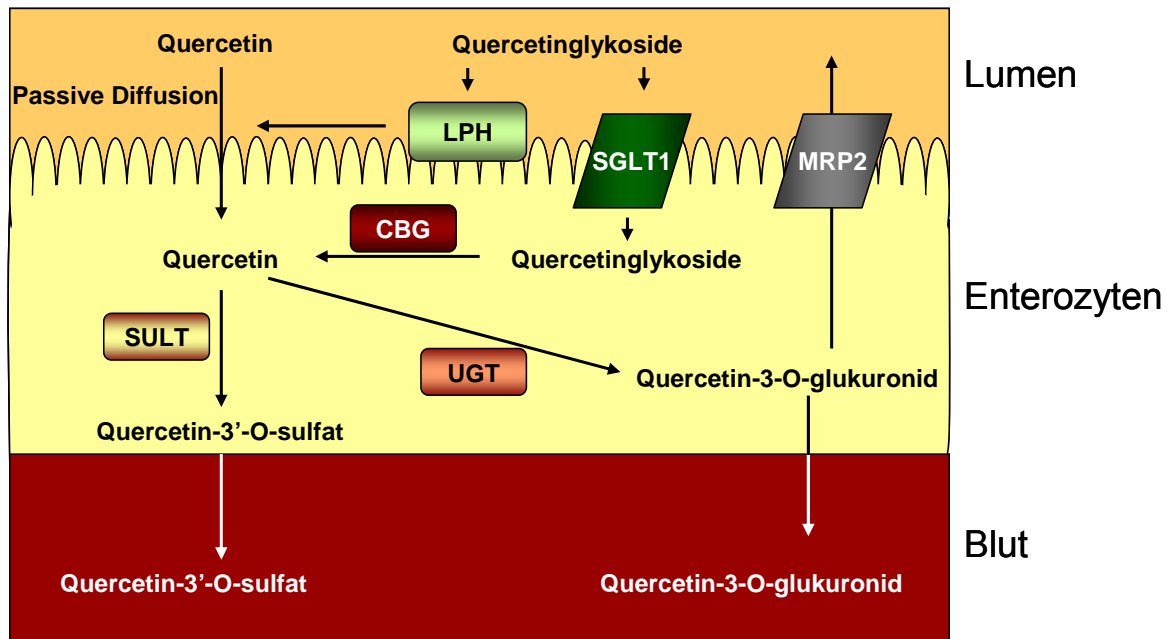
Flavonole sind die vorwiegend untersuchten Flavonoide. Hollman et al [1995] konnten an Ileostomapatienten zeigen, dass Quercetinglykoside aus Zwiebeln zu 52 % im Dünndarm resorbiert werden, wohingegen das Aglykon mit 24 % und das Quercetindiglykosid Rutin mit nur 17 % eine geringere Resorptionsrate aufweisen. Nach Apfelsaftaufnahme konnten nur Quercetin-3-O-arabinosid und -rhamnosid in der Ileostomaflüssigkeit detektiert werden [Kahle et al, 2005]. Außerdem wurden bei Ileostomapatienten Resorptionsraten von Quercetin bis zu 81 % nach postulierter Hydrolyse von Quercetinglykosiden durch  $\beta$ -Glukosidasen beschrieben [Walle et al, 2000].

In der Literatur werden verschiedene Wege zur Resorption von Flavonolen diskutiert (Abbildung 28). Das Enzym Lactat-Phloridzin-Hydrolase (LPH), eine  $\beta$ -Glukosidase, welche in der Bürstensaummembran der Dünndarmepithelzellen lokalisiert ist, soll die Spaltung von Flavonolglykosiden in die entsprechenden Aglyka katalysieren. Die Aglyka werden dann über passive Diffusion aufgenommen [Day et al, 2000]. Ein alternativer Weg wäre die Resorption der Flavonolglykoside über den natriumabhängigen Glukosetransporter SGLT1. Die resorbierten Glykoside würden dabei anschließend durch zytosolische  $\beta$ -Glukosidasen (CBG) hydrolysiert werden [Gee et al, 2000]. Jedoch wurde ein Transport von Quercetinglykosiden durch Glukosetransporter nur *in vitro* gezeigt [Walgren et al, 2000; Wolfram et al, 2002]. Der dritte diskutierte Mechanismus gilt für Flavonole, die keine Substrate der LPH und CBG sind, wie z. B. Rutin. Die Resorption erfolgt nach Deglykosylierung durch bakterielle  $\beta$ -Glykosidasen und Rhamnosidasen im Kolon [Hollman et al, 1999].

Quercetinglykoside aus Zwiebeln werden aufgrund ihrer Zuckerreste (hauptsächlich Quercetin-3-glukosid) effizienter resorbiert als Quercetinglykoside aus Äpfeln (Rhamosen, Rutinosen etc.) oder Quercetinsupplementen [Hollman et al, 1997]. Dies deutet darauf hin, dass der Zuckerrest sowie die Matrix eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit spielen

[Hollman et al, 1999; Graefe et al, 2001]. Im Gegensatz dazu scheint die Position des Zuckerrestes für die Resorption von geringerer Bedeutung zu sein. Die Resorptionsrate des 3-Glukosids und 4'-Glukosids von Quercetin bei humanen Probanden erwies sich als identisch [Olthof et al, 2000]. Jedoch wurden in Humanstudien interindividuelle Unterschiede in den Resorptionsraten detektiert, die wahrscheinlich durch Polymorphismen von intestinalen Enzymen und Transportern, sowie durch die individuelle Zusammensetzung der Mikroflora der Probanden zu erklären sind [Graefe et al, 2001; Kahle et al, 2005].

Nach Resorption aus dem Magen/Darmtrakt liegt Quercetin hauptsächlich in Form seiner Metabolite im Plasma vor. Beteiligt an der Metabolisierung von Quercetin sind die Phase II-Enzyme UDP-Glukuronyltransferase (UGT), Catechol-O-methyltransferase (COMT) und Sulfotransferase (SULT) [Scalbert und Williamson, 2000]. Als Hauptmetabolite des Quercetins konnten Quercetin-3-O-glukuronid, 3'-O-methylquercetin-3-O-glukuronid und Quercetin-3'-O-sulfat im humanen Plasma nach dem Verzehr von Zwiebeln identifiziert werden [Day et al, 2001]. 20 - 40 % des aufgenommenen Quercetins liegen an der 3'-Position methyliert vor [Olthof et al, 2000; Day et al, 2001]. In der Literatur ist wenig über die Verteilung der Quercetinmetabolite beschrieben. Die Metabolite scheinen an Albumin zu binden und werden so über das Blut zur Leber transportiert [Manach et al, 1995]. Für eine starke Albuminbindung der Metabolite und eine Akkumulation im Plasma spricht auch ihre hohe Halbwertszeit (11 - 28 h) [Kaldas et al, 2005]. Flavonoidglukuronide (Abbildung 28) und -sulfate sind polare, wasserlösliche Verbindungen, die über den Urin oder über die Galle ausgeschieden werden. Bei Exkretion durch die Galle wird ein Transport der Metabolite mit Hilfe des „multidrug-resistance associated protein“ (MRP2) in das intestinale Lumen postuliert, wo sie durch die humane Mikroflora erneut metabolisiert und über den enterohepatischen Kreislauf rückresorbiert werden könnten [Walgren et al, 2000].



**Abbildung 28:** Postulierte Mechanismen zur Resorption und des möglichen Metabolismus von Quercetin im Dünndarm, [modifiziert nach Boyer et al, 2005]. CBG, zytosolische  $\beta$ -Glykosidase; LPH, Lactat-Phloridzin-Hydrolase; MRP2, „multidrug-resistance associated protein“; SGLT1, Natrium-abhängiger Glukosetransporter; SULT, Phenol-Sulfotransferase; UGT, UDP-Glukuronyltransferase.

Humanstudien zur Bioverfügbarkeit der Flavan-3-ole wurden hauptsächlich mit Grüntee-catechinen und catechinreichen Schokoladen durchgeführt [Baba et al, 2000; Natsume et al, 2003; Roura et al, 2005]. Im Plasma von Probanden konnten nach Schokoladenverzehr EC, EC-Glukuronid, EC-sulfat, EGC, O-3'- und O-4'-Methyl-EGC sowie EGCG detektiert werden [Baba et al, 2000; Natsume et al, 2003; Roura et al, 2005]. EC und (+)-Catechin werden im Dünndarm O-methyliert und glukuronidiert [Kuhnle et al, 2000]. Im Gegensatz dazu wurden nach Apfelsaftgabe an Ileostomapatienten weder (+)-Catechin noch seine methylierten bzw. glukuronidierten Metabolite in der Ileostomaflüssigkeit detektiert [Kahle et al, 2005]. Durch Gabe von reinen Flavan-3-olen an Probanden konnte gezeigt werden, dass die galloylierten Flavan-3-ole EGCG und ECG im Vergleich zu den Flavan-3-olen ohne Galloylrest schlechter bioverfügbar sind [van Amelsvoort et al, 2001]. Monomere Catechine werden rasch mit dem Urin ausgeschieden ( $t_{1/2} = 1 - 7$  h) [van Amelsvoort et al, 2001]. Flavan-3-ole mit einem Galloylrest konnten bis jetzt nicht im Urin detektiert werden [van Amelsvoort et al, 2001; Lee et al, 2002]. Dieser Befund kann nicht durch eine Degalloylierung erklärt werden, da dieser Prozess beim Menschen nur eine untergeordnete



Rolle zu spielen scheint. Galloylderivate werden vermutlich durch eine Exkretion über die Galle ausgeschieden [van Amelsvoort et al, 2001].

Im Vergleich zu den monomeren Flavan-3-olen ist über die Bioverfügbarkeit der Procyanidine wenig bekannt. Aufgrund von *in vitro* Daten wird angenommen, dass Procyanidine während der Magen/Darmpassage in ihre Monomere und Phenolsäuren (Phenylpropionsäuren, Phenylelessigsäure, m-Hydroxybenzoesäure, usw.) abgebaut werden [Spencer et al, 2001; Holt et al, 2002]. Andererseits wurden intakte Procyanidine im Dünndarm nachgewiesen [Rios et al, 2002]. In der Ileostomaflüssigkeit von Patienten konnten jedoch nach Apfelsaftgabe keine Procyanidindimere detektiert werden, was dafür spricht, dass sie im Dünndarm resorbiert oder abgebaut werden [Kahle et al, 2005]. Möglicherweise sind die Procyanidine aufgrund von Proteinbindungen aber auch nicht mehr mit der verwendeten Analytik (HPLC-ESI-MS) detektierbar [Kahle et al, 2005]. Im Plasma wurden Procyanidindimere (Ratte und Mensch) und das Trimer C1 (Ratte) bereits nachgewiesen [Holt et al, 2002; Sano et al, 2003; Shoji et al, 2006]. Gehalte der postulierten Abbauprodukte der Procyanidine, wie beispielsweise der m-Hydroxyphenylpropionsäure oder der m-Hydroxybenzoesäure, konnten nach dem Verzehr procyanidinreicher Schokolade im Urin von Probanden detektiert werden [Rios et al, 2002]. Jedoch wurde der bakterielle Metabolismus nach Aufnahme von reinen Procyanidinen niemals untersucht. Eine *in vivo* Studie an Ratten konnte zeigen, dass der mikrobielle Abbau mit steigendem Oligomerisierungsgrad der Procyanidine abnimmt, was möglicherweise mit den antimikrobiellen Eigenschaften und/oder der Proteinbindungskapazität der Procyanidine zusammenhängt [Gonthier et al, 2003].

Die Dihydrochalkone Phloretin und Phloridzin werden größtenteils im Dünndarm resorbiert [Crespey et al, 2001]. Nach Phloridzininfusion an Ratten wurden im Plasma das Aglykon Phloretin sowie die Konjugate Phloretinglukuronid und -sulfat gefunden [Crespey et al, 2001]. Jedoch konnten nur geringe Mengen an unkonjugiertem Phloretin detektiert werden. Intaktes Phloridzin konnte im Plasma der Ratten nicht nachgewiesen werden, was auf eine Hydrolyse bei der Resorption und der Metabolisierung hinweist [Crespey et al, 2001]. Bei einer Studie an Ileostomapatienten konnten Phloretin und Phloretinglukuronide, jedoch kein Phloridzin in der Ileostomaflüssigkeit nach Apfelsaftgabe detektiert werden [Kahle et al, 2005].

### 2.5.2.3 Chemoprotektive Wirkungen von Flavonoiden

Epidemiologische Daten lassen vermuten, dass Apfelpolyphenole möglicherweise präventiv in Hinblick auf die Entstehung chronischer Erkrankungen wirken [Boyer und Liu, 2004].

So ergab die „Nurses Health“ Studie (77000 Frauen), dass ein hoher Obst- und Gemüseverzehr das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, um 21 % verringert. Im Gegensatz dazu zeigte die „Health Professionals' Follow-up“ Studie mit 47000 Männern keine Korrelation zwischen Flavonoidverzehr und Lungenkrebs [Feskanich et al, 2000]. In einer Fall-Kontroll-Studie auf Hawaii konnte hingegen gezeigt werden, dass der Verzehr von Zwiebeln und Äpfeln das Risiko von Lungenkrebs verringert [Le Marchand et al, 2000]. Die gleiche inverse Korrelation ergab eine Finnische Studie an 10000 Männern und Frauen [Knekt et al, 1997]. Hierbei waren Äpfel das einzige Nahrungsmittel, welches mit einem verminderten Risiko von Lungentumoren assoziiert wurde.

Die Beziehung zwischen der Catechinaufnahme und Krebs wurde unter anderem in der „Zutphen Elderly“ Studie untersucht. Dabei war Tee die Hauptcatechinquelle (87 %), während durch Äpfel nur ca. 8 % der Catechine aufgenommen wurden [Arts et al, 2001]. Die Studie zeigte, dass weder die Catechinaufnahme noch der Teekonsum mit einer verringerten Inzidenz für epithelialen Lungenkrebs assoziiert ist [Arts et al, 2001]. Weitere Daten aus der „Zutphen Elderly“ Studie ergaben die Korrelation zwischen Gemüse- und Obstverzehr und einer verringerten Krebsinzidenz, jedoch nur für Tumore des Respirationstraktes [Arts et al, 2001].

Die prospektive Kohortenstudien „Nurses Health“ Studie II ergab keinen Zusammenhang zwischen dem Apfelverzehr und einem verminderten Brustkrebsrisiko [Adebamowo et al, 2005].

Insgesamt lässt sich sagen, dass die epidemiologischen Daten zu einem verminderten Krebsrisiko durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe noch recht kontrovers diskutiert werden. Dagegen scheinen die Daten zu einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Tabelle 5) mittlerweile belegt zu sein. Dabei wurde vor allem eine verringerte Mortalitätsrate durch Herz-Kreislaufkrankungen mit einer hohen Flavonoidaufnahme assoziiert [Boyer und Liu, 2004].

**Tabelle 5:** Epidemiologische Daten zur Flavonoidaufnahme und dem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen

Studie	Ergebnis	Literatur
„Women’s Health“ Studie (~ 40000 Frauen)	Apfelaufnahme: 13 - 22 % weniger kardiovaskuläre Erkrankungen	Sesso et al, 2003
Finnische Kohortenstudie (62440 Personen)	Flavonoidaufnahme invers assoziiert mit Todesfällen durch Herz-Kreislaufkrankungen bei Frauen	Knekt et al, 1996
Studie mit 35000 Frauen in Iowa	Catechinaufnahme verringert die Todesrate durch kardiovaskuläre Erkrankungen	Arts et al, 2001
„Zutphen Elderly“ Studie	Flavonoidaufnahme korreliert mit einer verringerten Todesrate durch Herzerkrankungen	Hertog et al, 1993

#### 2.5.2.4 Biologische Wirkungen von Apfelpolyphenolen

Extrakte von Äpfeln und vor allem Apfelschalen werden als potente Antioxidantien und Inhibitoren des Wachstums von Tumorzelllinien *in vitro* beschrieben [Wolfe et al, 2003; Eberhardt et al, 2000; Liu et al, 2003, Gosse et al, 2005; Schäfer et al, 2005; Kern et al, 2005; Veeriah et al, 2006]. Die antioxidative Kapazität von 100 g Äpfeln entspricht ca. 1500 mg Vitamin C [Eberhardt et al, 2000; Boyer und Liu, 2004]. Da jedoch der Vitamin C-Anteil im Apfel recht gering ist, ist die antioxidative Wirkung der Äpfel sehr wahrscheinlich auf andere Inhaltsstoffe, wie z. B. die Polyphenole, zurückzuführen [Eberhardt et al, 2000]. Apfelextrakte erwiesen sich als potente Inhibitoren des Tumorzellwachstums *in vitro* (Tabelle 6). *In vivo* reduziert naturtrüber Apfelsaft im Gegensatz zum klaren Apfelsaft die Anzahl durch Dimethylhydrazin (DMH)-induzierten aberranten Krypten im distalen Kolon von Ratten [Barth et al, 2005]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Apfelprocyanidine die Anzahl an durch Azoxymethan (AOM)-induzierten hyperproliferierenden und aberranten Krypten im Kolon von Ratten verringert [Gossé et al, 2005].

Die präventive Wirkung von Apfelpolyphenolen wird im Zusammenhang mit antioxidativen, antikanzerogenen, antiviralen, antiallergenen, antiinflammatorischen und immunstimulierenden Eigenschaften diskutiert [Boyer und Liu, 2004]. Im folgenden Ab-

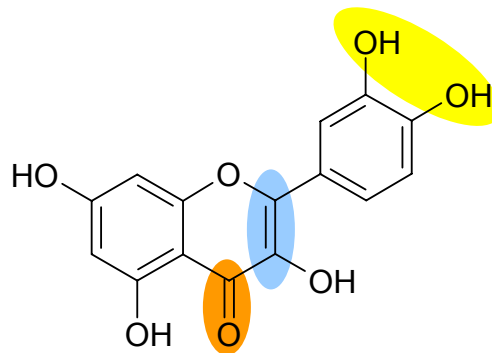
schnitt sind die umfangreichen biologischen Wirkungen, mit Schwerpunkt auf die antioxidativen und antikanzerogenen Eigenschaften, der in den Apfelsaftextrakten bislang identifizierten Polyphenole zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der wachstumshemmenden Eigenschaften von Apfelsaftextrakten a) 50 mg Apfelextrakt/ml, b) 20,5  $\mu$ M Apfelsaftextrakt AE02 bezogen auf den Gehalt an Phloridzin; <sup>1</sup>Apfelsorte nicht bekannt.

Zelllinie	Apfelsorte	Zellwachstumshemmung [%]	Literatur
CaCo-2 (Kolonkarzinom)	– <sup>1</sup>	43 % <sup>a)</sup>	Eberhardt et al, 2000
HT29 (Kolonkarzinom)	AE02 (Kapitel 6.1.2)	50 % <sup>b)</sup>	Veeriah et al, 2006
SW620 (Kolonkarzinom)	Antoinette	50 % <sup>a)</sup>	Gosse et al, 2005
HepG2 (Leberkarzinom)	Fuji	39 % <sup>a)</sup>	Liu et al, 2003  Wolfe et al, 2003 Sun et al, 2002
	Golden Delicious	57 % <sup>a)</sup>	
	„Northern Spy“	kein Effekt	
	Idared	~ 20 % <sup>a)</sup>	
	– <sup>1</sup>	50 % <sup>a)</sup>	

Im oxidativen Stoffwechsel eukaryontischer Zellen entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z. B. Hydroxyradikale ( $\cdot$ OH), Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Alkyl- bzw. Peroxyradikale ( $RO\cdot$  bzw.  $ROO\cdot$ ). Bei einem Übergewicht von prooxidativen Prozessen kann es zur Schädigung von Proteinen, Membranlipiden sowie der DNA kommen. Einige Krankheitsbilder, z. B. Alzheimer, Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen und Entzündungsprozesse werden mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht [Galli et al, 2005]. Polyphenole können *in vitro* oxidativen Stress durch verschiedene Mechanismen inhibieren, z. B. durch direktes Abfangen von ROS oder durch Komplexierung von Metallionen [van Acker et al, 1998; Kahkonen et al, 1999]. Für die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide (Quercetin) und Hydroxyzimtsäurederivate (Kaffeesäure und Chlorogensäure) ist eine Wasserstoff (H)-Abstraktion verantwortlich. Es wird dabei eine Semichinonstruktur des reaktionsträgen Phenoxyradikals erzeugt [Pietta, 2000; Moridani et al, 2001; Spencer et al, 2003]. Das Phenoxyradikal ist durch Elektronendelokalisation stabili-

siert. Durch eine weitere Elektronenübertragung geht es in eine stabile Chinonstruktur über [Pietta, 2000; Moridani et al, 2001; Spencer et al, 2003]. Bestimmte Strukturmerkmale der Flavonoide scheinen für die Ein-Elektronenübergänge von besonderer Bedeutung zu sein. So wird für eine Stabilisierung des Flavonoidradikals durch Elektronendelokalisation eine Catecholstruktur am B-Ring sowie eine Doppelbindung in C-2 – C-3-Position und eine 4-Oxogruppe am C-Ring vorausgesetzt (Abbildung 29) [Pietta, 2000]. Aus der Gruppe der Flavonole konnten Quercetin und einige seiner Metabolite (z. B. 3'-O-Methylquercetin) sowie das Flavan-3-ol EGCG als Hemmstoffe von Enzymen (NAD(P)H-Oxidase, Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen) identifiziert werden, die an der Bildung von ROS beteiligt sind [Morre et al, 2000; Jones et al, 2004; Hussain et al, 2005].



**Abbildung 29:** Struktur des Flavonols Quercetin. Farblich hinterlegt sind die Strukturmerkmale, die am antioxidativen Potential der Flavonoide maßgeblich beteiligt sind. Dabei ist vor allem die Catecholstruktur des B-Ringes (gelb) entscheidend. Weitere wichtige Merkmale sind die Doppelbindung (hellblau) und die Oxo-Gruppe (orange) am C-Ring [Spencer et al, 2003].

Bei Früchten korreliert die antioxidative Kapazität mit dem Polyphenolgehalt sowie der Polyphenolzusammensetzung [Chinnici et al, 2004; Tsao et al, 2005]. Vor allem die Flavan-3-ole und Procyanidine scheinen zur antioxidativen Wirkung von Früchten beizutragen [Van der Sluis et al, 2002; Tsao et al, 2005]. Die antioxidative Aktivität von Apfelpolyphenolen, gemessen mit der Folin-Ciocalteu-Methode, lässt sich wie folgt zusammenfassen: Quercetinglykoside = Flavan-3-ole/Procyanidine > Chlorogensäure > Phloretinglykoside [Lee et al, 2003; Chinnici et al, 2004; Tsao et al, 2005]. Im TEAC (Trolox-Äquivalente, antioxidative Kapazität) zeigen Rutin und Phloridzin die höchste antioxidative Aktivität gefolgt von (-)-Epicatechin [Lee et al, 2003; Schäfer et al, 2005]. Die

Hydroxyzimtsäuren Chlorogensäure und Kaffeesäure erweisen sich nur als marginal antioxidativ wirksam [Lee et al, 2003; Schäfer et al, 2005].

Viele der bislang durchgeführten Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von Quercetin wurden mit den Aglyka selbst, und nicht mit den in der Natur vorliegenden Glykosiden oder den humanen Stoffwechselkonjugaten (Sulfate und Glukuronide) durchgeführt. Nur wenige *in vitro*-Studien zeigen, dass Quercetinglukuronide antioxidative Wirkungen aufweisen, welche jedoch geringer als die des freien Quercetins sind [Morand et al, 1998; Manach et al, 1999; Miyake et al, 2000]. Dabei scheint auch die Position der Glukuronidierung von Bedeutung zu sein, da sich das 3-O-Quercetinglukuronid als der Metabolit mit dem höchsten antioxidativen Potential erwies [Moon et al, 2001]. In Humanstudien erwiesen sich bereits ein Traubenkernextrakt und ein roter Mehrfruchtsaft als antioxidativ wirksam [Vinson et al, 2002; Natella et al, 2002, Weisel et al, 2006].

Abhängig von ihrer Struktur modulieren Flavonoide selektiv die Aktivität und/oder Expression von Elementen (Tabelle 7) verschiedener Signaltransduktionskaskaden, wie z. B. PKC (Kapitel 2.2.3), EGFR (Kapitel 2.2.1.3), ERK1/2 (Kapitel 2.2.1.4), oder  $\beta$ -Catenin (Kapitel 2.2.2.2), die von besonderer Bedeutung für die Tumorenstehung sind.

**Tabelle 7:** Polyphenole als Inhibitoren ausgewählter Signalkettenelemente *in vitro*.

Enzym	Flavonoid	Literatur
<b>EGFR</b>	EGCG / ECG	Liang et al, 1997; Sah et al, 2004
	Quercetin	Lee et al, 2002; Kern et al, 2005
	Phloretin	Yang et al, 2001
	Kaffeesäure	Vacaresse et al, 2001
<b>ERK1/2</b>	Quercetin	Spencer et al, 2003; Moon et al, 2003
	EGCG	Chung et al, 2001; Masuda et al, 2001
	Apfelpolyphenole	Gossé et al, 2005
<b><math>\beta</math>-Catenin</b>	Quercetin	Park et al, 2005; van Erk et al, 2005
	EGCG	Dashwood et al, 2002 und 2005
<b>PKC</b>	Quercetin	Ferriola et al, 1989
	Phloretin	Kobori et al, 1999
	EGCG	Chen et al, 1999
	Apfelpolyphenole	Gossé et al, 2005

Des Weiteren wird noch die Aktivität einer Vielzahl von Enzymen beispielsweise PI3K, PKB, PKA oder humane Topoisomerasen durch Polyphenole moduliert [Ferriola et al, 1989; Liang et al, 1997; Agullo et al, 1999; Nguyen et al, 2004; Habermeyer et al, 2005]. Die entscheidenden strukturellen Merkmale für eine potente Hemmwirkung auf die Aktivität der PKC, PI3K und Topoisomerasen scheinen die Anzahl der Hydroxy-Gruppen am B-Ring, die Doppelbindung zwischen C-2- und C-3-Atom des C-Rings sowie die 4-Oxo-Gruppe und die 7-Hydroxygruppe am C-Ring zu sein (Abbildung 29) [Ferriola et al, 1989; Agullo et al, 1997].

Das Flavonol Quercetin und das Grüntee catechin EGCG gehören zu den meist untersuchten Flavonoiden im Hinblick auf die Modulation von zellulären Signalen. So konnte bislang gezeigt werden, dass Quercetin und EGCG das Wachstum von humanen Kolontumorzellen *in vitro* hemmen [Kuo et al, 1996; Chen et al, 2003; Veeriah et al, 2006]. Apfelpolyphenole, wie die Hydroxyzimtsäure Kaffeesäure oder EC, sind ebenfalls als Hemmstoffe *in vitro* beschrieben [Kern et al, 2005; Veeriah et al, 2006]. Des Weiteren induziert Quercetin Apoptose durch Aktivierung von Caspasen und Cytochrom C-Freisetzung in humanen Tumorzellen *in vitro* [Shen et al, 2003; Chen et al, 2003]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch Apfelprocyanidine einen entscheidenden Beitrag zur Apoptoseinduktion leisten [Gossé et al, 2005]. Ein procyanidinreicher Apfelsaftextrakt induzierte die Caspase-3-Aktivität in der humanen Kolontumorzelllinie SW620 [Gossé et al, 2005].

Eine Vielzahl der Flavonoide ist in der Lage, Tumorzellen im Zellzyklus zu arretieren. Quercetin arretiert humane Kolontumorzellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus [Casagrande und Darbon, 2001; Choi et al, 2001; Ong et al, 2004]. Im Gegensatz dazu greifen die im Apfelsaftextrakt vorliegenden Quercetinglykoside, Quercitrin (Q-3-rha) und Rutin, nicht in die Zellzyklusphasen ein, noch induzieren sie Apoptose in humanen Leukämiezellen *in vitro* [Shen et al, 2003]. Des Weiteren sind die Flavan-3-ole EGCG und ECG sowie die Cumar- und die Kaffeesäure *in vitro* als Zellzyklus-modulierend beschrieben [Tan et al, 2000; Hyun und Chung, 2004; Kampa et al, 2004; Nihal et al, 2005].

Erst in den letzten Jahren wurde begonnen, zusätzlich zu den Aglyka auch die signalmodulierenden Wirkungen von Flavonoidmetaboliten und Abbauprodukten (Kapitel 2.5.3) zu untersuchen. Aus diesem Grunde ist die Datenlage hierzu noch sehr begrenzt. Von den Metaboliten konnte bis jetzt nur das Quercetin-7-sulfat als Inhibitor des Wachstums von humanen Kolontumorzellen und die Quercetinglukuronide als Hemmstoffe des Wachstums von humanen Lungenkarzinomzellen identifiziert werden [Depeint et al, 2002; Yang et al,

2006]. Yoshizumi et al. [2002] konnten zeigen, dass das Quercetin-3-Glukuronid die Aktivität der stressinduzierbaren JNK-Kinase hemmt. Des Weiteren inhibieren Quercetin und Quercetin-3'-sulfat sowie Quercetin-3-glukuronid und 3'-Methylquercetin-3-glukuronid die Aktivität von Cyclooxygenasen *in vitro* [O'Leary et al, 2004].

Schwierig ist die Beurteilung zur gesundheitlichen Unbedenklichkeit der Flavonoide, da aufgrund der strukturellen Vielfalt dieser Substanzklasse sowie ihrer komplexen Metabolisierung bisher keine geeigneten Biomarker identifiziert werden konnten. Es gibt keine Hinweise für eine akute Toxizität flavonoidreicher Lebensmittel. Einige Polyphenole scheinen *in vitro* genotoxische und mutagene Eigenschaften zu besitzen, die *in vivo* bisher nicht belegt wurden [da Silva et al, 2002; Sakihama et al, 2002; Awad et al, 2002; Mennen et al, 2005]. Nur in einer *in vivo* Studie induzierte Kaffeesäure in hohen oralen Dosen (2 % im Futter) Tumore der Niere bei Mäusen und Ratten [Hagiwara et al, 1991]. Anhand epidemiologischer Studien konnte eine Assoziation zwischen frühkindlicher akuter myeloider Leukämie und einer erhöhten Exposition von Topoisomerase II-Giften aus der Nahrung während der Schwangerschaft postuliert werden [Ross et al, 1996]. Als Topoisomerasegifte sind das Flavonol Quercetin und das Grüntee catechin EGCG beschrieben. Diskutiert wird der Mechanismus einer Translokation im MLL1 Gen durch die Inhibierung humaner Topoisomerasen [Abe, 1999; Strick et al, 2000].

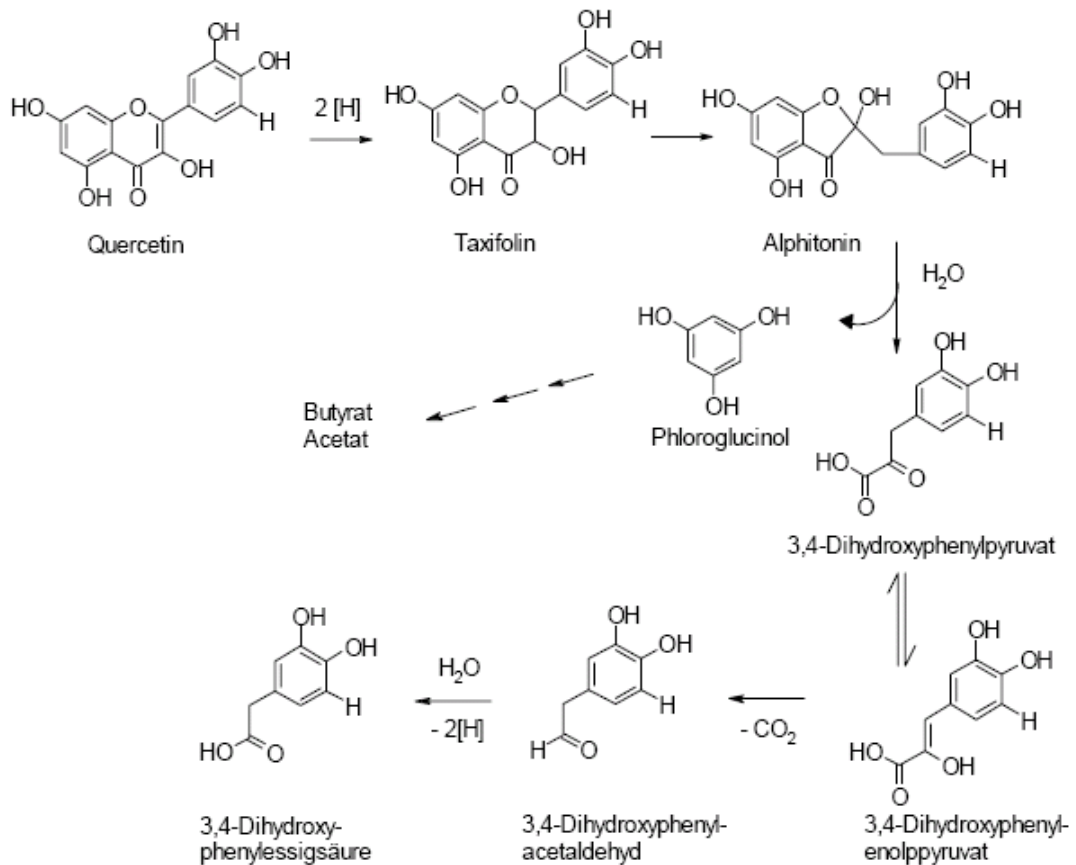
Die mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoidkonzentrationen sind jedoch meist um ein Vielfaches geringer, als die bei *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen eingesetzten Konzentrationen. Außerdem unterliegen Flavonoide zusätzlich einem starken Metabolismus, wobei die Datenlage zu möglichen biologischen Wirkungen der Metabolite bislang sehr begrenzt ist. Trotzdem ist zu beachten, dass vor allem durch Nahrungsergänzungsmittel hohe lokale Flavonoidkonzentrationen im Darm erreicht werden können, so dass *in vitro*-Untersuchungen zur zellulären Wirkmechanismen von Flavonoiden mit zur Nutzen/Risiko-Evaluierung beitragen.



### 2.5.3 Postulierte Flavonoidabbauprodukte

Die biologische Verfügbarkeit der Flavonoide ist für ihre physiologischen Funktionen von entscheidender Bedeutung. Jedoch ist die Resorption der Flavonoide sehr gering. Des Weiteren ist die Wiederfindungsrate an intakten Flavonoiden im Urin oder in der Fäzes marginal [Blaut et al, 2003]. Dies sind alles Hinweise für eine intensive Biotransformation der Flavonoide (Kapitel 2.5.1.1).

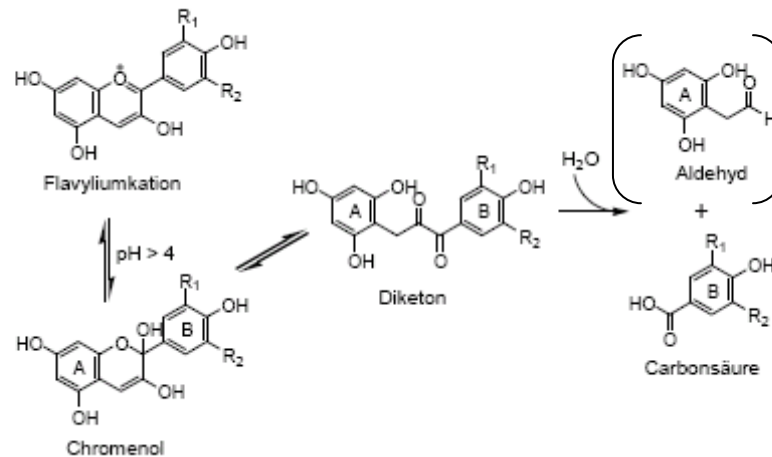
In der Literatur ist sowohl ein Zerfall der aufgenommenen Flavonoide durch den neutralen pH-Wert im Dünndarm, als auch ein intensiver Abbau durch die gastrointestinale Mikroflora beschrieben [Braune et al, 2001; Lin et al, 2003; Schoefer et al, 2003; Blaut et al, 2003]. Es wird angenommen, dass sich im humanen Dickdarm ca. 400 verschiedene Bakterienspezies mit einer Gesamtzahl von bis zu  $10^{13}$  Bakterienzellen befinden [Blaut et al, 2003]. 99 % der Bakterien im Gastrointestinaltrakt sind Anaerobier. Bislang konnten nur wenige anaerobe Bakterienstämme identifiziert werden, die einen Beitrag zum Abbau von Flavonoiden leisten [Blaut et al, 2003; Braune et al, 2005]. Durch Inkubation der Flavonoide mit humanen Mikroorganismen (*Eubacterium ramulus*, *Clostridium orbiscindens*, *Enterococcus casseliflavus*) wurden eine Reihe von Abbauprodukten charakterisiert. Quercetin bzw. seine Glykoside werden z. B. durch *Eubacterium ramulus* zu 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (B-Ring) und Phloroglucinol (A-Ring) abgebaut (Abbildung 30). Flavonoide, die keine OH-Gruppe an der 3-Position des C-Ringes besitzen, wie z. B. die Flavone, werden mikrobiell zu den korrespondierenden Phenylpropionsäuren konvertiert. Bei beiden Abbauwegen, sowohl der Flavonole als auch Flavone, kommt es zuerst zur Reduktion der 2,3-Doppelbindung des C-Ringes. Durch Ringöffnung und Abspaltung des Phloroglucinols entstehen die entsprechenden Phenolsäuren [Aura et al, 2002; Blaut et al, 2003; Schoefer et al, 2003]. Phloroglucinol unterliegt je nach Bakterienart einem weiteren Abbau zu kurzkettigen Fettsäuren. So entstehen durch *Eubacterium ramulus* katalysierte Reaktionen aus Phloroglucinol Acetat und Butyrat. Durch Untersuchungen zum Abbau von Flavonolen mit fäkalen Mikroorganismen aus unterschiedlichen Spezies (Hase, Ratte, Mensch) konnte gezeigt werden, dass Methoxygruppen am B-Ring die Flavonole vor einem intensiven Abbau schützen [Lin et al, 2003].



**Abbildung 30:** Postulierter Abbau von Quercetin durch *Eubacterium ramulus* [modifiziert nach Blaut et al, 2003].

Nach oraler Gabe von (+)-Catechin an Ratten konnten die Abbauprodukte 3-Hydroxyphenylpropionsäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Hydroxyhippursäure detektiert werden [Gonthier et al, 2003]. 3-Hydroxyphenylpropionsäure entsteht im Dickdarm durch den mikrobiellen Abbau von Kaffeesäure [Rechner et al, 2001]. Intestinale Mikroorganismen sind ebenfalls in der Lage, mono- und diglykosylierte Anthocyane abzubauen. Nach Abspaltung des Zuckerrestes erfolgt der Abbau zum nicht stabilen Phloroglucinolaldehyd (A-Ring) und der entsprechenden Benzoesäure (B-Ring; Abbildung 31; Tabelle 8) [Keppler und Humpf, 2005; Fleschhut et al, 2006].

Aber auch unter *in vitro* Bedingungen wird ein intensiver Abbau von Flavonoiden und vor allem der Anthocyanidine aufgrund ihrer chemischen Instabilität postuliert [Seeram et al, 2001; Aura et al, 2002; Keppler und Humpf, 2005; Fleschhut et al, 2006].



**Abbildung 31:** Postulierter Zerfall der Anthocyanidine [modifiziert nach Fleischhut et al, 2006].  
R1 und R2 siehe (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Anthocyanidine und ihre korrespondierenden Benzoesäuren [Fleischhut et al, 2006]

Anthocyanidin	Korrespondierende Benzoesäure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoesäure	H	H
Cyanidin	Protocatechusäure	OH	H
Delphinidin	Gallussäure	OH	OH
Päonidin	Vanillinsäure	OCH <sub>3</sub>	H
Malvidin	Syringasäure	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Im Gegensatz zu den Flavonoiden ist bislang relativ wenig über zelluläre Effekte der Flavonoidabbauprodukte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bekannt. Einige Abbauprodukte von Flavonoiden, wie z. B. Gallussäure, Protocatechusäure, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucinol, sind bereits als Inhibitoren des Wachstums von humanen Tumorzellen *in vitro* beschrieben [Ohno et al, 2001; Yañez et al, 2004; Zapór, 2004; Kampa et al, 2004; Yeh et al, 2005; Gao et al, 2006]. Des Weiteren wirken Hydroxybenzoesäuren antioxidativ [Seeram et al, 2001; Yeh und Yen, 2003]. *In vivo* konnte Protocatechusäure in geringen Dosen (16 nmol; 30 min vor 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)-Gabe) die Papillomrate von Dimethylbenz[a]-anthracen-induzierten weiblichen ICR-Mäusen um 52 % reduzieren [Nakamura et al, 2000]. Protocatechusäure (1000 und 2000 ppm, oral) reduziert signifikant die Anzahl aberranter Krypten von Azoxymethan-induzierten männlichen F344-Ratten [Kawamori et al, 1994]

### 3 Problemstellung

Aufgrund der hohen Inzidenz an kolorektalen Karzinomen in den westlichen Industrieländern und der bedeutenden Rolle der Ernährung im Hinblick auf die Kolonkanzerogenese, steht die Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen mit einem möglichen chemopräventiven Potential im Mittelpunkt des öffentlichen und wissenschaftlichen Interesses.

Im Rahmen des BMBF-geförderten Netzwerkes sollte die Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten sowie Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung untersucht werden. Der Fokus liegt dabei auf der Identifizierung von Apfelpolyphenolen mit möglichen chemopräventiven Eigenschaften, sowie auf der Aufklärung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen.

Die Tumorentstehung ist verbunden mit der Modulation von zellulären Signaltransduktionskaskaden. Die Expression und/oder die Aktivität von zentralen Elementen von Signalkaskaden, welche entscheidend sind für die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung, ist dabei häufig verändert [Peters, 2003; Djahansouzi et al, 2004; Thiel und Rössler, 2005]. Die Wirkung von Apfelpolyphenolen auf solche proliferationsassoziierten Signalkaskaden steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Die Arbeit sollte damit einen Beitrag zum Verständnis der zellulären Wirkmechanismen von Apfelpolyphenolen leisten. Komplexe Apfelextrakte, rekonstituierte Mischungen bislang identifizierter Apfelpolyphenole sowie ausgewählte Apfelinhaltsstoffe als Einzelsubstanzen wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 *in vitro* untersucht.

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit galt dem Einfluss von Apfelpolyphenolen auf den EGFR/MAPK-Signalweg. Mit Hilfe von Fraktionen aus polyphenolreichen Apfelextrakten, die uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Becker (*emeritus*, Universität Saarbrücken) zur Verfügung gestellt wurden, sollten Apfelpolyphenole mit potenter Wirkqualität auf den EGFR/MAPK-Signalweg identifiziert werden.

Eine besondere Schlüsselrolle bei der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen nimmt die Proteinkinase C (PKC) ein [Dempsey et al, 2000; Gökmen-Polar et al, 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Frage der nachgegangen, ob und inwieweit der Apfelsaftextrakt bzw. dessen Inhaltsstoffe die PKC-Aktivität von humanen Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu primären Enterozyten beeinflussen. PKC-Isoenzyme sind zum Teil wichtige Regulatoren von apoptotischen Prozessen, weshalb untersucht wurde,

welchen Beitrag insbesondere die Modulation der Expression von PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  in HT29-Zellen durch Apfelpolyphenole zur Apoptoseinduktion leistet.

Weiterhin spielt der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle in der Kolonkanzerogenese. Mutationen von Komponenten des Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweges finden sich deshalb in einer Vielzahl kolorektaler Karzinome [Kolligs et al, 2002; Chtarbova und Müller, 2003]. Ein zentrales Schlüsselenzym dieses Signalweges stellt die Glykogensynthasekinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) dar. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit Frage nachgegangen, ob Apfelpolyphenole die GSK3 $\beta$ -Aktivität und die  $\beta$ -Catenin-Homöostase in HT29-Zellen modulieren. Solche Interaktionen der Apfelpolyphenole mit dem Wnt-Signalweg könnten möglicherweise deren Einsatz in der Prävention des kolorektalen Karzinoms limitieren.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand aus wirkmechanistischen Untersuchungen zu potentiellen Abbauprodukten von Polyphenolen. Aufgrund der limitierten Stabilität der Flavonoide *in vitro* als auch durch die bakterielle Degradation durch die Mikroflora des Kolons *in vivo* [Blaut et al, 2003; Keppler und Humpf, 2005; Fleschhut et al, 2005], stellte sich die Frage nach der biologischen Wirksamkeit der Abbauprodukte. Eine weitere Frage, welche sich daraus ergibt, ist, ob die nach Inkubation mit Flavonoiden beobachteten zellulären Wirkungen auf den Ursprungssubstanzen selbst beruhen oder ob entsprechende Abbauprodukte zumindest einen Beitrag dazu leisten. Daher wurde die Hemmwirkung der postulierten Abbauprodukte von Flavonoiden auf das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro* untersucht. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die bislang identifizierten zellulären Zielstrukturen ausgewählter Flavonoide, wie beispielsweise der EGFR, durch die entsprechenden Abbauprodukte beeinflusst werden.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Hemmung des Tumorzellwachstums *in vitro* durch Apfelextrakte und ausgewählte Polyphenole

Als erster Parameter für die biologische Wirksamkeit in den gewählten Zellsystemen wurde die Beeinflussung des Wachstums der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durch Apfelsaftextrakte und ihrer Inhaltsstoffe im Sulforhodamin B (SRB)-Test (Kapitel 6.5) [Skehan et al, 1990] bestimmt. Für weiterführende Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurden strukturverwandte Flavan-3-ole in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die untersuchten Apfelextrakte (Kapitel 6.1) unterschieden sich in den Apfelsorten sowie im Gewinnungsprozess. AE02 und AE04 sind Apfelsaftextrakte, wohingegen der Extrakt AE03B einen Tresterextraktionssaft darstellt. Der Apfelsaftextrakt AE02 wurde aus 20 % Tafeläpfel und 80 % (Topaz, Bohnapfel, Winterrambur, Bittenfelder) der Ernte 2002 hergestellt. Der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE04 entstand durch die Mischung von Apfelsäften der Ernte 2002 und 2003. Zur Herstellung wurden 250 l des Ausgangssaftes zur Herstellung des AE02, 50 l Tresterextraktionssaft und je 200 l von sortenreinen naturtrüben Mostapfelsäften aus Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambur vermischt. Der Apfelextrakt AE03B unterscheidet sich von den anderen Extrakten durch seine Herstellungsweise. Der Ausgangsapfelsaft zur Gewinnung des Extraktes AE03B wurde aus verschiedenen Tafelapfelsorten (Melrose, Granny Smith, Golden Delicious, Jonagold) der Ernte 2003 hergestellt. Der Apfelsaft wurde jedoch verworfen und stattdessen der Rückstand (Trester) für zwei Stunden mit Zellulasen und Pektinasen behandelt, um die im Trester verbliebenen Polyphenole ebenfalls herauszulösen. Aus dem resultierenden Tresterextraktionssaft wurde der Tresterextrakt AE03B gewonnen. Dieser Extrakt unterscheidet sich von den Apfelsaftextrakten AE02 und AE04, durch einen erhöhten Gehalt an Quercetinglykosiden (Tabelle 9). Die Polyphenole der Extrakte wurden mittels HPLC mit Diodenarraydetektor charakterisiert. Jedoch konnten bislang maximal 50 % der Apfelpolyphenole der untersuchten Extrakte bestimmt werden (Tabelle 9). Aufgrund der Kompatibilität zur Massenspektrometrie (MS) wurde im Laufe des Projektes die Analytik etwas verifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der späten Umstellung (drittes Pro-

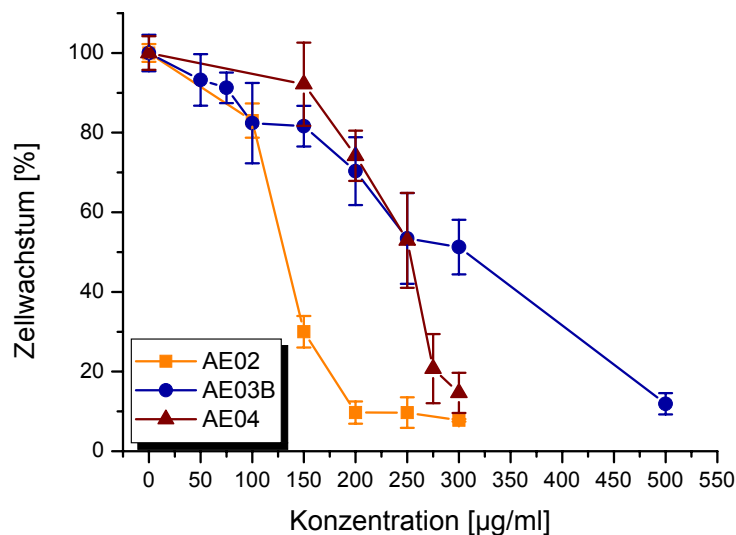
jektjahr) von den bereits veröffentlichten Polyphenolgehalten ausgegangen (Tabelle 9, Fußnote a)) [Kern et al, 2005; Schäfer et al, 2006].

**Tabelle 9:** Polyphenolzusammensetzung der Apfelextrakte (Einwaage von 1g Extrakt gelöst in 1l H<sub>2</sub>O). n. n.: nicht nachweisbar; kursiv: in dieser Arbeit untersuchte Apfelinhaltsstoffe.

<b>Polyphenole</b>	<b>AE02 [mg]</b>	<b>AE03B [mg]</b>	<b>AE04 [mg]</b>
<i>Procyanidin B1</i>	7 <sup>a</sup> (n. n.) <sup>b</sup>	6,2 (0,9)	n. n. (3,1)
<i>Procyanidin B2</i>	15,1 (15,1)	18,4 (16,4)	12,1 (5,1)
<i>(-)-Epicatechin</i>	19,2 (25,3)	17,7 (15,2)	12,5 (15,7)
<i>(+)-Catechin</i>	n. n. (4,8)	2,7 (2,9)	n. n. (1,8)
Phloretinxyloglukosid	66,2 (155,8)	31,7 (68,8)	4,2 (136,3)
Phloretinglykosid 1	24,7 (n. n.)	n. n. (n. n.)	n. n.
Phloretinglykosid 2	9 (n. n.)	n. n. (n. n.)	n. n.
<i>Phloridzin</i>	27,9 (35)	78,9 (64)	48(52,8)
<i>Chlorogensäure</i>	181,5 (240,8)	19,2 (20,6)	183,2 (245,9)
Kryptochlorogensäure	(9,2)	n. n. (n. n.)	3,3 (13,9)
3-Cumaroylchinasäure	9,5 (9,2)	3,0 (n. n.)	9,4 (8,8)
4-Cumaroylchinasäure	77,3 (61,0)	5,0 (3,5)	66 (63,8)
5-Cumaroylchinasäure	10,4 (n. n.)	3,8 (n. n.)	39,8 (n. n.)
<i>Kaffeesäure</i>	9,5 (11,9)	4,0 (3,9)	7,5 (3,1)
p-Cumarsäure	n. n. (2,9)	4,2 (4,3)	2,6 (3,3)
Quercetin-3-xylosid	n. n. (n. n.)	18,1 (12,3)	n. n. (2,1)
Quercetin-3-arabinosid	n. n. (n. n.)	3,5 (12,2)	n. n. (n. n.)
<i>Quercetin-3-rhamnosid</i>	4,1 (n. n.)	25,1 (19,1)	4,3 (4,9)
<i>Quercetin-3-galaktosid</i>	0,8 (1,7)	8,1 (26,8)	1,8 (3,8)
<i>Quercetin-3-glukosid</i>	1,4 (n. n.)	12,3 (8,5)	1,5 (2,7)
<i>Quercetin-3-rutinosid</i>	2,6 (3,6)	49,1 (4,7)	4,5 (n. n.)
Summe (HPLC)	466,2 (576,4)	310,9 (284)	478,3 (567)

- a) Für diese Arbeit relevante Polyphenolgehalte.  
 b) Die in Klammer gesetzten Zahlen bedeuten die gefundenen Polyphenolgehalte mit neuer MS-kompatibler Analytik (Kapitel 6.1.2).

Der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 hemmte im Vergleich zu dem Apfelsaftextrakt AE04 und dem Tresterextrakt AE03B am potentesten das Wachstum von HT29-Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $134 \pm 18 \mu\text{g/ml}$  im Vergleich zu  $IC_{50}$  (AE03B) =  $299 \pm 24 \mu\text{g/ml}$  und  $IC_{50}$  (AE04) =  $236 \pm 56 \mu\text{g/ml}$  (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Hemmwirkung der Apfelextrakte AE02, AE03B und AE04 auf das Wachstum von HT29-Zellen gemessen im SRB-Test (Inkubationszeit, 72h; serumhaltiges (10 % FKS) Kulturmedium). MW  $\pm$  SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

Des Weiteren wurden ausgewählte polyphenolische Inhaltsstoffe des AE02 auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften untersucht (Abbildung 33). Um der Frage nachzugehen, ob und inwieweit die komplexe Mischung der Verbindungen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit hat, beispielsweise im Sinne einer additiven oder gar synergistischen Wirkung, wurden rekonstituierte Mischungen (Mischung A + B, Zusammensetzung siehe Tabelle 10) aus den zur Verfügung gestandenen Apfelinhaltsstoffen des AE02 hergestellt und parallel zum Originalextrakt untersucht. Zur Modulation des Wachstums von HT29-Zellen wurde aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Procyanidine B1 und B2 nur Mischung A eingesetzt (Abbildung 33).

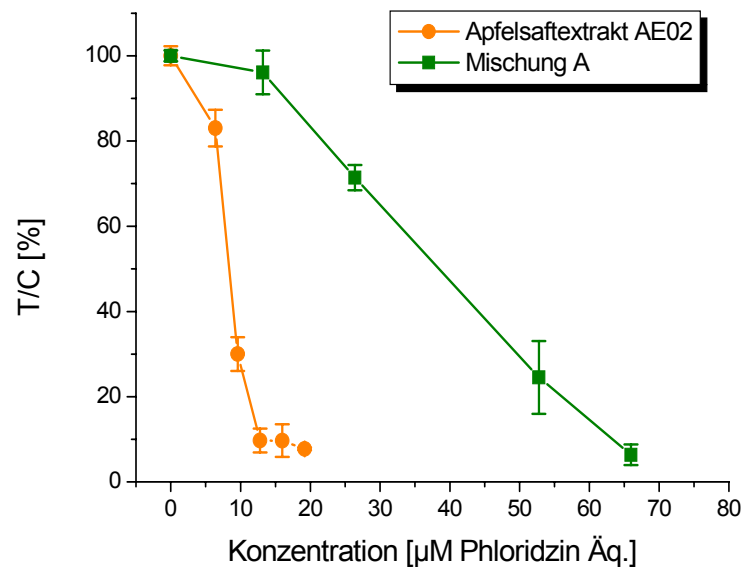


**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Substanzmischungen A und B

Substanz	Mischung A [mg]	Mischung B [mg]
Chlorogensäure	181,5	181,5
Kaffeesäure	4,8	4,8
Phloridzin	27,9	27,9
(-)-Epicatechin	19,2	19,2
Procyanidin B1	-	7
Procyanidin B2	-	15,1
Quercitrin (Q-3-rha)	4,1	4,1
Hyperosid (Q-3-gal)	0,8	0,8
Isoquercitrin (Q-3-glc)	1,4	1,4
Rutin (Q-3-rut)	2,6	2,6
Summe	242,3	264,4

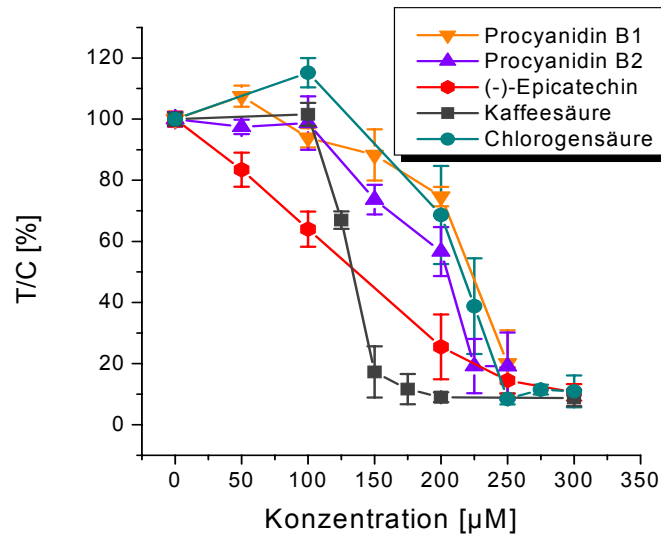
Um äquimolare Konzentrationen der Inhaltsstoffe in den rekonstituierten Mischungen und dem Originalextrakt AE02 sicherzustellen und so einen Vergleich der Wirkungen zu ermöglichen, wurde zur Standardisierung der Gehalt an Phloridzin, einem charakteristischen Apfelinhaltsstoff, herangezogen.

Die rekonstituierte Mischung A zeigte zwar ebenfalls deutliche wachstumshemmende Eigenschaften, erwies sich allerdings mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $34 \pm 8,4 \mu\text{M}$  Phloridzin Äquivalente (Äq.) als deutlich geringer wirksam als der Originalextrakt (Abbildung 33). Bei einer Konzentration der Mischung A von  $9 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq. ( $IC_{50}$  des AE02 =  $9 \pm 1 \mu\text{M}$ ) wäre nur eine 15 %ige Hemmung des Wachstums der HT29-Zellen zu erwarten.



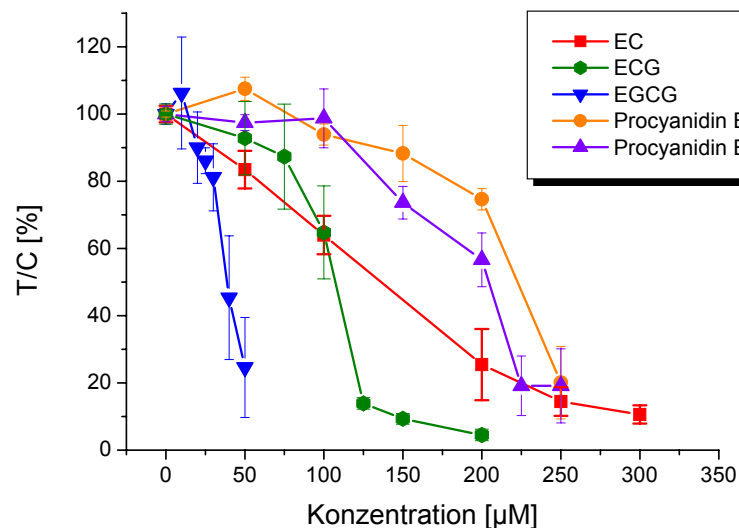
**Abbildung 33:** Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes AE02 und der rekonstituierten Mischung A (Tabelle 10) auf das Wachstum von HT29-Zellen im SRB-Test (72 h, serumhaltig (10 % FKS)). Die Konzentration ist dargestellt in  $\mu\text{M}$  bezogen auf den jeweiligen Gehalt an Phloridzin. MW  $\pm$  SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

Von den getesteten Apfelsaftinhaltsstoffen erwiesen sich (-)-Epicatechin (EC) und Kaffeesäure mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten um  $130 \mu\text{M}$  als potentere Hemmstoffe des Zellwachstums von HT29-Zellen als Chlorogensäure und die beiden Procyanidine B1 und B2, welche mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten  $> 200 \mu\text{M}$  nur noch marginale Hemmwirkungen zeigten (Abbildung 34, Tabelle 11). Von den Quercetinglykosiden (Quercetin-3-glukosid (Q-3-glu, Isoquercitrin), Quercetin-3-galaktosid (Q-3-gal, Hyperosid), Quercetin-3-rhamnosid (Q-3-rha, Quercitrin) und Quercetin-3-rutinosid (Q-3-rut, Rutin)) hemmte nur Q-3-glu das Wachstum von HT29-Zellen, allerdings nur in hohen Konzentrationen ( $\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$ ) (ohne Abbildung, Tabelle 11). Der charakteristische Apfelinhaltsstoff, das Dihydrochalkonglykosid Phloridzin wies keine wachstumshemmenden Eigenschaften im verwendeten Testsystem auf (ohne Abbildung, Tabelle 11).



**Abbildung 34:** Einfluss von Apfelpolyphenolen (Procyanidin B1 und B2, (-)-Epicatechin, Kaffeesäure und Chlorogensäure) auf das Wachstum von HT29-Zellen im SRB-Test (72 h; serumfrei). MW  $\pm$  SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

Aus der Gruppe der untersuchten Flavan-3-ole, zeigten die mit Gallatresten verknüpften Epicatechine die stärkste wachstumshemmende Wirksamkeit (Abbildung 35, Tabelle 11). Die Procyanidine B1 und B2 erwiesen sich in dieser Reihe als schwächere Hemmstoffe des Tumorzellwachstums.



**Abbildung 35:** Hemmwirkung der Flavan-3-ole: (-)-Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Procyanidin B1 und B2 auf das Wachstum von HT29 Zellen im SRB-Test (72 h; serumhaltiges (10 % FKS) Kulturmedium). MW  $\pm$  SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

**Tabelle 11:** Polyphenole des Apfelsaftextraktes AE02 und strukturverwandte Flavonoide: Wachstumshemmende Eigenschaften im SRB-Test (HT29-Zellen, Inkubationszeit 72 h) und Inhibierung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA. n. d. nicht getestet, <sup>a</sup>)Kein Effekt bis 300  $\mu\text{M}$ , <sup>b</sup>)Strukturanaloge, die nicht im Apfelsaftextrakt vorkommen, die für Struktur-Aktivitäts-Vergleiche mitgeführt wurden.

Testsubstanz	Wachstumshemmung IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	EGFR ELISA IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
Procyanidin B1	235 $\pm$ 68	49,9 $\pm$ 10,2
Procyanidin B2	191 $\pm$ 39	37,9 $\pm$ 2,8
(+)-Catechin	n. d.	> 300
(-)-Epicatechin	136 $\pm$ 4	> 300
(-)-Epigallocatechin <sup>b</sup>	n. d.	297 $\pm$ 24
(-)-Epicatechin-3-gallat <sup>b</sup>	74 $\pm$ 18	1,2 $\pm$ 0,4
(-)-Epigallocatechin-3-gallat <sup>b</sup>	40 $\pm$ 6	0,2 $\pm$ 0,02
Kaffeensäure	132 $\pm$ 19	> 300
Chlorogensäure	205 $\pm$ 53	> 300
4-Cumaroylchinasäure	n.d.	> 300
Phloretin <sup>b</sup>	89 $\pm$ 18	43,4 $\pm$ 5,1
Phloridzin	- <sup>a</sup>	267 $\pm$ 50
Quercetin <sup>b</sup>	52 $\pm$ 11	0,9 $\pm$ 0,4
Quercetin-3-glucose	> 300	6,7 $\pm$ 1,3
Quercetin-3-galactose	- <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 1
Quercetin-3-rhamnose	- <sup>a</sup>	225 $\pm$ 31
Quercetin-3-rutinose	- <sup>a</sup>	> 300

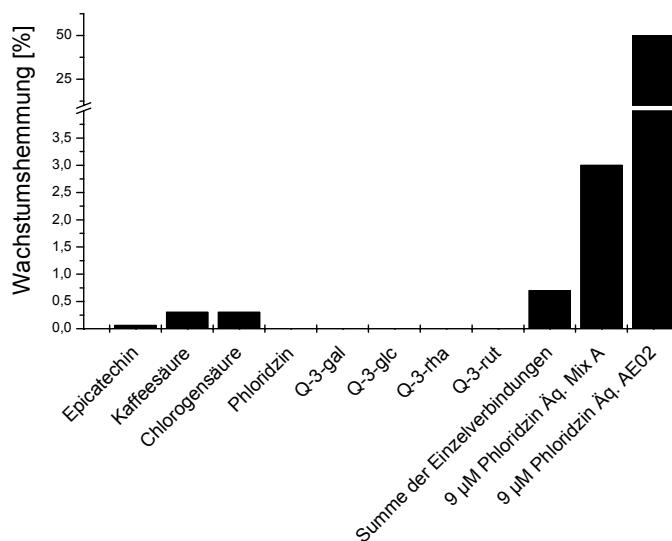
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass polyphenolreiche Apfelextrakte effektiv das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 hemmen, wobei sich der Apfelsaftextrakt AE02 als potentester Inhibitor erwies ( $\text{IC}_{50} = 134 \pm 18 \mu\text{g/ml}$ ). Die wachstumshemmenden Eigenschaften des AE02 liegen in verbraucherrelevanten Konzentrationsbereichen, da der Originalsaft AS02 eine Konzentration 500  $\mu\text{g/ml}$  an Polyphenolen aufweist und die gefundene Konzentration der Wachstumshemmung mit 134  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) deutlich geringer ist.

Apfelsaftextrakte sind bereits in ihrer Hemmwirkung auf das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro* beschrieben. Diese Effekte werden dabei hauptsächlich den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen des Apfels, wie den Hydroxyzimtsäuren und Flavonoiden zugesprochen [Eberhardt et al, 2000; Liu et al, 2003; Gossé et al, 2005; Veeriah et al 2006]. Das wachstumshemmende Potential der Flavonoide wird dabei als indirekter und artifizieller Effekt der Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) *in vitro* diskutiert [Long et al, 2000; Lapidot et al, 2002]. Liu et al. [2003] zeigten jedoch, dass unter Inkubationsbedingungen der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 mit Apfelsaftextrakten im „Dulbeccos Modified Eagle’s Medium“ (DMEM) kein  $H_2O_2$  generiert wird. Zumal  $H_2O_2$  in Konzentrationen, die durch Flavonoide freigesetzt werden könnten, weder antiproliferative Eigenschaften besitzt, noch Enzyme des oxidativen Metabolismus von HepG2-Zellen beeinflusst [Liu et al, 2003]. Experimente mit dem Apfelsaftextrakt AE02, koinkubiert mit Katalase, zeigten keine signifikanten Veränderungen der inhibitorischen Eigenschaften von AE02 auf das Wachstum von HT29-Zellen [Veeriah et al, 2006]. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine  $H_2O_2$ -Generation anscheinend keine oder nur eine geringfügige Relevanz unter den gewählten Versuchsbedingungen besitzt.

Es wurden bereits eine Reihe von Apfelpolyphenolen identifiziert, die ein wachstumshemmendes Potential besitzen, von denen EC und Kaffeesäure sich als die potentesten Inhaltsstoffe erwiesen. Kaffeesäure wurde bereits als Hemmstoff des Wachstums von humanen Kolontumorzellen beschrieben [Hudson et al, 2000; Kampa et al, 2004; Veeriah et al, 2006], was mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Hemmwirkung gut übereinstimmt. EC ist ebenfalls antiproliferativ wirksam, jedoch ist EC (Abbildung 35) in der Gruppe der Flavan-3-ole, einer der am wenigsten potenten Inhibitoren [Uesato et al, 2002; Seeram et al, 2003]. Eine Gallatgruppe in 3-Position am C-Ring, wie im Falle der Grüntee-catechine ECG und EGCG, führt zu einer Steigerung der zellwachstumshemmenden Eigenschaften von Flavan-3-olen *in vitro* [Bhatia et al, 2001; Uesato et al, 2002; Levites et al, 2002; Seeram et al, 2003]. Die dimeren Catechine, Procyanidin B1 und Procyanidin B2, zeigen nur marginale Effekte auf das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro*, vergleichbar mit Chlorogensäure (Tabelle 11, Abbildung 34). Das apfelcharakteristische Dihydrochalconglykosid Phloridzin sowie die im Apfelsaft identifizierten Quercetinglykoside (Q-3-glc, Q-3-gal, Q-3-rha und Q-3-rut) erwiesen sich als weitgehend ineffektiv auf das Tumorzellwachstum. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Veeriah et al. [2006]. Davon vor allem, die das Zellwachstum nicht beeinflussenden Quercetinglykoside durch

Tresterextraktion im AE03B angereichert wurden, könnte dies möglicherweise die geringere Hemmwirkung des AE03B im Vergleich zum AE02 in diesem Testsystem erklären (Abbildung 32). Im Gegensatz zu den Glykosiden sind die entsprechenden Aglyka, Phloretin und Quercetin (Tabelle 11), die jedoch in freier Form nicht im Originalapfelsaftextrakt detektiert wurden, bekannte Wachstumshemmstoffe *in vitro* [Agullo et al, 1994; Kuo et al, 1996; Zhang et al, 2000; Calliste et al, 2001; Lee et al, 2002; Nguyen et al, 2004; Chen et al, 2004].

Die wachstumshemmende Wirkung der untersuchten Apfelpolyphenole in den Konzentrationen, in denen sie im Originalextrakt vorliegen, lässt nur einen marginalen Anteil der identifizierten Apfelinhaltsstoffe an der Gesamtwachstumshemmung erwarten. Eine Extrapolation der wachstumshemmenden Eigenschaften der Einzelverbindungen in den Konzentrationen, in denen sie bei 50 % Wachstumshemmung des Gesamtextraktes AE02 ( $9 \pm 1 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) vorliegen, würde nur  $\sim 1\%$  der Wachstumshemmung erklären (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Kalkulierter Beitrag der Apfelpolyphenole zur Wachstumshemmung des AE02 (SRB-Test, HT29-Zellen, 72h, serumhaltig (10 % FKS)). Dafür wurde die Konzentration der Inhaltsstoffe in  $9 \mu\text{M}$  Phloridzin-Äq. AE02 ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) bestimmt und ihre Hemmwirkung bei dieser Konzentration kalkuliert. Es zeigte sich dabei, dass EC, Kaffeesäure und Chlorogensäure jeweils weniger als 0,5 % zur Wachstumshemmung beitragen (Balken 1-3). Durch Addition der kalkulierten Hemmwirkungen der untersuchten Apfelpolyphenole, ergibt sich ein Gesamtbeitrag  $\sim 1\%$  (Balken Summe der Einzelverbindungen) zur Wachstumshemmung an HT29-Zellen. Um additive/synergistische Effekte zu erfassen wurde eine rekonstituierte Mischung A (Tabelle 10) hergestellt.  $9 \mu\text{M}$  Phloridzin-Äq. der rekonstituierten Mischung A tragen max. 3 % zur Hemmwirkung des AE02 auf das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro* bei.

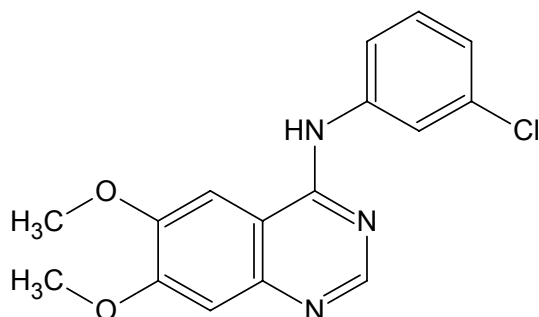
Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Wirkung der komplexen Mischung von der Wirkung der Einzelverbindungen abweicht (überadditiv, synergistisch etc.). Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine rekonstituierte Mischung der zur Verfügung stehenden Einzelverbindungen erstellt. Mischung A zeigte jedoch deutlich geringere wachstumsinhibierende Eigenschaften ( $IC_{50} = 34 \pm 8 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq., Abbildung 33A) als der Originalextrakt AE02. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur, die ebenfalls zeigen, dass die Hemmwirkung des Originalextraktes um ein Vielfaches höher ist als die einer Polyphenolmischung [Veeriah et al, 2006]. Im günstigsten Fall könnten maximal 3 % der Wachstumshemmung in additiver Wirkung der Einzelsubstanzen kalkuliert werden (Abbildung 36). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Effekte auf das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro* durch Apfelpolyphenolgemische eher überadditiv sind. Die Untersuchungen zeigen allerdings auch deutlich, dass die überwiegende wachstumshemmende Aktivität des AE02, sich nicht mit der Wirkung der bislang identifizierten Verbindungen erklären lässt. Es liegt deshalb der Schluss nahe, dass bislang nicht identifizierte Apfelinhaltsstoffe einen substantziellen Anteil an dem wachstumshemmenden Potential des Apfelextraktes AE02 haben müssen.

## **4.2 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und seine nachgeschaltete Signalkaskade**

### **4.2.1 Einfluss von Apfelinhaltsstoffen auf die Proteintyrosinkinaseaktivität (PTK) des EGFR**

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums. Im Folgenden wurde untersucht, ob und inwieweit der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 die Aktivität des EGFR beeinflusst und welche Inhaltsstoffe zur Hemmwirkung des Gesamtextraktes beitragen. Die Effekte der Testsubstanzen auf die PTK-Aktivität, des mittels Affinitätschromatographie an Weizenkeimlektinagarose, aus der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431, aufgereinigten EGFR wurden im „Enzyme linked immunosorbent Assay“ (ELISA), ein Screeningverfahren im 96-Lochplattenformat (Kapitel 6.8), bestimmt.

Als Positivkontrolle wurde bei jeder Messung der spezifische EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 ( $IC_{50} = 2,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ; Abbildung 37) mitgeführt [Gazit et al, 1989; Gazit et al, 1991].



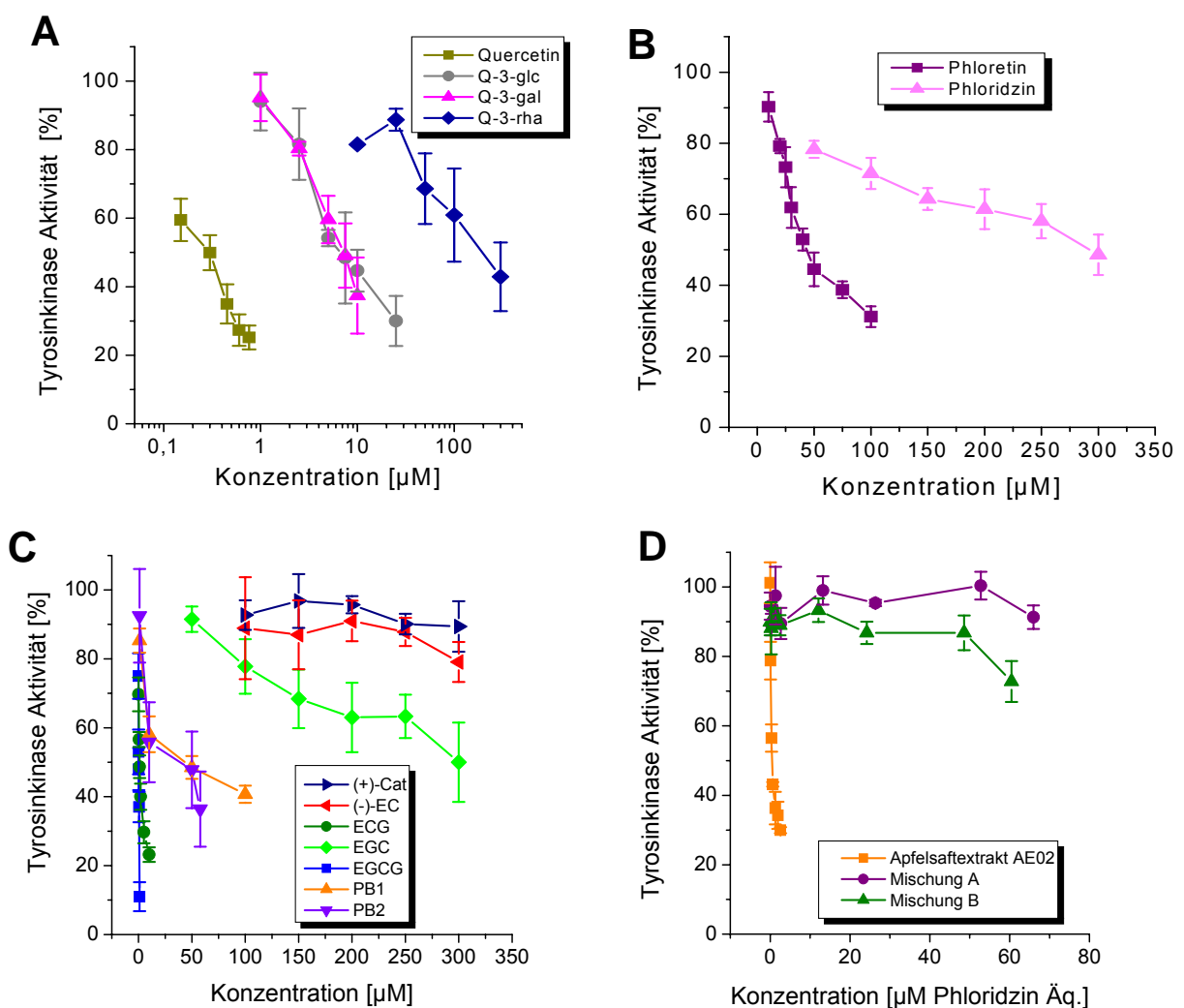
**Abbildung 37:** Struktur des spezifischen EGFR-Inhibitors Tyrphostin AG1478

Von den bislang identifizierten Verbindungen der Apfelextrakte zeigten die Quercetinglykoside Q-3-glc und Q-3-gal die potenteste Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR (Abbildung 38A, Tabelle 11) im ELISA. Q-3-rha erwies sich hingegen als deutlich weniger potent. Q-3-rut zeigte nur noch marginale inhibitorische Eigenschaften auf die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA (32 % Reduktion der PTK-Aktivität bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$ , ohne Abbildung). Insgesamt waren die untersuchten Glykoside weniger wirksam als das freie Aglykon Quercetin ( $IC_{50} = 0,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$ , Abbildung 38A), das jedoch in freier Form nicht im Apfelsaft beschrieben ist. In der Gruppe der Flavonole können die inhibierenden Eigenschaften auf die PTK-Aktivität wie folgt zusammengefasst werden: Quercetin > Q-3-glu  $\approx$  Q-3-gal  $\gg$  Q-3-rha > Q-3-rut. Auch bei den Dihydrochalkonen erwies sich das freie Aglykon Phloretin als effektiver Hemmstoff des EGFR, wohingegen das im Apfel vorkommende Glykosid Phloridzin deutlich weniger wirksam war (Abbildung 38B, Tabelle 11) [Kern et al, 2005]. Kaffeesäure, Chlorogensäure und 4-Cumaroylchinasäure besitzen nur marginale inhibitorische Eigenschaften (ohne Abbildung, Tabelle 11).

Das im Apfelsaftextrakt enthaltene EC zeigte keine wesentliche Hemmwirkung im ELISA (Abbildung 38C). Die Procyanidine B1 und B2 (PB1 und PB2) hingegen erwiesen sich als effektive Hemmstoffe des EGFR, ohne signifikante Unterschiede zwischen den zwei Epimeren (Abbildung 38C). Weitere Strukturaktivitätsuntersuchungen zur EGFR-Hemmung durch Catechine ergaben, dass (+)-Catechin die geringsten inhibitorischen Eigenschaften



auf die PTK-Aktivität besitzt (11 % Inhibierung bei 300  $\mu\text{M}$ ), vergleichbar mit seinem Stereoisomer EC (24 % Inhibierung bei 300  $\mu\text{M}$ ). EGC zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion der PTK-Aktivität in Konzentrationen  $> 100 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} = 297 \pm 24 \mu\text{M}$ , Abbildung 38C). Für eine hochpotente Hemmwirkung scheint jedoch ein Gallussäureester an 3-Position des C-Ringes unabdingbar zu sein, da sich die Grüntee catechine EGCG ( $\text{IC}_{50} = 0,2 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) und ECG ( $\text{IC}_{50} = 1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ) als potenteste Hemmstoffe erwiesen (Abbildung 38C, Tabelle 1). Die einzelnen Flavan-3-ole lassen sich in der Reihenfolge abnehmender inhibitorischer Potenz wie folgt auflisten: EGCG  $>$  ECG  $\gg$  PB2  $\approx$  PB1  $\gg$  EGC  $>$  EC  $\approx$  Catechin.



**Abbildung 38:** Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch **A:** Quercetin und dessen Glykoside (Q-3-glu, Q-3-gal und Q-3-rha). **B:** Phloretin und Phloridzin, **C:** Flavan-3-ole (Cat, (+)-Catechin; EC, (-)-Epicatechin; ECG, Epicatechingallat; EGC, Epigallocatechin; EGCG, Epigallocatechingallat, Procyanidin B1 und Procyanidin B2. **D:** AE02 im Vergleich zu Mischung A und Mischung B (Tabelle 1). MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung [Kern et al, 2005].

Der EGFR und seine nachfolgende Signalkaskade spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation von HT29-Zellen *in vitro* [Marko et al, 2004]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Kolontumorzelllinien einen funktionellen EGFR exprimieren bzw. überexprimieren [Bradley et al, 1986; Moorghen et al, 1990; Karnes et al, 1998]. Einige Flavonoide konnten bereits als Hemmstoffe der PTK-Aktivität des EGFR identifiziert werden [Akiyama et al, 1987; Hagiwara et al, 1988; Meiers et al, 2001; Marko et al, 2004]. Der Apfelsaftextrakt AE02 selbst zeigte eine hochpotente Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR im isolierten Testsystem des ELISA mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $10 \pm 5 \mu\text{g/ml}$  ( $0,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$  Phloridzin-Äq) (Abbildung 38D). Diese Konzentration ist 50x niedriger als die Polyphenolkonzentration des Originalsaftes AS02 (500  $\mu\text{g/ml}$ ). Somit liegt die bestimmte Konzentration für die Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des isolierten EGFR in verbraucherrelevanten Konzentrationen.

Von den bislang identifizierten Inhaltsstoffen des Apfelsaftextraktes konnten die Quercetinglykoside Q-3-glc und Q-3-gal und die PB1 und PB2 als potente Hemmstoffe des EGFR im ELISA identifiziert werden. Interessanterweise stellten sich die Catechindimere als potente Inhibitoren im Gegensatz zum monomeren EC heraus. Jedoch erwiesen sich die Procyanidine trotz ihrer Eigenschaft als PTK-Inhibitoren als schlechtere Wachstumshemmstoffe im Vergleich zum EC, was möglicherweise auf eine schlechtere zelluläre Aufnahme der Dimere zurückzuführen ist. Jedoch konnten Deprez et al. [2001] bereits zeigen, dass Procyanidine bis zum Trimer im gleichen Maße zellulär von der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 aufgenommen werden, wie das Monomer. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Procyanidine aufgrund ihrer hohen Proteinbindungskapazität im SRB-Test an das Rinderalbumin binden und somit nicht für die Wachstumshemmung zur Verfügung stehen [Henson et al, 2004].

Die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen ergaben, dass im Gegensatz zu anderen Flavonoidklassen (Anthocyanidine oder Flavonole) bei den Flavan-3-olen nicht die vicinalen Hydroxygruppen am B-Ring entscheidend sind für eine potente Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität [Agullo et al, 1997; Marko et al, 2004]. Eine dritte Hydroxygruppe am B-Ring (ECG) führt nur zu einer marginalen Steigerung der EGFR-inhibitorischen Eigenschaften (Abbildung 38C, Tabelle 11). Wohingegen, vergleichbar zur Wachstumshemmung, eine Einführung eines Gallatrestes an 3-Position am C-Ring assoziiert ist mit einer hoch potenten Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR (Abbildung 38C, Tabelle 11). Das Grüntecatechin EGCG ist bereits als potenter EGFR-Hemmstoff beschrieben

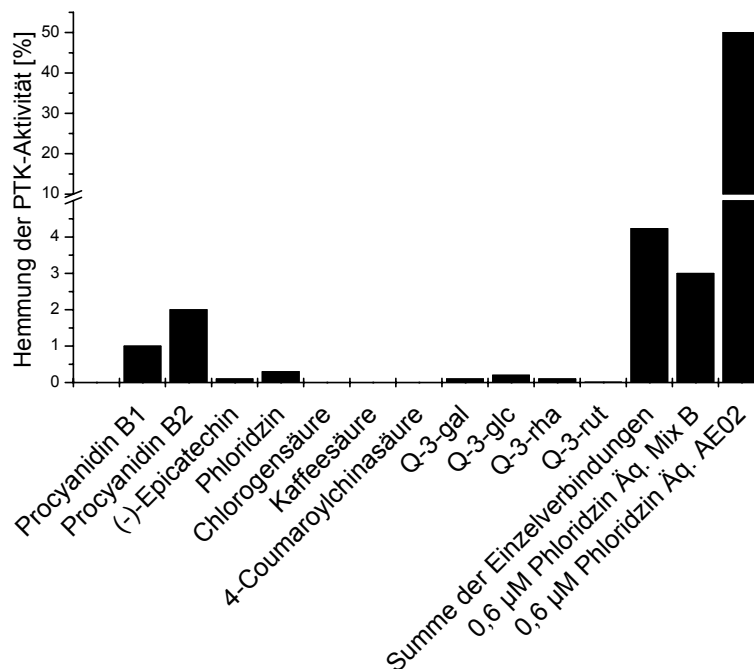
[Agullo et al, 1997; Liang et al, 1997; Meiers et al, 2001; Bhatia et al, 2001; Masuda et al, 2001; Lin et al, 2002].

Quercetin wurde als potenter Inhibitor der PTK-Aktivität, im Einklang mit früherer Literatur, identifiziert [Richter et al, 1999; Lee et al, 2002; Boyer et al, 2004]. Jedoch konnte das Aglykon in seiner freien Form nicht im Apfelsaftextrakt detektiert werden. Die Quercetinglykoside Q-3-glc und Q-3-gal sind im Vergleich zum freien Quercetin schlechtere Hemmstoffe, jedoch im Vergleich zu den anderen getesteten Apfelpolyphenolen hoch potent (Abbildung 38A, Tabelle 11). Im Gegensatz dazu führt eine Glykosylierung von Quercetin mit einer Rutinose oder Rhamnose zu einem totalen Verlust der EGFR-inhibitorischen Eigenschaften. Dies verdeutlicht, dass dem Zuckerrest eine entscheidende Rolle zukommt. Jedoch zeigte keines der getesteten Quercetinglykoside einen Effekt auf das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro*, was möglicherweise auf die limitierte zelluläre Aufnahme der Glykoside zurückzuführen ist. Der charakteristische Apfelinhaltsstoff Phloridzin zeigte, im Gegensatz zum korrespondierenden Aglykon Phloretin, nur marginale inhibitorische Eigenschaften auf die PTK-Aktivität des EGFR (Abbildung 38B, Tabelle 11) [Yang et al, 2001]. Jedoch konnte Phloretin genau wie Quercetin noch nicht in freier Form im Apfelsaftextrakt AE02 detektiert werden.

Kalkuliert man die inhibitorischen Eigenschaften der untersuchten Apfelinhaltsstoffe für die Konzentration, wie sie in 0,6  $\mu\text{M}$  Phloridzin Äq. ( $\text{IC}_{50}$  für EGFR-Hemmung) vorliegen, können nur ca. 4 % der PTK-Aktivitätshemmung erklärt werden (Abbildung 39).

Auch die Mischungen der bislang identifizierten und zur Verfügung gestandenen Inhaltsstoffe (Mischung A und B) erwiesen sich im Vergleich zum AE02 (Abbildung 38D) als nahezu unwirksam. Die erreichte Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR der Mischung B (3 %) entspricht dabei in etwa der aus den Untersuchungen der Einzelsubstanzen zu erwartenden Hemmwirkung unter Berücksichtigung der im Gemisch enthaltenen geringen Konzentrationen (Abbildung 39). Damit ist weitgehend auszuschließen, dass synergistische Effekte dieser Einzelkomponenten eine wesentliche Rolle für die Hemmwirkung des Apfelextraktes spielen. Die gefundenen Unterschiede in der Hemmwirkung zwischen Mischung A und B könnten auf die Procyanidine B1 und B2 zurückzuführen sein, was einen Beitrag der Procyanidine zu den EGFR-inhibitorischen Eigenschaften des Apfelsaftextraktes erklären würde. Jedoch wird deutlich, dass hauptsächlich unbekann-

te Apfelpolyphenole für die hochpotente Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes auf die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA verantwortlich sein müssen.

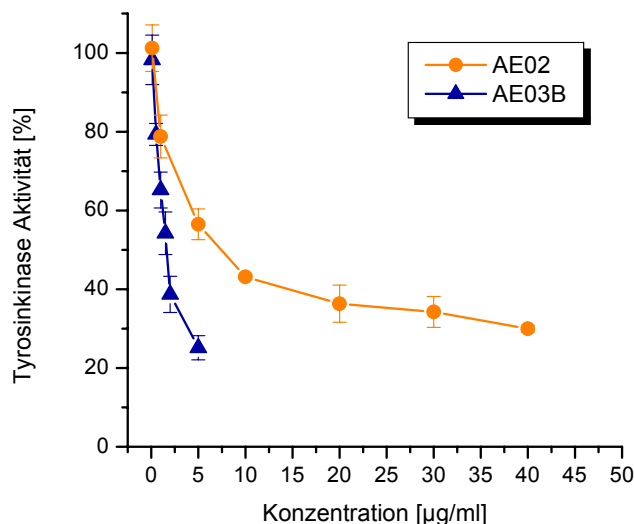


**Abbildung 39:** Kalkulierter Beitrag der Apfelpolyphenole zur Hemmwirkung des AE02 auf die PTK-Aktivität des aus A431-Zellen isolierten EGFR (ELISA). Dafür wurde die Konzentration der Inhaltsstoffe in 0,6 µM Phloridzin-Äq. AE02 ( $IC_{50}$ -Wert) bestimmt und ihre Hemmwirkung bei dieser Konzentration kalkuliert. Es zeigte sich dabei, dass Procyanidin B1 und B2, EC, Phloridzin und die Quercetinglykoside jeweils maximal 2 % zur Hemmwirkung des AE02 beitragen (Balken 1-11). Durch Addition der kalkulierten Hemmwirkungen der untersuchten Apfelpolyphenole, ergibt sich ein Gesamtbeitrag ~ 4 % (Balken Summe der Einzelverbindungen) zur EGFR-Hemmung im ELISA. Um additive/synergistische Effekte zu erfassen wurde eine rekonstituierte Mischung B (Tabelle 10) hergestellt. 0,6 µM Phloridzin-Äq. der rekonstituierten Mischung B tragen max. 3 % zur Hemmwirkung des AE02 auf die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA bei.

Aufgrund seines hohen Anteils an Quercetin-3-glykosiden sind Untersuchungen zum Einfluss des Tresterextraktes (AE03B, Tabelle 9) auf die PTK-Aktivität des EGFR von besonderem Interesse, da die zwei Quercetin-3-glykoside, Q-3-gal und Q-3-glc, ebenso wie das freie Quercetin, bereits als potente Inhibitoren des EGFR charakterisiert wurden [Kern et al, 2005].

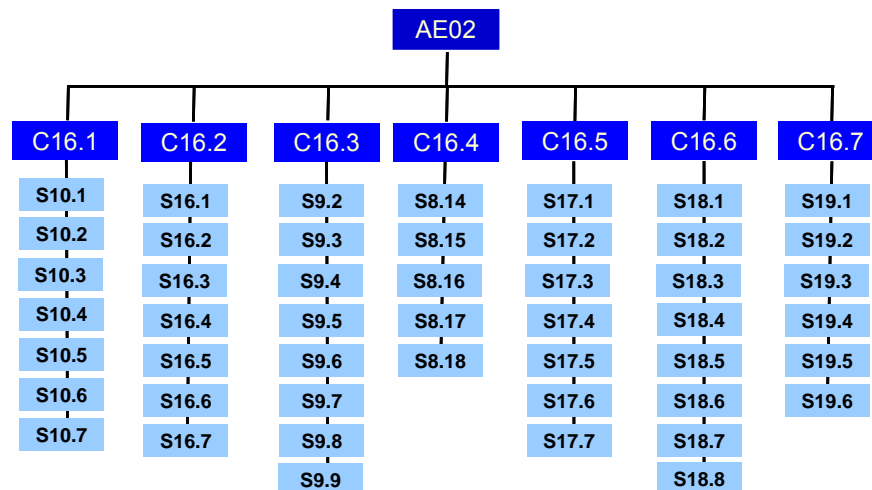
Im Vergleich zu AE02 zeigt der mittels Tresterverflüssigung hergestellte Extrakt AE03B (Kapitel 6.1.3) an isolierter Rezeptorpräparation im ELISA eine höhere Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR ( $IC_{50} = 1,6 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zum Apfelsaftextrakt

AE02 ( $IC_{50} = 10 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ), was vermutlich auf eine Erhöhung des Quercetinglykosidanteils zurückzuführen ist (Abbildung 40).



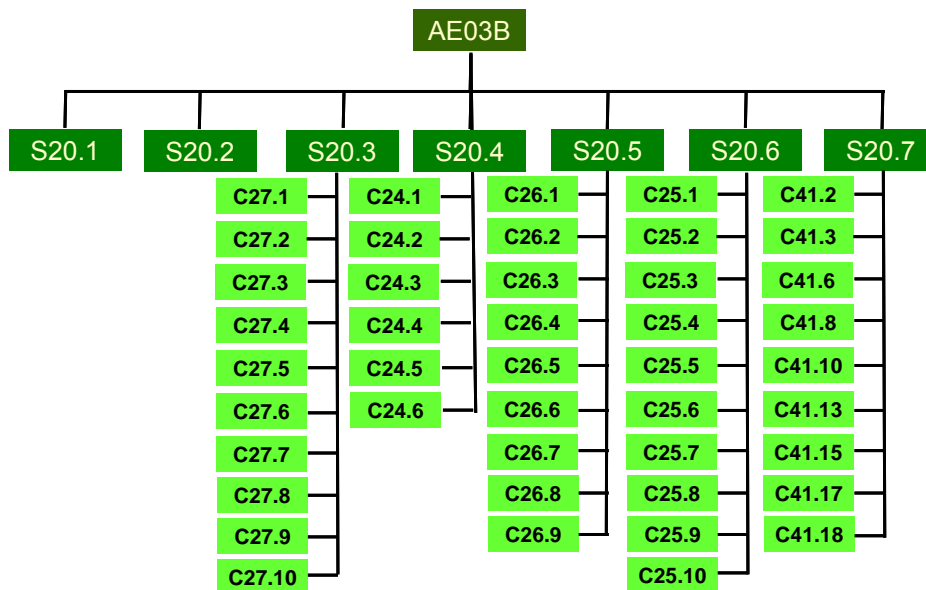
**Abbildung 40:** Einfluss des Apfelsaftextraktes (AE02) im Vergleich zum Apfeltresterextrakt (AE03B) auf die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA;  $MW \pm SD$  von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung.

Zur Charakterisierung von Apfelpolyphenolen, die für die hoch potente Hemmwirkung der Extrakte AE02 und AE03B auf die PTK-Aktivität des EGFR verantwortlich sein könnten, wurden Fraktionierungen vom Arbeitskreis Prof. Becker *em.* (Universität Saarbrücken) durchgeführt (Abbildung 41, Kapitel 6.1.5). Für unsere Versuche wurden uns diese Fraktionen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Apfelsaftextrakt AE02 (Abbildung 41) wurde mittels Gegenstromverteilungschromatographie (CPC) in die Hauptfraktionen C16.1 bis C16.7 getrennt. Zur weiteren Auftrennung wurden die Hauptfraktionen mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 Säulen weiter aufgereinigt (S10.1 - S19.6) [Zessner, persönliche Mitteilung]. Die drei Subfraktionen des AE02 S16.6, S16.7 und S19.6 erwiesen sich mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 0,1 \mu\text{g/ml}$  als hoch potente Inhibitoren des EGFR (ohne Abbildung). Diesen Fraktionen konnten jedoch keine bekannten Inhaltsstoffe zugeordnet werden.



**Abbildung 41:** Darstellung der durch Fraktionierungen des Apfelsaftextraktes AE02 entstandenen Fraktionen und Subfraktionen [Zessner, persönliche Mitteilung].

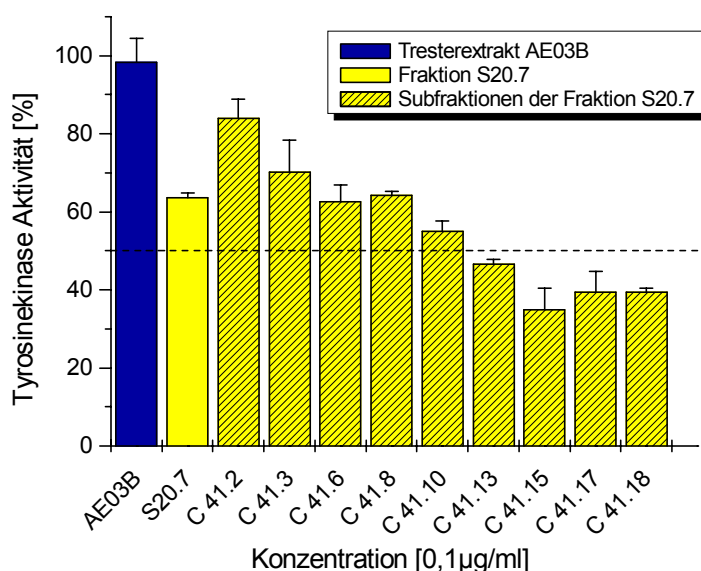
Der Tresterextrakt AE03B wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex in die Mutterfraktionen S.20.1 - S20.7 aufgetrennt. Diese wurden mittels CPC in die dargestellten Subfraktionen weiter aufgetrennt (Abbildung 42) [Zessner, persönliche Mitteilung].



**Abbildung 42:** Darstellung der durch Fraktionierungen des Tresterextraktes AE03B entstandenen Fraktionen und Subfraktionen [Zessner, persönliche Mitteilung].

Die procyanidinreiche Mutterfraktion S20.7 (Abbildung 42) konnte als diejenige mit der höchsten Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität im ELISA identifiziert werden (40 % Reduktion der PTK-Aktivität bei 0,1 µg/ml, Abbildung 43). Von den Subfraktionen erwiesen

sich die Fraktionen C41.2 - C41.18, als potente Hemmstoffe der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA. Die Hemmwirkung steigt dabei mit dem Grad der Oligomerisierung der Procyanidine von der Subfraktion C41.2 (Procyanidindimere) zur Fraktion C41.18 (Procyanidinoktamer) an (Abbildung 43) [Zessner, persönliche Mitteilung].

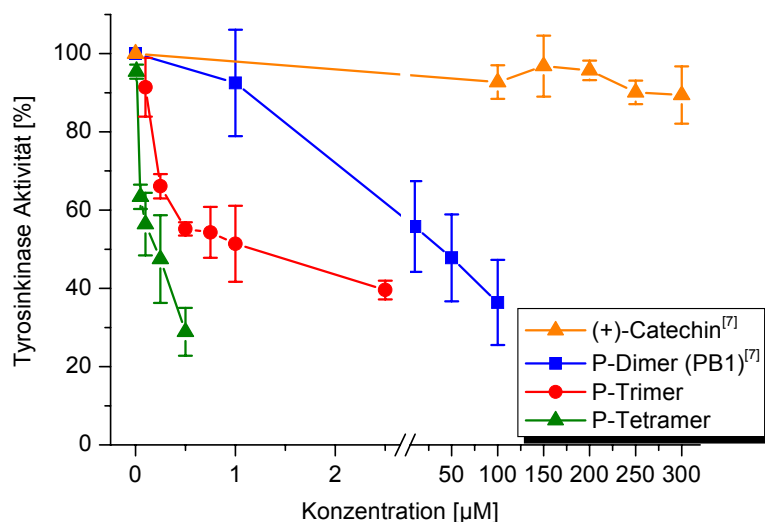


**Abbildung 43:** Modulation der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml durch den Tresterextrakt AE03B im Vergleich zu der procyanidinreichen Fraktion S20.7 und den Subfraktionen C41.2 – S41.18. MW ± SD in einer Dreifachbestimmung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise oligomere Procyanidine zu den EGFR-inhibitorischen Eigenschaften der Apfelextrakte beitragen. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Apfelprocyanidine mit unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden im Vergleich zum monomeren Flavan-3-ol (+)-Catechin auf eine mögliche Hemmwirkung im ELISA untersucht. Das verwendete Procyanidintrimer und Procyanidintetramer wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Becker *em.* (Universität Saarbrücken) aus dem Tresterextrakt AE03B aufgereinigt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Jedoch konnten im Rahmen der Doktorarbeit von Fr. Zessner die Strukturen des Procyanidintrimers und -tetramers nicht aufgeklärt werden [Zessner, persönliche Mitteilung].

Die EGFR-Hemmwirkung der Procyanidine an isolierter Rezeptorpräparation nimmt mit steigendem Polymerisierungsgrad zu (Abbildung 44). Das monomere (+)-Catechin inhibiert die EGFR-Aktivität in Konzentrationen > 300 µM, wohingegen das Dimer Procyani-

din B1 sowie das Procyanidintrimer und -tetramer sich als potentere Hemmstoffe mit  $IC_{50}$ -Werten von  $49,9 \pm 10,2 \mu\text{M}$ ,  $1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  und  $0,3 \pm 0,06 \mu\text{M}$  erwiesen. Aufgrund der  $IC_{50}$ -Werte kann die potentielle Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR der monomeren und oligomeren Flavan-3-ole beschrieben werden als: Procyanidintetramer > Procyanidintrimer >> Procyanidindimer >> (+)-Catechin.



**Abbildung 44:** Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch (+)-Catechin und Procyanidine. MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung. P: Procyanidin

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass polyphenolreiche Apfelextrakte an isolierter Rezeptorpräparation hocheffektiv die Proteintyrosinkinaseaktivität des EGFR hemmen. Einige Apfelpolyphenole (Procyanidin B1 und B2, Q-3-gal und Q-3-glc) konnten als EGFR-Hemmstoffe identifiziert werden. Mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierung konnte gezeigt werden, dass möglicherweise oligomere Procyanidine zu den hoch potenten EGFR-inhibitorischen Eigenschaften sowohl des Apfelsaftextraktes (AE02) sowie des Trestreextraktes (AE03B) beitragen.

Die notwendige Konzentration des Apfelsaftextraktes AE02 für eine effektive Hemmwirkung der PTK-Aktivität ( $IC_{50} = 0,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq. bzw.  $134 \pm 18 \mu\text{g/ml}$ ) ist um den Faktor 10 geringer als die gezeigte wachstumshemmende Konzentration im SRB-Test ( $IC_{50} = 9 \pm 1 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq. bzw.  $10 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ). Dieser Unterschied ist nicht limitiert auf den Apfelsaftextrakt, sondern konnte tendenziell für alle EGFR-inhibierenden Apfelpolyphenole gezeigt werden (Tabelle 11). Diese Unterschiede sind einerseits durch direkte

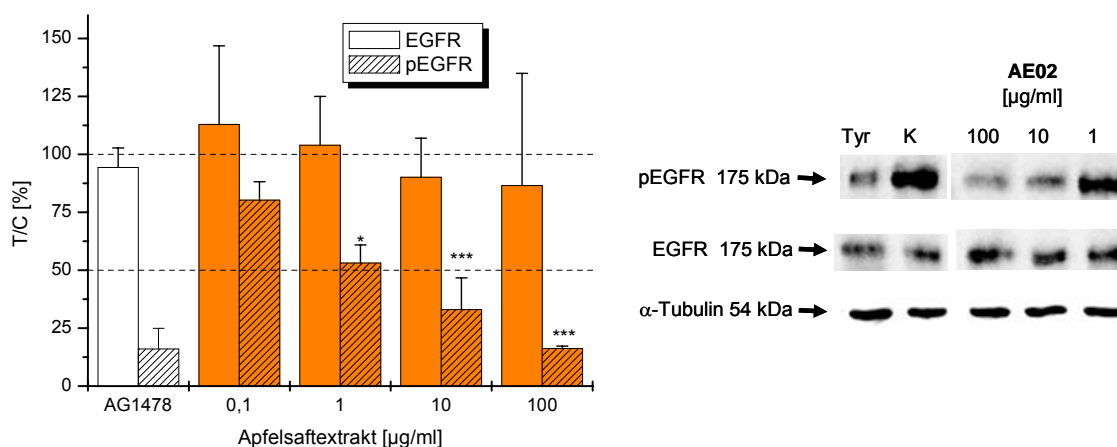


Rezeptorinteraktion im isolierten Testsystem des ELISA und andererseits durch zelluläre Effekte, wie Aufnahme und Verteilung im komplexen Zellsystem des SRB-Tests, zu erklären. Vergleichbare Diskrepanzen in der Hemmwirkung von Flavonoiden in den verwendeten Testsystemen wurden bereits publiziert [Meiers et al, 2001; Marko et al, 2004].

#### 4.2.2 Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR durch Apfelpolyphenole

Ein wesentliches Element des Aktivierungsprozesses des EGFR ist eine Autophosphorylierungssequenz (Abbildung 7), die in der Folge die Interaktion dieser Domänen mit nachgeschalteten Signalelementen ermöglicht. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Hemmwirkung des polyphenolreichen Apfelsaftextraktes AE02 begrenzt ist auf die isolierte Rezeptorpräparation oder ob auch in intakten Zellen der Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen, als Maß für die Aktivität des Rezeptors, beeinflusst wird.

HT29-Zellen wurden für 45 min serumfrei mit AE02 inkubiert, wobei in den letzten 15 min eine EGFR-Stimulation durch Zugabe von EGF (100 ng/ml) erfolgte. Der Phosphorylierungsstatus des EGFR wurde mittels Western Blot mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern detektiert. Als spezifischer EGFR-Inhibitor wurde AG1478 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M mitgeführt.

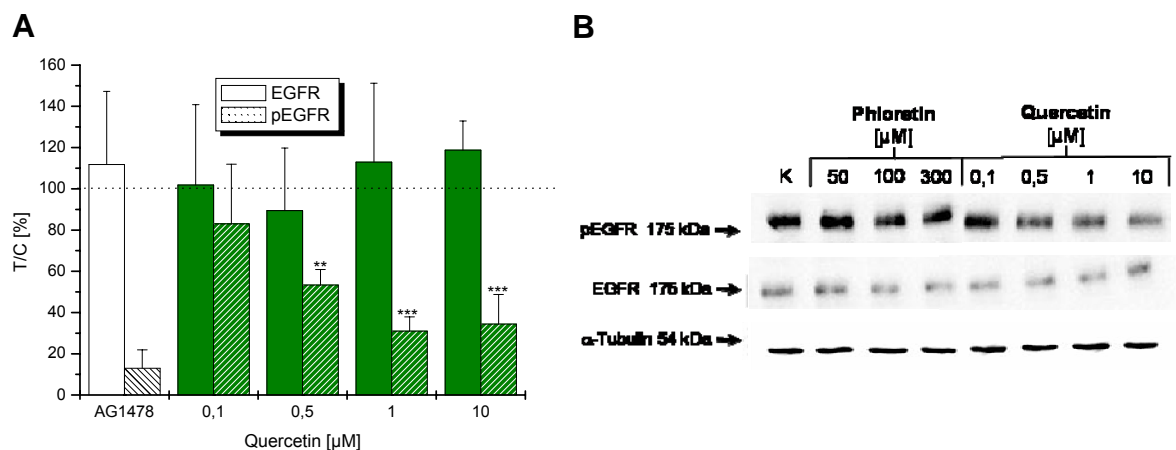


**Abbildung 45:** Western Blot Analyse zur Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten (100 ng/ml) HT29-Zellen durch AE02 (45 min, serumfrei), als Maß für die Aktivität des Rezeptors;  $\alpha$ -Tubulin wurde als Beladungskontrolle mitgeführt; MW  $\pm$  SD von fünf unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ ; Tyr: spezifischer Inhibitor Tyrphostin AG1478 [1  $\mu$ M]; K: EGF-stimulierte Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz)

Der Apfelsaftextrakt hemmte die Autophosphorylierung des EGFR mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $5 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$  AE02 ( $0,3 \pm 0,15 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq.; Abbildung 45), während der Gehalt an Gesamt-EGFR nahezu unverändert blieb (Abbildung 45).

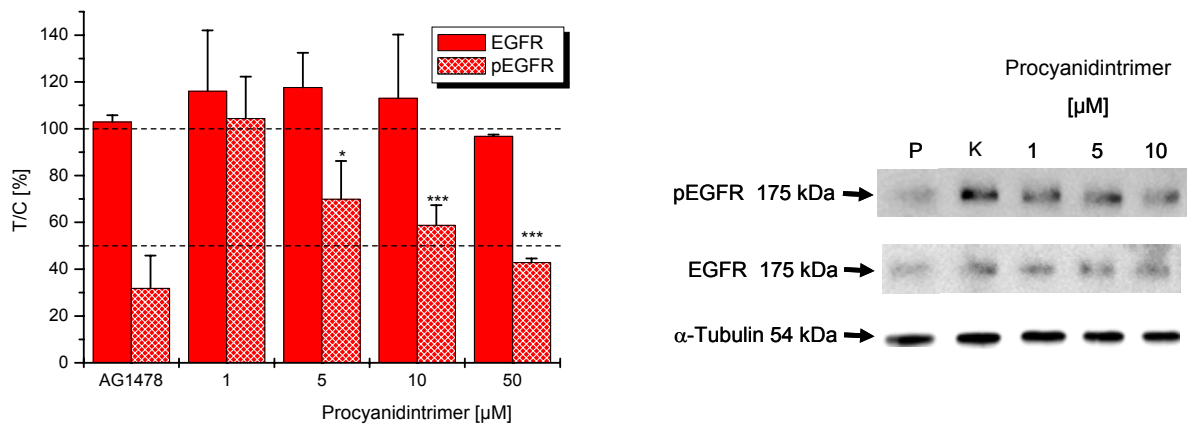
Die Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes AE02 auf die intrinsische PTK-Aktivität, gemessen als Phosphorylierungsstatus im Western Blot liegt im gleichen Konzentrationsbereich wie der  $IC_{50}$ -Wert an isoliertem EGFR im ELISA ( $0,7 \pm 0,35 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq.;  $10,8 \pm 5,5 \mu\text{g/ml}$  AE02). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der EGFR-Aktivität nicht begrenzt ist auf das Testsystem der isolierten Rezeptorpräparation (ELISA), sondern in gleichem Umfang in intakten Zellen zu beobachten ist.

Des Weiteren wurde die Wirkung der Aglyka Quercetin und Phloretin auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR untersucht. Quercetin hemmte die Aktivität des EGFR in HT29-Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$  im gleichen Konzentrationsbereich wie die Proteintyrosinkinaseaktivität des isolierten EGFR im ELISA (Abbildung 46A und B; Abbildung 38A). Das Dihydrochalkon Phloretin zeigte bis  $300 \mu\text{M}$  keine Hemmwirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR (Abbildung 46B), während die Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA bei  $43,4 \pm 5,1 \mu\text{M}$  erfolgte.



**Abbildung 46:** Western Blot Analyse zur Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten (100 ng/ml) HT29-Zellen (45 min serumfrei) durch **A:** Quercetin. **B:** Repräsentativer Western Blot für Quercetin, Phloretin und der Beladungskontrolle  $\alpha$ -Tubulin; MW  $\pm$  SD von vier unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ ; K: EGF-stimulierte Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz)

Aufgrund der potenten Hemmwirkung von oligomeren Procyanidinen auf die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA stellte sich nunmehr die Frage, ob solche hochmolekularen Verbindungen auch die Aktivität des EGFR in intakten HT29-Zellen modulieren können. Das getestete Procyanidintrimer verminderte signifikant den Phosphorylierungsstatus des EGFR im niedrigen mikromolaren Bereich ( $IC_{50}$ -Wert =  $35 \pm 15 \mu\text{M}$ ; Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Western Blot Analyse zur Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten (100 ng/ml) HT29-Zellen (45 min, serumfrei) durch ein aus dem Apfelextrakt AE03B aufgereinigtes Procyanidintrimer; MW  $\pm$  SD von vier unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ ; K: EGF-stimulierte Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz), P: Positivkontrolle, EGFR spezifischer Inhibitor Tyrphostin AG1478 [5  $\mu\text{M}$ ];  $\alpha$ -Tubulin, Beladungskontrolle.

Die Hemmwirkung des Procyanidintrimers auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen ist somit um eine Zehnerpotenz geringer als die Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des isolierten EGFR im ELISA (Abbildung 44), was möglicherweise durch die Unterschiede der Testsysteme, isolierte Rezeptorpräparation im Gegensatz zur intakten Zelle, zu erklären ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt (AE02) potent die Autophosphorylierung des EGFR in HT29 Zellen hemmt (Abbildung 45) und somit die potente Hemmwirkung nicht limitiert ist auf das System der isolierten Rezeptorpräparation. Dabei ist die Autophosphorylierung ein Maß für die Rezeptoraktivität und spielt eine wichtige Rolle für die Interaktion der PTK-Domäne mit Elementen der nachgeschalteten MAPK-Kaskade [Boonstra et al, 1995; Liang et al, 1997; Fan et al, 2005]. Im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen [Lee et al, 2002; Sah et al, 2004] konnte Quercetin als potenter Inhibitor der Autophosphorylierung des EGFR

(Abbildung 46) identifiziert werden. Die gezeigten Hemmwirkungen liegen sowohl für den AE02 als auch für das Aglykon Quercetin im Konzentrationsbereich der Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA. Jedoch konnte trotz der zellulären Testsysteme eine Diskrepanz zwischen der Hemmwirkung des Apfelextraktes AE02 auf die Aktivität des EGFR und auf das Wachstum von HT29-Zellen verzeichnet werden. Dies lässt vermuten, dass aufgrund der komplexen phenolischen Zusammensetzung des AE02 verschiedene zelluläre Zielstrukturen angesprochen werden und sich einige Effekte gegenseitig kompensieren.

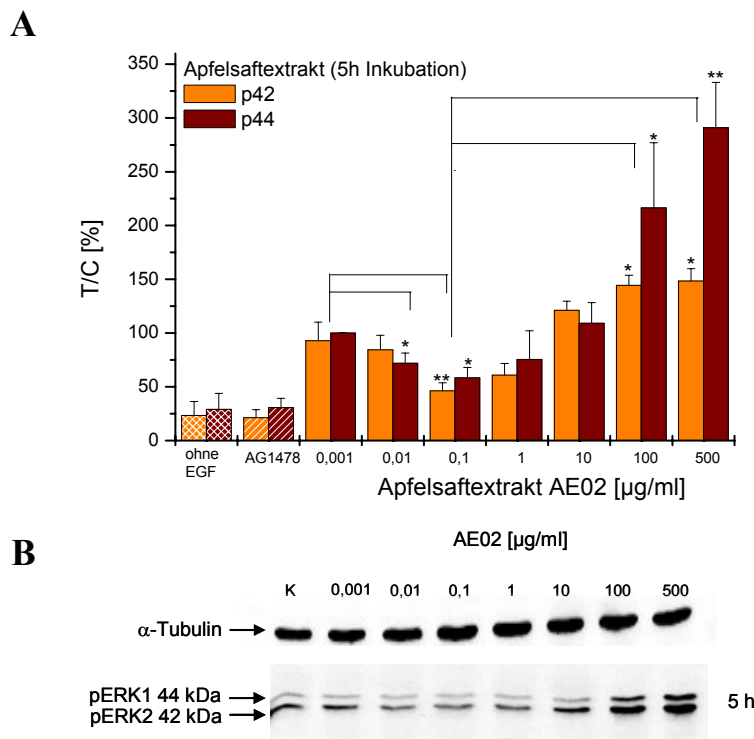
Ebenfalls konnte ein aus dem Apfelextrakt AE03B isoliertes Procyanidintrimer als Inhibitor der Autophosphorylierung des EGFR identifiziert werden (Abbildung 47). Ein Procyanidintetramer hingegen zeigte keine Modulation der Autophosphorylierung des EGFR (ohne Abbildung). Obwohl die inhibitorische Wirkung der Procyanidine auf die PTK-Aktivität des isolierten EGFR mit deren Oligomerisierungsgrad assoziiert zu sein scheint, zeigen die Ergebnisse des zellulären Testsystems deutlich, dass der zellulären Aufnahme eine entscheidende Rolle zukommt. So ist die Hemmwirkung des Procyanidintrimers auf den isolierten Rezeptor um eine Zehnerpotenz stärker als die Hemmwirkung auf den Phosphorylierungsstatus, als Maß für die EGFR-Aktivität in HT29-Zellen. Noch größer ist die Diskrepanz beim Procyanidintetramer, das sich zwar als hoch potenter Inhibitor der PTK-Aktivität im ELISA erwies (Abbildung 44), jedoch nicht den Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen (ohne Abbildung) beeinflusst. Möglicherweise wird das Procyanidintetramer nicht zellulär aufgenommen oder, falls die Procyanidine die Aktivität des EGFR durch Bindung an die Ligandenbindungstasche hemmen, könnte eventuell das Procyanidintetramer aufgrund seiner Größe sterisch an einer Bindung gehindert sein. Jedoch ist bereits beschrieben, dass Procyanidine in Signalkaskaden eingreifen, die entscheidend sind für das Zellwachstum und für die Induktion von Apoptose [Tyagi et al, 2003; Vayalil et al, 2004]. Des Weiteren konnten Gossè et al. [2005] zeigen, dass nur procyanidinhaltiger Apfelextrakt, das Wachstum von humanen Kolonkarzinomzellen *in vitro* effektiv hemmt. Jedoch ist anzumerken, dass aufgrund der eher limitierten Bioverfügbarkeit der Procyanidine zusätzlich noch nicht identifizierte Apfelinhaltsstoffe zur potenten EGFR-Hemmung der Apfelextrakte sowohl im isolierten Testsystem des ELISA als auch in intakten HT29-Zellen beitragen müssen.

Aufgrund der gezeigten Hemmwirkung von Apfelpolyphenolen auf den Phosphorylierungsstatus, als Maß für die Aktivität des EGFR in HT29-Zellen stellt sich nunmehr die Frage, in welchem Umfang dem EGFR nachgeschaltete Signalelemente der mitogen-aktivierten Proteinkinasekaskade in ihrer Aktivität durch Apfelextrakte und ausgewählte Apfelpolyphenole beeinflusst werden.

### **4.2.3 Modulation der extrazellulär regulierten Proteinkinasen (ERK1/2)**

Schlüsselemente der mitogen-aktivierten Proteinkinasekaskade (Abbildung 4) stellen die extrazellulär regulierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 dar. Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 (Abbildung 9) ist dabei ein Maß für die Aktivität der vorgeschalteten Signalkaskade. Die Modulation des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 in HT29-Zellen durch Behandlung mit dem Apfelsaftextrakt AE02 wurde mittels Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen phosphoryliertes ERK1/2 bestimmt. HT29-Zellen wurden dafür 45 min bzw. 5 h serumfrei mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach 30 min wurde für 15 min bzw. 4,5 h in Anwesenheit der Testsubstanzen mit EGF (100 ng/ml) stimuliert.

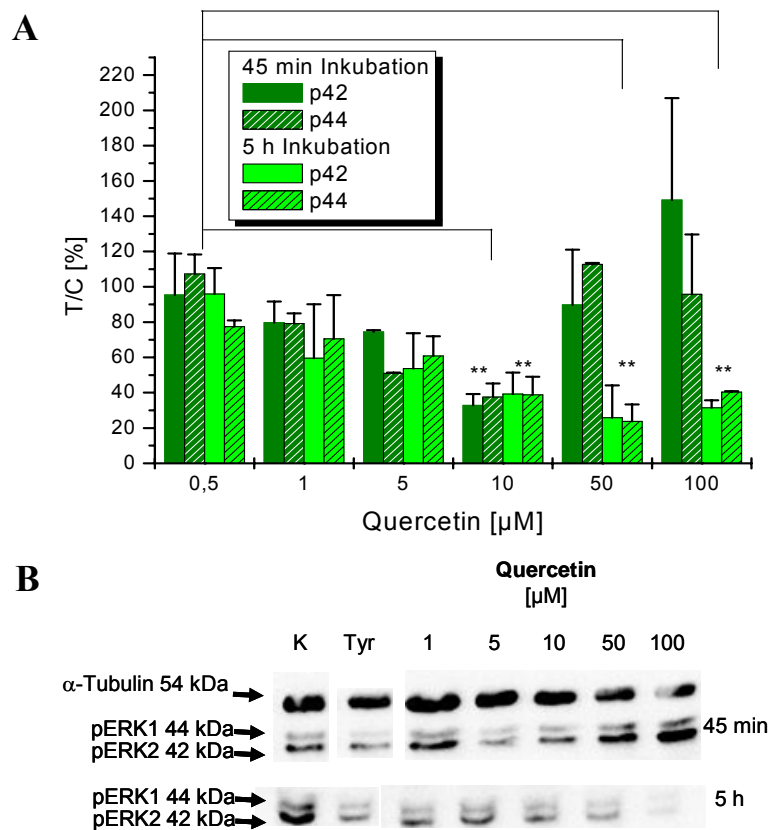
Ab einer Konzentration von 10 ng/ml (0,6 nM Phloridzin Äq.) wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK1 (p44) in HT29-Zellen signifikant durch Inkubation mit Apfelsaftextrakt AE02 (5 h) verringert (Abbildung 48). Ein Minimum des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2 wurde mit 100 ng/ml (6 nM Phloridzin Äq.) erreicht. Ab einer Konzentration von  $\geq 100 \mu\text{g/ml}$  ( $\geq 6 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) war ein signifikanter Wiederanstieg des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2 über das Maß der Kontrolle hinaus zu beobachten (Abbildung 48). Eine Kurzzeitinkubation (45 min) mit bis zu 100  $\mu\text{g/ml}$  (6  $\mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) AE02 führte zu keiner Reduktion des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 (ohne Abbildung).



**Abbildung 48** **A+B:** Western Blot Analyse zur Modulation des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1 (p44) / ERK2 (p42) in EGF-stimulierten (100 ng/ml) HT29-Zellen durch Apfelsaftextrakt AE02 (5 h Inkubation). **B:** Repräsentativer Western Blot für ERK1/2 und  $\alpha$ -Tubulin als Beladungskontrolle. K; EGF-stimulierte DMSO-Kontrolle = 100%; MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test \*  $p$ : < 0,05; \*\*  $p$ : < 0,01.

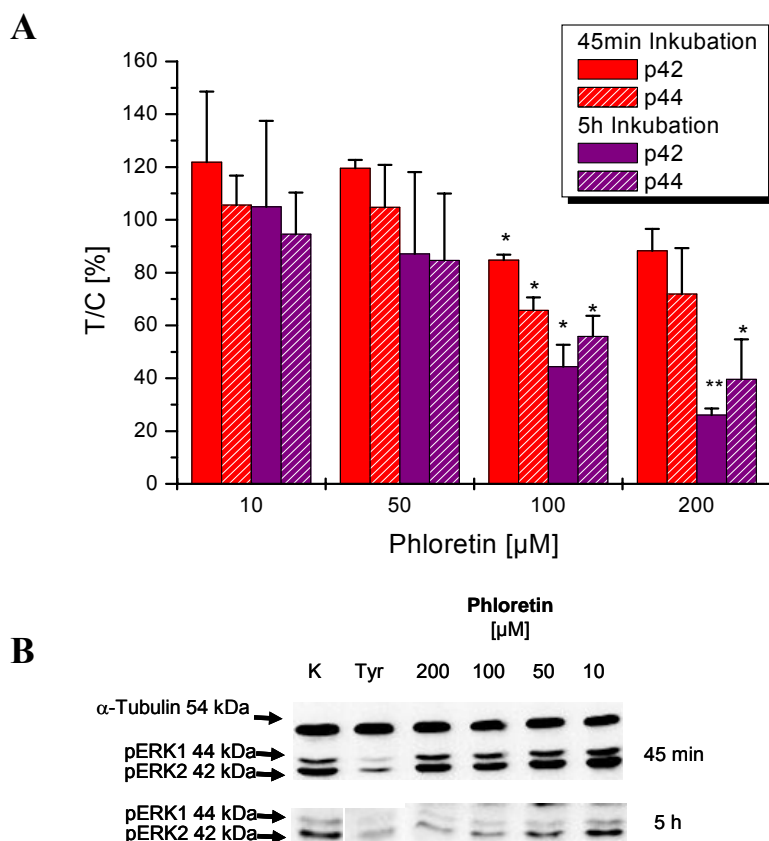
Auch die freien Aglyka Quercetin und Phloretin reduzierten den Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2. Nach 45minütiger Inkubation mit Quercetin zeigte sich ein U-förmiger Kurvenverlauf mit einem Minimum bei 10  $\mu\text{M}$  (Abbildung 49). Ein Wiederanstieg des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2 bei Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  war jedoch nur nach der

Kurzzeitinkubation (45 min) zu beobachten. Die Kurve der fünfstündigen Inkubation verlief bis 10  $\mu\text{M}$  parallel zur Kurzzeitinkubation, stieg aber bei Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  nicht wieder an (Abbildung 49).



**Abbildung 49: A+B:** Western Blot Analyse zur Modulation des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1 (p44) / ERK2 (p42) in EGF-stimulierten (100 ng/ml) HT29-Zellen nach Inkubation mit Quercetin (45 min; 5 h, serumfrei). **B:** Repräsentativer Western Blot für ERK1/2 und  $\alpha$ -Tubulin als Beladungskontrolle; K, EGF stimulierte DMSO-Kontrolle; Tyr, EGFR-spezifischer Inhibitor Tyrphostin AG1478 [1  $\mu\text{M}$ ]; MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test \*\*  $p < 0,01$ .

Phloretin führte nach Kurzzeitinkubation mit 100  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Erniedrigung von phosphoryliertem ERK2 (p42), jedoch wurde bis 200  $\mu\text{M}$  kein  $\text{IC}_{50}$  erreicht (Abbildung 50). Im Gegensatz dazu wurde nach fünfstündiger Inkubation der Status an phosphoryliertem ERK1/2 ab 100  $\mu\text{M}$  signifikant reduziert (Abbildung 50).



**Abbildung 50: A+B:** Western Blot Analyse zur Modulation des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1 (p44) /ERK2 (p42) in EGF-stimulierten (100 ng/ml) HT29-Zellen nach Inkubation mit Phloretin (45 min; 5 h, serumfrei). **B:** Repräsentativer Western Blot für beide Inkubationszeiten und  $\alpha$ -Tubulin als Beladungskontrolle. MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test \*  $p$ : < 0,05; \*\*  $p$ : < 0,01. K, EGF stimulierte DMSO-Kontrolle; Tyr, EGFR-spezifischer Inhibitor Tyrphostin AG1478 [1  $\mu$ M]

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Apfelsaftextrakt AE02 (ohne Abbildung) und das Dihydrochalkon Phloretin (Abbildung 50) nach 45minütiger Inkubation den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 in HT29-Zellen in den getesteten Konzentrationen nicht bzw. nur marginal beeinflussen. Quercetin (10  $\mu$ M, Abbildung 49) bewirkt nach 45minütiger Inkubation eine 50 %ige Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2. Jedoch scheint die Hemmwirkung von Quercetin auf phosphoryliertes ERK1/2 mit einem Optimum verbunden zu sein, da in Konzentrationen  $\geq$  50  $\mu$ M (Abbildung 49) der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 wieder den Ausgangswert erreicht. Nach fünfstündiger Inkubation von HT29-Zellen mit Quercetin ist kein Wiederanstieg des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2 zu verzeichnen (Abbildung 49). Dies könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise während der Kurzzeitinkubation zellkulturspezifische Reaktionsprodukte entstehen, die den Effekt von Quercetin auf ERK1/2 aufheben. So konnte Lapidot et al. [2002] zeigen das durch Zellinkubation *in vitro*  $H_2O_2$  generiert wird, welches als Induktor von ERK1/2 bereits be-



schrieben ist [Hung et al, 2003; Nguyen et al, 2004]. Auch die fünfstündige Inkubation mit AE02 zeigt eine U-förmige Hemmkurve mit einer maximalen Hemmwirkung bei 0,1 µg/ml (Abbildung 48). In Konzentrationen ab 100 µg/ml AE02 (Abbildung 48) steigt der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 sogar signifikant an. Dieser Anstieg ist im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Quercetin wahrscheinlich nicht auf einen direkten Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu begründen, da Studien bereits zeigten, dass entstandenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach einer Stunde nicht mehr im Kulturmedium nachzuweisen ist [Lapidot et al, 2002; Hung et al, 2003; Nguyen et al, 2004]. Insgesamt lässt sich aufgrund der Ergebnisse zur Wachstums- hemmung von HT29-Zellen durch Apfelpolyphenole sagen, dass der gezeigte Wiederan- stieg von phosphoryliertem ERK1/2 zu keinem Wachstumsstimulus der HT29-Zellen führt. Somit können Effekte von Apfelpolyphenolen auf Signalkettenelemente postuliert werden, die den gesetzten Proliferationsstimulus durch die Aktivierung von ERK1/2 kom- pensieren.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse das Apfelpolyphenole auch im intakten Zellsystem den EGFR und ERK1/2, als Elemente seiner nachgeschaltete Kinasekaskade, beeinflussen. Damit stellte sich die Frage, ob die Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung zur Beein- flussung der Gentranskription führt. Ein wichtiges Substrat von ERK1/2 ist der Transkrip- tionsfaktor Elk-1. In einem Reporterassay, der von Hr. Ngiewih im Rahmen seiner Doktorarbeit im Arbeitskreis von Hr. Prof. Eisenbrand durchgeführt wurde, wurde die ERK1/2-abhängige Phosphorylierung von Elk-1 über die damit verbundene Modulation der Luziferaseaktivität bestimmt [Meiers et al, 2001; Kern et al, 2005]. Dafür wurde die humane Vulvakarzinomzelllinie (A431) mit zwei Plasmiden transient cotransfiziert. Dabei handelt es sich um ein Fusionsplasmid, bestehend aus einer DNA-Bindungsdomäne (dbd) und der Elk-1-Aktivierungsdomäne sowie einem Reporterplasmid, welches die vorgeschal- tete Aktivierungsdomäne (UAS) von Gal4 und ein Luziferasegen beinhaltet. Die Akti- vierung der MAPK-Kaskade führt somit nicht nur zu einer Phosphorylierung von nativem Elk-1, sondern auch zur Phosphorylierung des überexprimierten Fusionsproteins. Die Phosphorylierung des Fusionsproteins erlaubt die Bindung an die Gal4-UAS, wodurch die Luziferaseexpression kontrolliert wird [Meiers et al, 2001; Kern et al, 2005]. Die Behand- lung der A431-Zellen mit Apfelsaftextrakt AE02 für 5 h führte zu einer Verminderung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 (IC<sub>50</sub> ≈ 0,1 µg/ml bzw. 6 nM Phloridzin Äq.) als ein Substrat der MAPK/ERK-Kaskade [Kern et al, 2005]. Vergleichend zur Mo- dulation des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 durch fünfstündige Inkubation von

HT29-Zellen mit AE02 (Abbildung 49), führt die Inkubation von A431-Zellen mit AE02 ebenfalls zu einem U-förmigen Kurvenverlauf der Luziferaseexpression im Reportergenassay mit einem Minimum bei 1 µg AE02/ml (60 nm Phloridzin Äq.). Ab einer Konzentration von > 100 µg/ml (6 µM Phloridzin Äq.) ist die Hemmwirkung vollständig aufgehoben [Kern et al, 2005].

Das Dihydrochalkon Phloretin zeigte sich ebenfalls als Inhibitor der Elk-1-vermittelte Luziferase-Aktivität mit einer  $IC_{50}$  von  $26 \pm 1$  µM, wohingegen sich das entsprechende Glukosid Phloridzin als weitestgehend inaktiv erwies [Kern et al, 2005]. Das freie Aglykon Quercetin hemmte die Elk-1-vermittelte Luziferase-Aktivität konzentrationsabhängig mit einem  $IC_{50}$  von  $21 \pm 0,2$  µM [Kern et al, 2005].

Eine Inkubation von HT29-Zellen mit polyphenolreichem Apfelsaftextrakt führt zur Reduktion des Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen ERK1/2, als ein Maß für die Aktivität der EGFR-nachgeschalteten Kaskade (Abbildung 48). Jedoch wird eine Hemmwirkung auf den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 in viel niedrigeren Konzentrationen des Apfelsaftextraktes AE02 (Minimum bei 0,1 µg/ml) erreicht, als eine Hemmung des Tumorzellwachstums ( $IC_{50} = 134 \pm 18$  µg/ml, Abbildung 32) im SRB-Test. Bei Konzentrationen von 10 µg/ml ist die Hemmwirkung des AE02 auf den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 aufgehoben und ab  $\geq 100$  µg/ml kommt es sogar zu einem signifikanten Anstieg des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2 (Abbildung 48). Auch auf der Ebene des Substrates von ERK1/2, dem Transkriptionsfaktor Elk-1 wurde ein U-förmiger Kurvenverlauf im Reportergenassay verzeichnet. Jedoch überlagern sich die U-Kurven in den zwei Testsystemen nicht komplett. Bei einer Konzentration des AE02 von 100 µg/ml kommt es zur Induktion des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 in HT29-Zellen (Abbildung 48), wohingegen der Gehalt an phosphoryliertem Elk-1 in A431-Zellen um ca. 50 % reduziert ist [Kern et al, 2005]. Die Unterschiede könnten durch die verschiedenen Zellsysteme begründete werden. Jedoch sind beide Zelllinien, sowohl HT29-Zellen als auch A431-Zellen dafür bekannt, dass sie den EGFR überexprimieren und ihr Wachstum durch EGFR-spezifische Inhibitoren, wie z. B. Tyrphostin AG1478, gehemmt wird [Giard et al, 1973; Meiers et al, 2001; Marko et al, 2004; Kern et al, 2005].

Das Aglykon Quercetin verringert den Phosphorylierungsstatus der untersuchten Signalkettenelemente (ERK1/2 und Elk-1) trotz unterschiedlicher Zellsysteme im vergleichbaren Konzentrationsbereich ( $IC_{50}(\text{ERK1/2}, 5 \text{ h}) \approx 10$  µM,  $IC_{50}(\text{Elk-1}) \approx 20$  µM). Spencer et al.

[2003] konnten ebenfalls eine Inhibierung des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nachgeschalteten Elementen durch Quercetin nachweisen. Phloretin zeigte eine potente Hemmwirkung auf die Elk-1-Phosphorylierung von A431 im Reporterassay; erwies sich jedoch als deutlich schlechterer Inhibitor von phosphoryliertem ERK1/2 ( $IC_{50}(\text{ERK1/2}, 5 \text{ h}) \approx 150 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}(\text{Elk-1}) \approx 26 \mu\text{M}$ ) [Kern et al, 2005].

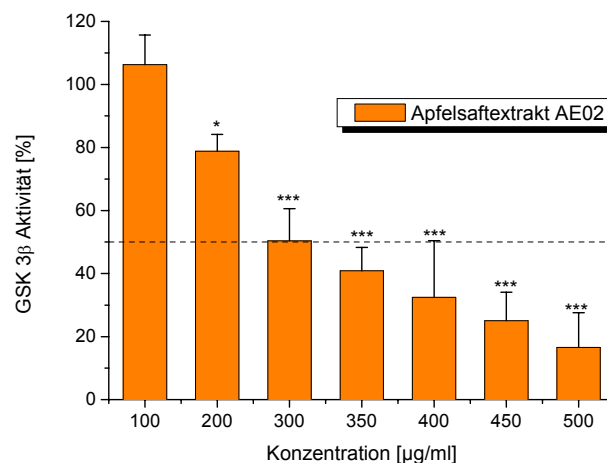
Abschließend lässt sich sagen, dass AE02, Phloretin und Quercetin auch in zellulären Testsystemen den EGFR, sowie Elemente der nachgeschalteten MAPK-Kaskade und die davon abhängige Gentranskription, beeinflussen. Jedoch sind vor allem bei dem polyphenolreichen Apfelsaftextrakt AE02 und dem Flavonol Quercetin, neben ihren EGFR-hemmenden Eigenschaften zusätzliche Effekte zu beobachten, die zum Teil in höheren Konzentrationen (Abbildung 48, Abbildung 49), die Inhibierung der Aktivität von Elementen der MAPK-Kaskade wieder aufheben. Interessanterweise kommt es durch die Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 nicht zu einer gesteigerten Zellproliferation von HT29-Zellen [Kern et al, 2005]. Diese Ergebnisse zeigen, dass wahrscheinlich weitere Signalkettenelemente, die entscheidend sind für das Zellwachstum, durch den AE02 beeinflusst werden und somit mögliche pro-proliferative Effekte durch höhere Konzentrationen des AE02 kompensiert werden.

### 4.3 Modulation des Wnt-Signalweges durch Apfelpolyphenole

#### 4.3.1 Beeinflussung der Aktivität isolierter Glykogensynthasekinase-3 $\beta$

Veränderungen im Wnt-Signalweg (Abbildung 10) spielen eine wichtige Rolle in der Kolonkanzerogenese. Mutationen von Komponenten des Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweges finden sich deshalb in einer Vielzahl kolorektaler Karzinome. Eine zentrale Schaltstelle dieses Signalweges stellt die Glykogensynthasekinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) als wesentlicher Regulator des zellulären  $\beta$ -Catenin-Spiegels dar. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Apfelpolyphenole die Aktivität der GSK3 $\beta$  modulieren.

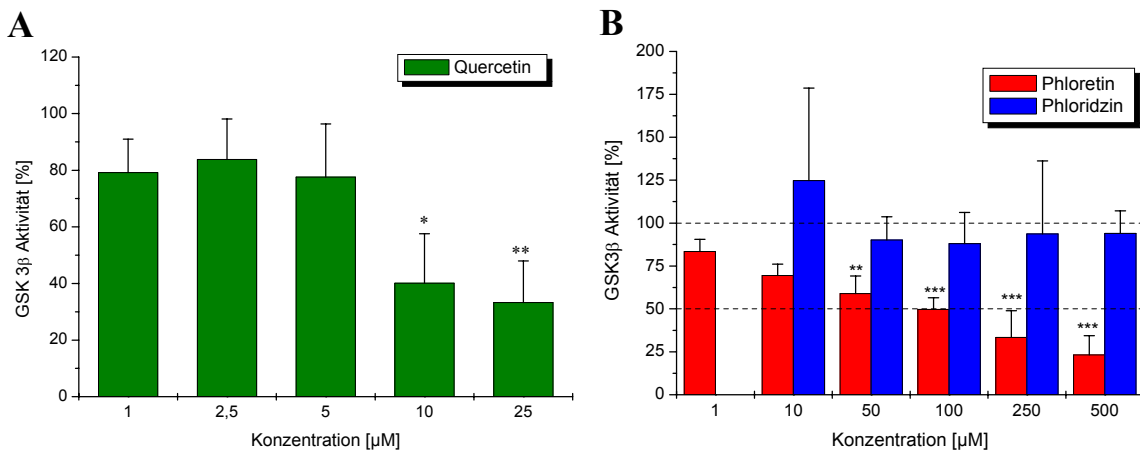
Die Bestimmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität erfolgte durch Messung der Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein GSK3 $\beta$ -spezifisches Substratpeptid unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (Kapitel 6.12). Zur Validierung des Testsystems, wurde der aus der Literatur bekannte GSK3 $\beta$ -Hemmstoff Lithiumchlorid eingesetzt [Ryves und Harwood, 2001; Jope, 2003; Zhang et al, 2003]. Lithiumchlorid inhibiert in einer Konzentration von 10 mM potent die Aktivität, der aus HT29-Zellen immunopräzipitierten GSK3 $\beta$  im Kinase Assay (60 % Reduktion, ohne Abbildung).



**Abbildung 51:** Modulation der isolierten immunopräzipitierten GSK3 $\beta$ -Aktivität aus HT29-Zellen durch den Apfelsaftextrakt AE02 getestet im GSK3 $\beta$ -Kinaseassay (15 min; 37° C). MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Doppelbestimmung. Student's *t*-Test (bezogen auf 100  $\mu$ g/ml AE02) \* *p*: < 0,05; \*\* *p*: < 0,01; \*\*\* *p*: < 0,001.

Bei Zugabe von AE02 zu isolierter (immunopräzipitierter) GSK3 $\beta$  zeigte sich ab einer Konzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (19  $\mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) eine signifikante Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität ( $\text{IC}_{50} = 329 \pm 30 \mu\text{g}/\text{ml}$  bzw.  $21 \pm 2 \mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) (Abbildung 51).

Quercetin (Abbildung 52A) erwies sich als potenter Hemmstoff isolierter GSK3 $\beta$  ( $\text{IC}_{50} = 7,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ). Das Dihydrochalkon Phloretin zeigte im Vergleich zu Quercetin eine deutlich geringere Hemmwirkung ( $\text{IC}_{50} = 123 \pm 27 \mu\text{M}$ , Abbildung 52B). Das entsprechende Glukosid Phloridzin führte bis zu Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  zu keiner Modulation der GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 52B).



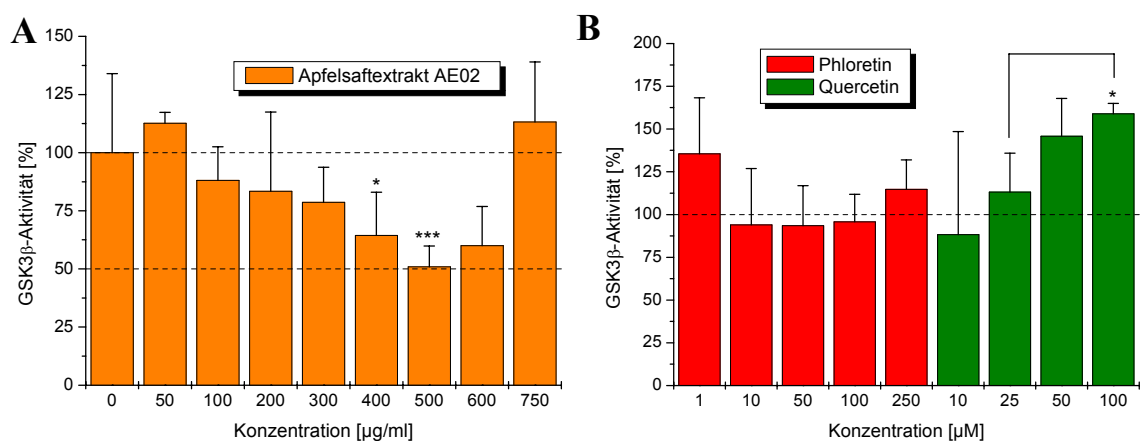
**Abbildung 52:** Modulation der isolierten immunopräzipitierten GSK3 $\beta$ -Aktivität aus HT29-Zellen getestet im Kinaseassay (15 min; 37° C) durch **A:** Quercetin und **B:** die Dihydrochalkone Phloretin und Phloridzin. MW  $\pm$  SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten in einer Doppelbestimmung. Student's *t*-Test (bezogen auf 1  $\mu\text{M}$  Quercetin bzw. Phloretin) \*p: < 0,05; \*\* p: < 0,01; \*\*\* p: <

Das Dihydrochalkon Phloretin, das Flavonol Quercetin sowie ein komplexes „Lebensmittel“ in Form eines polyphenolreichen Apfelextraktes konnten als Inhibitoren der Aktivität isolierter GSK3 $\beta$  identifiziert werden. Eine effiziente Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität könnte zu einem Anstieg an nicht phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin und somit zur  $\beta$ -Catenin-vermittelten Genexpression führen. Es wurde deshalb Frage nachgegangen, ob es auch im Zellsystem zu einer eher unerwünschten Aktivitätshemmung an GSK3 $\beta$  durch den Apfelsaftextrakt und die Aglyka Phloretin und Quercetin kommt.

### 4.3.2 Beeinflussung der zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität in HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden für 24 h serumfrei mit dem Apfelsaftextrakt bzw. mit ausgewählten Flavonoiden inkubiert. Nach Immunopräzipitation wurde die GSK3 $\beta$ -Aktivität durch Übertragung von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP auf ein Substratpeptid (Kapitel 6.12.7) bestimmt.

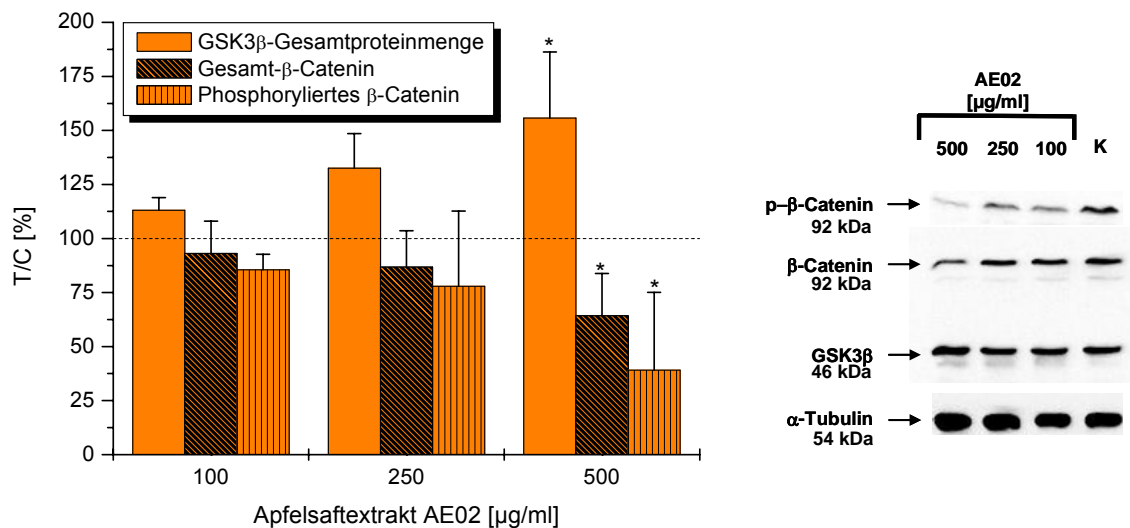
Nach Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 zeigte sich ab einer Konzentration von 400  $\mu$ g/ml (26  $\mu$ M Phloridzin Äq.) eine signifikante Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 53A). Ab einer Konzentration von  $\geq$  500  $\mu$ g/ml (48  $\mu$ M Phloridzin Äq.) war ein signifikanter Wiederanstieg der GSK3 $\beta$ -Aktivität im Bezug auf die Hemmwirkung bei 500  $\mu$ g/ml zu beobachten. Die Grundaktivität wurde nach Inkubation der HT29-Zellen mit 750  $\mu$ g/ml AE02 (48  $\mu$ M PE Äq) wieder erreicht (Abbildung 53A). Bei der Behandlung intakter HT29-Zellen mit Apfelsaftextrakt ist damit, im Gegensatz zur Wirkung am isolierten Enzym, die Hemmwirkung an der GSK3 $\beta$  deutlich geringer (Abbildung 51). Im Gegensatz zu den Ergebnissen an isolierter (immunopräzipitierter) GSK3 $\beta$ , bewirkte Quercetin in HT29-Zellen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 53B). Die Inkubation von HT29-Zellen mit dem Dihydrochalkon Phloretin führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der GSK3 $\beta$ -Aktivität in Zellkultur (Abbildung 53B).



**Abbildung 53:** Modulation der immunopräzipitierten GSK3 $\beta$ -Aktivität nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen mit **A:** Apfelsaftextrakt AE02. **B:** die Aglyka Phloretin, und Quercetin (Lösungsmittelkonzentration DMSO 1 %). MW  $\pm$  SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung; Student's *t*-Test bezogen auf **A:** DMSO-Kontrolle und **B:** 25  $\mu$ M Quercetin\* *p*: < 0,05, \*\*\*: *p* < 0,001.

### 4.3.3 Beeinflussung des Proteingehaltes an GSK3 $\beta$ , $\beta$ -Catenin und phosphoryliertem $\beta$ -Catenin in HT29-Zellen

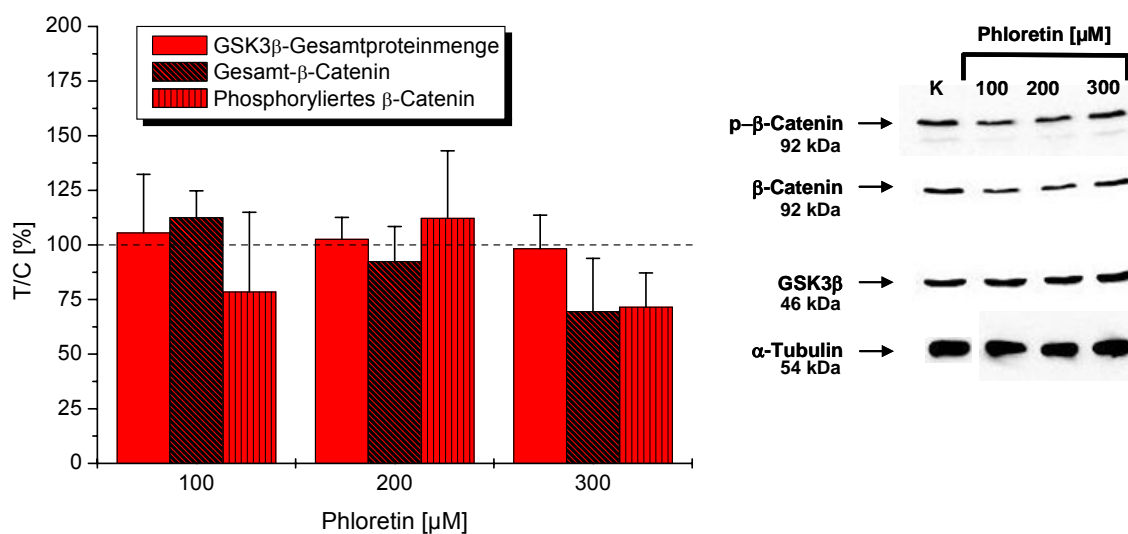
Des Weiteren stellte sich die Frage, inwieweit die Modulation der zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität sich auf den Gesamtgehalt an  $\beta$ -Catenin sowie den Status an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin auswirkt. Die Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität nach Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 (Abbildung 53A) lassen eine Abnahme an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin vermuten. Damit könnte ein gleichzeitiger Anstieg des Proteingehaltes an  $\beta$ -Catenin verbunden sein. Deshalb wurde die Beeinflussung der  $\beta$ -Catenin-Homöostase durch Apfelpolyphenole mittels Western Blot Analyse (Kapitel 6.13) mit polyklonalen Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin (92 kDa) und phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (92 kDa) an HT29-Zellen bestimmt. Gleichzeitig wurde der Proteingehalt an GSK3 $\beta$  detektiert, um die Frage zu klären, inwieweit sich die beschriebene Aktivitätshemmung der GSK3 $\beta$  im Proteinstatus widerspiegelt. Nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 in einer Konzentration von 500  $\mu$ g/ml (32,4  $\mu$ M Phloridzin Äq.) nimmt die Gesamtproteinmenge an GSK3 $\beta$  signifikant zu (Abbildung 54), obwohl die GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 53A) gleichzeitig abnimmt.



**Abbildung 54:** Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin und phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 (1 % DMSO im Endansatz). Die Expression an  $\alpha$ -Tubulin wurde als Beladungskontrolle bestimmt. MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test (bezogen auf 100  $\mu$ g/ml AE02) \* *p*: < 0,05; K: Lösungsmittelkontrolle.

Der Gehalt an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin nimmt ab (Abbildung 54), was aufgrund der Ergebnisse der GSK3 $\beta$ -Aktivitätsbestimmung zu erwarten war. Eine Abnahme an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin lässt einen verminderten Abbau und damit eine Zunahme der Gesamt- $\beta$ -Catenin-Proteinmenge erwarten. Trotz signifikanter Abnahme der Menge an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin war allerdings bei Behandlung der HT29-Zellen mit AE02, ebenfalls eine Abnahme der Gesamt- $\beta$ -Catenin-Proteinmenge zu beobachten (Abbildung 54).

Eine 24-stündige serumfreie Inkubation von HT29-Zellen mit dem Dihydrochalkon Phloretin führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Proteinmenge der untersuchten Elemente des Wnt-Signalweges (Abbildung 55). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten aus den GSK3 $\beta$ -Aktivitätsuntersuchungen nach Zellinkubation, in denen sich Phloretin ebenfalls als unwirksam erwies (Abbildung 53B).



**Abbildung 55:** Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin und phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen mit Phloretin (1 % DMSO im Endansatz). Die Expression an  $\alpha$ -Tubulin wurde als Beladungskontrolle bestimmt. MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten; K: Lösungsmittelkontrolle.

Apfelpolyphenole konnten als potente Inhibitoren der GSK3 $\beta$ -Aktivität der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 identifiziert werden. Der stärkere inhibitorische Effekt von Apfelpolyphenolen auf die isolierte GSK3 $\beta$  lässt darauf schließen, dass die Enzymaktivität direkt durch Apfelinhaltsstoffe beeinflusst wird (Abbildung 51 + Abbildung 53A). Dies



lässt vermuten, dass in HT29-Zellen die GSK3 $\beta$ -Aktivitätshemmung durch Apfelpolyphenole auf direkte Interaktionen mit dem Zielenzym beruht und nicht durch Modulation vorgeschalteter Signalelementen zu begründen ist. Jedoch kann ein zusätzlicher Beitrag zur GSK3 $\beta$ -Aktivitätshemmung durch die Modulation weiterer Signalelemente bzw. Kinasen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Interessanterweise wird die abnehmende Enzymaktivität begleitet von einem Anstieg der Gesamtproteinmenge an GSK3 $\beta$  (Abbildung 54). Dies lässt möglicherweise auf ein Gegensteuern der Zellen schließen, um die GSK3 $\beta$ -Aktivitätshemmung zu kompensieren. Die potente Hemmung der GSK3 $\beta$  durch den polyphenolreichen Apfelsaftextrakt AE02 führt zur Frage, welche(r) Inhaltsstoff(e) dafür verantwortlich ist (sind). Das für den Apfel charakteristische Dihydrochalcon Phloridzin zeigte bis 500  $\mu$ M keine Hemmwirkung, weder auf die isolierte immunopräzipitierte (Abbildung 52B) noch auf die zelluläre GSK3 $\beta$  (ohne Abbildung). In 500  $\mu$ g/ml AE02 sind 32  $\mu$ M Phloridzin enthalten, weshalb ein Beitrag von Phloridzin zur Aktivitätshemmung der GSK3 $\beta$  durch AE02 auszuschließen ist. Das freie Aglykon wurde noch nicht im Apfelsaftextrakt nachgewiesen [Kern et al, 2005; Schäfer et al, 2005; Veeriah et al, 2006]. Im Gegensatz zum Glykosid erwies sich Phloretin als potenter Inhibitor der isolierten GSK3 $\beta$  (Abbildung 52). Jedoch beeinflusst auch Phloretin ebenso wie Phloridzin die zelluläre GSK3 $\beta$ -Aktivität nicht (Abbildung 53B). Falls Phloretin durch eine Deglykosylierung von Phloridzin, durch die gastrointestinale Mikroflora *in vivo*, entstehen würde, wäre trotzdem kein Effekt auf die GSK3 $\beta$ -Aktivität zu erwarten.

Das Flavonol Quercetin konnte als potenter Inhibitor isolierter immunpräzipitierter GSK3 $\beta$ -Aktivität identifiziert werden (Abbildung 52A). Jedoch im Falle von Quercetin ist der Unterschied der Effekte auf die isolierte GSK3 $\beta$  im Vergleich zur zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität noch ausgeprägter als für Phloretin (Abbildung 52A + B, Abbildung 53B). Trotz seiner inhibitorischen Eigenschaften gegen isolierte GSK3 $\beta$ , erhöht Quercetin signifikant die GSK3 $\beta$ -Aktivität in HT29-Zellen. Quercetin wurde jedoch bislang nicht als freies Aglykon im Apfelsaftextrakt nachgewiesen [Kern et al, 2005; Schäfer et al, 2005]. Die Quercetinglykoside, Q-3-gal, Q-3-glu, Q-3-rha und Q-3-rut, liegen im Apfelsaftextrakt AE02 mit einer Konzentration von  $\sim$ 9  $\mu$ g/ml (Tabelle 9) vor. In unterschiedlichen *in vitro* Testsystemen erwiesen sich die Quercetinglykoside als inaktiv bzw. weniger effektiv im Vergleich zum Aglykon [Shen et al, 2003; Kern et al, 2005; Veeriah et al, 2006]. Da Quercetin nicht die GSK3 $\beta$ -Aktivität in HT29-Zellen hemmt, ist es unwahrscheinlich, dass die Quercetinglykoside zu den inhibitorischen Eigenschaften des AE02 auf die GSK3 $\beta$ -

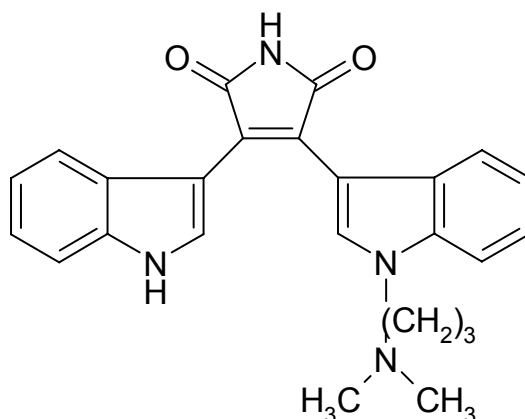
Aktivität beitragen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 noch nicht identifizierte Inhaltsstoffe enthält, die die GSK3 $\beta$  direkt beeinflussen und effektiv die GSK3 $\beta$ -Aktivität in HT29-Zellen hemmen.

Eine Hemmung der zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität lässt eine Abnahme an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin, verbunden mit einem Anstieg an nicht phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin, erwarten. In Konzentrationen des Apfelsaftextraktes AE02 (500  $\mu$ g/ml), in denen eine signifikante GSK3 $\beta$ -Aktivitätshemmung detektiert wurde (Abbildung 51, Abbildung 53A), wurde eine signifikante Abnahme des Proteingehaltes von phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin verzeichnet (Abbildung 54). Jedoch unerwarteterweise, nimmt der Proteingehalt an  $\beta$ -Catenin ebenfalls ab (Abbildung 54). Offensichtlich ist die Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität nicht assoziiert mit der Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in humanen Kolonkarzinomzellen. Die signifikante Reduktion des Proteingehaltes an  $\beta$ -Catenin geht möglicherweise einher mit Interaktionen von Apfelpolyphenolen mit vorgeschalteten Signalelementen bzw. mit anderen Signalwegen oder Effekten auf die Gentranskription. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits eine hoch potente Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes AE02 auf den EGFR und die nachgeschaltete MAPK-Kaskade (Kapitel 4.2) gezeigt werden. Des Weiteren induziert der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt Apoptose (Kapitel 4.5) in HT29-Zellen. Ein procyanidinreicher Apfelextrakt wurde ebenfalls als Apoptoseinduktor von humanen Kolonkarzinomzellen identifiziert [Gossé et al, 2005]. Die Modulation der Expression/Aktivität von Signaltransduktionskaskaden, die entscheidend sind für die Regulation des Zellwachstums und/oder der Induktion von Apoptose, könnten zur Kompensation der GSK3 $\beta$ -inhibitorischen Effekte beitragen. Im Einklang mit den Ergebnissen auf die  $\beta$ -Catenin-Homöostase wird auch die Tcf/Lef-vermittelte Gentranskription durch den Apfelsaftextrakt AE02 nicht beeinflusst [Kern et al, *J. Agric. Food Chem.*, eingereicht].

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass Apfelpolyphenole in Konzentrationen, wie sie im Originalextrakt (500 mg/l) vorliegen keine wachstumsstimulierenden Effekte über den Wnt-Signalweg in HT29-Zellen induzieren. Im Hinblick auf die durch Apfelpolyphenole vermittelte Abnahme der Gesamt- $\beta$ -Catenin-Proteinmenge ist zu vermuten, dass die Modulation von Elementen des Wnt-Signalweges möglicherweise einen Beitrag zur wachstumshemmenden Wirkung leistet.

#### 4.4 Modulation der Proteinkinase C-Aktivität durch Apfelpolyphenole

Eine besondere Schlüsselrolle bei der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen spielt die Proteinkinase C (PKC). Es wurde der Frage nachgegangen, ob und inwieweit der Apfelsaftextrakt bzw. dessen Inhaltsstoffe die PKC-Aktivität im Kolon beeinflussen. Hierbei wurden humane Kolonkarzinomzellen (HT29) im Vergleich zu primären humanen Enterozyten aus Biopsiematerial untersucht. Zur Charakterisierung der Enzymaktivität wurde der selektive PKC-Inhibitor GF109203X (2-[1-(3-Dimethylamino-propyl)indol-3-yl]-3-(1*H*-indol-3-yl)-maleimid), Abbildung 56) eingesetzt [Toulec et al, 1991]. Die PKC-Aktivität wurde durch Messung der Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein PKC-spezifisches Substratpeptid unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (Kit RPN 77, Amersham Bioscience, Kapitel 6.11) bestimmt.



**Abbildung 56:** PKC-spezifischer Inhibitor Bisindolylmaleimid GF109203X

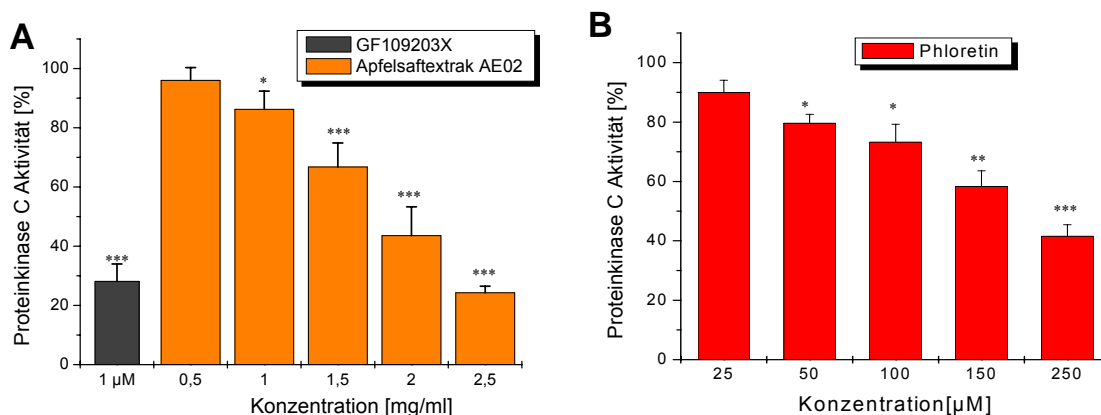
##### 4.4.1 Direkte Hemmwirkung am Enzym

Hierzu wurde ein zytosolisches PKC-haltiges Zelllysate hergestellt und unmittelbar vor dem PKC-Assay mit dem Apfelextrakt AE02 bzw. den entsprechenden Einzelverbindungen versetzt. Hierdurch wurde die Hemmwirkung der Verbindungen am Enzym selbst erfasst. Der PKC-spezifische Inhibitor GF109203X (Abbildung 56) führte bereits in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer 70 %igen Hemmung der zytosolischen PKC-Aktivität (Abbildung 57A).

Der polyphenolreiche Apfelextrakt AE02 zeigte erst ab einer Konzentration von 1 mg/ml eine signifikante Hemmung der PKC-Aktivität ( $IC_{50} = 1,9 \pm 0,7$  mg/ml bzw.  $120 \pm 4$   $\mu$ M Phloridzin Äq, Abbildung 57A).

Von den bislang im Apfelsaftextrakt identifizierten Verbindungen zeigte EC in der höchsten getesteten Konzentration von 300  $\mu$ M eine marginale Hemmwirkung auf die isolierte zytosolische PKC-Aktivität aus HT29-Zellen, ohne jedoch den  $IC_{50}$ -Wert zu erreichen (20 % Aktivitätshemmung, ohne Abbildung). Die Quercetinglykoside Q-3-glc und Q-3-rha stellten schwache Hemmstoffe der PKC mit  $IC_{50}$ -Werten  $>100$   $\mu$ M dar (ohne Abbildung). Rutin, Q-3-gal, die Procyanidine PB1 und PB2, die Hydroxyzimtsäurederivate Chlorogensäure, Kaffeesäure und 4-Cumaroylchinasäure erwiesen sich ebenso wie das Dihydrochalkonglykosid Phloridzin bis 300  $\mu$ M als unwirksam (ohne Abbildung). Rutin ist in der Literatur bereits als ineffektiv im Hinblick auf die PKC-Aktivität beschrieben [Ferriola et al, 1989; Lee und Lin, 1997].

Das freie Dihydrochalon Phloretin hingegen zeigte eine signifikante Hemmwirkung bereits ab 50  $\mu$ M (Abbildung 57B), ist jedoch mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $203 \pm 19$   $\mu$ M zu den schwachen Hemmstoffen der PKC zu rechnen. Phloretin ist als Inhibitor isolierter PKC-Aktivität in der Literatur beschrieben [Ferriola et al, 1989; Kobori et al, 1999].



**Abbildung 57:** Beeinflussung der isolierten zytosolischen PKC-Aktivität aus HT29-Zellen durch **A:** AE02 und **B:** Phloretin. Gemessen wurde die Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein PKC-spezifisches Substratpeptid unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP (Kit RPN 77, Amersham Bioscience). Bisindoylmaleimid GF109203X, spezifischer PKC-Hemmstoff; MW  $\pm$  SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test bezogen auf **A:** 0,5 mg/ml AE02 und auf **B:** 25  $\mu$ M Phloretin \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Ebenfalls wurde Quercetin, dessen Hemmwirkung auf die PKC-Aktivität bereits in der Literatur beschrieben ist [Agullo et al, 1997; Varadkar et al, 2001; Williams et al, 2004], bei den Untersuchungen mitgeführt. Jedoch konnten in dem verwendeten Testsystem aufgrund limitierter Löslichkeit von Quercetin, nur Konzentrationen bis 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt und deshalb kein  $\text{IC}_{50}$ -Wert ermittelt werden (40 % Hemmung bei 25  $\mu\text{M}$ ; ohne Abbildung).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 in Konzentrationen  $\geq 1$  mg/ml (ca. 60  $\mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) signifikant die Aktivität isolierter PKC aus HT29-Zellen hemmt. Von den bereits identifizierten Inhaltsstoffen, besitzen EC und die Quercetinglykoside, Q-3-rha und Q-3-glc marginale Hemmwirkung auf die isolierte PKC-Aktivität. Im Originalextrakt liegen die marginal wirksamen Verbindungen in nanomolaren Konzentrationen vor, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die bislang identifizierten Inhaltsstoffe nur wenig zur Hemmwirkung des Originalextraktes beitragen. Der PKC-Inhibitor Phloretin wurde bislang nicht in seiner freien Form im Apfelsaftextrakt beschrieben. Aber auch bei einer Freisetzung von Phloretin aus Phloridzin, z. B. durch chemische Instabilität unter den gewählten Inkubationsbedingungen, würden maximal 63  $\mu\text{M}$  Phloretin entstehen, was eine 20 %ige Hemmung der PKC-Aktivität durch Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  Phloridzin Äq. AE02 erwarten ließe. Die Ergebnisse an isolierter PKC lassen darauf schließen, dass bislang nicht charakterisierte Apfelpolyphenole im Wesentlichen für die Hemmwirkung des polyphenolreichen Apfelsaftextraktes verantwortlich sind.

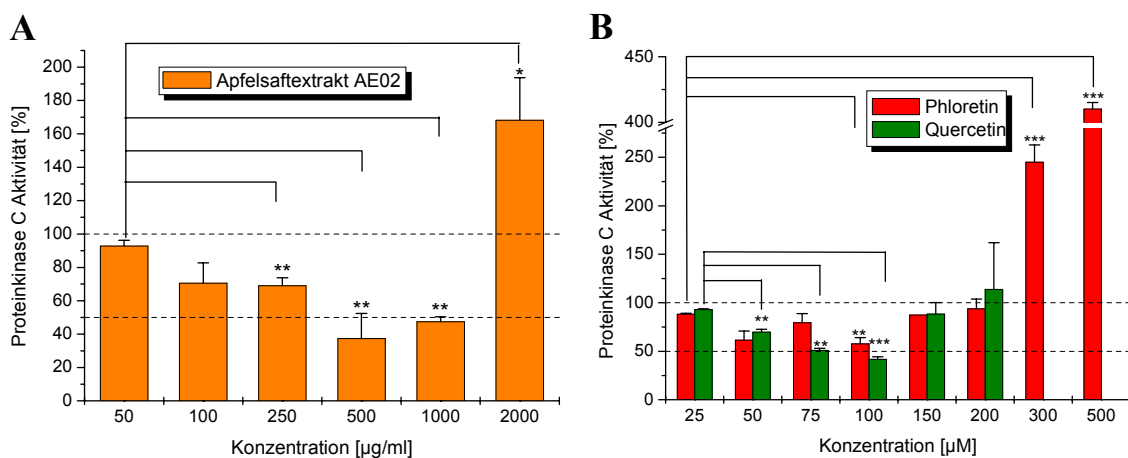
#### 4.4.2 Modulation der zellulären PKC-Aktivität in HT29-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Hemmwirkung des Apfelextrakts begrenzt ist auf die direkte Interaktion mit dem isolierten Enzym, oder ob auch durch Inkubation von HT29-Zellen eine Modulation der PKC-Aktivität erfolgt. In diesen Untersuchungen wurde der charakteristische Apfelinhaltsstoff Phloridzin sowie die Aglyka Phloretin und Quercetin mitgeführt. Zur Charakterisierung der Enzymaktivität wurde der PKC-Hemmstoff GF109203X (Abbildung 56) in einer Konzentration von 100 nM bei jedem Versuchsansatz mitgeführt.

Die HT29-Zellen wurden für 24 h serumfrei mit dem polyphenolreichen Extrakt bzw. den Einzelsubstanzen inkubiert und anschließend die PKC-Aktivität aus dem Zytosol der HT29-Zellen mittels PKC-Assay (Kit RPN 77, Amersham Bioscience) bestimmt.

Der spezifische PKC-Inhibitor GF109203X inhibiert die zytosolische PKC-Aktivität von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in einer Konzentration von 100 nM zu 80 % (ohne Abbildung).

Bereits bei 250 µg/ml Apfelextrakt (ca. 15 µM Phloridzin Äq.) war eine signifikante Hemmung der intrazellulären PKC-Aktivität in HT29-Zellen zu beobachten (Abbildung 58A). Bei Inkubation der Zellen mit dem Extrakt wurde damit eine stärkere Hemmwirkung auf die PKC induziert, als dies an der isolierten Enzympräparationen zu beobachten war. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass in der Zelle zusätzlich zur PKC vorgeschaltete Signalelemente gehemmt werden, die so den hemmenden Effekt auf die PKC-Aktivität verstärken könnten. Auch Eingriffe in die Expression der PKC könnten zu einer zusätzlichen Verringerung der PKC-Aktivität führen, die über die reine Enzymhemmung hinausgeht. Gossé et al. [2005] zeigten eine 70 %ige Reduktion der PKC-Aktivität durch 24-stündige Inkubation von SW620 Kolonkarzinomzellen mit einem procyanidinreichen Apfelextrakt.



**Abbildung 58:** Modulation der zytosolischen PKC-Aktivität von HT29-Zellen nach 24-stündiger serumfreier Inkubation mit A: AE02 und B: Phloretin bzw. Quercetin. Gemessen wurde die Übertragungsrates von Phosphatresten auf ein PKC-spezifisches Substratpeptid unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP (Kit RPN 77, Amersham Bioscience). MW  $\pm$  SD von mindestens fünf unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung; Student's *t*-Test \* *p*: < 0,05; \*\* *p*: < 0,01; \*\*\*: *p* < 0,001

Die Hemmung der zellulären PKC-Aktivität durch Apfelextrakt scheint allerdings ein Optimum bei ca. 500 µg/ml Extrakt (ca. 32 µM Phloridzin Äq.) zu erreichen (Abbildung 58A). Eine weitere Konzentrationserhöhung führte zu einem Anstieg der Enzymaktivität,

wobei bei 2000 µg/ml (128 µM PE Äq.) sogar eine signifikante Aktivierung im Bezug zu 50 µg/ml zu beobachten war. Gleichzeitig war allerdings ab Konzentrationen > 500 µg/ml (32 µM PE Äq.) eine deutliche Abnahme der Zellzahl zu beobachten (ohne Abbildung).

Ähnliche Effekte wurden bei Inkubation von HT29-Zellen mit den Aglyka Phloretin und Quercetin beobachtet (Abbildung 58B). Quercetin zeigte bereits eine signifikante Hemmwirkung ab einer Konzentration von 50 µM. Die maximale Hemmwirkung wurde bei 100 µM erreicht. Ab einer Konzentration von > 100 µM konnte ein hoch signifikanter Anstieg der PKC-Aktivität (Abbildung 58B) im Vergleich zu 100 µM beobachtet werden, der assoziiert war mit der Abnahme der Zellzahl (ohne Abbildung). Jedoch erwies sich der Anstieg als nicht signifikant gegenüber der PKC-Aktivität der niedrigsten Quercetinkonzentration.

Das Aglykon Phloretin erwies sich als Hemmstoff der PKC-Aktivität in HT29-Zellen (100 µM), jedoch wurde der IC<sub>50</sub>-Wert nicht erreicht (Abbildung 58B). Ab einer Phloretinkonzentration von 300 µM konnte ein hoch signifikanter Anstieg der PKC-Aktivität im Vergleich zum Ausgangsniveau detektiert werden (Abbildung 58B). Auch die PKC-Aktivitätssteigerung durch die Inkubation der HT29-Zellen mit Phloretin ging einher mit einem Zellverlust (ohne Abbildung). Das Glykosid Phloridzin erwies sich bis zu einer Konzentration von 500 µM (24 h serumfreie Inkubation, ohne Abbildung) als unwirksam (keine Abnahme der Zellzahl bei 500 µM, ohne Abbildung).

Nachdem keine PKC-Aktivierung durch Zugabe des Extraktes bzw. Phloretin und Quercetin zu isolierter Enzympräparation zu beobachten war, ist eine direkte substanzvermittelte Aktivierung, wie dies beispielsweise durch Phorbolster und/oder Ca<sup>2+</sup> für bestimmte PKC-Isoformen beschrieben ist [Demsey et al, 2000], auszuschließen. Eine Aktivierung der PKC ist jedoch als Teil apoptotischer Prozesse beschrieben [Mandil et al, 2001; Basu und Miura, 2002; Gutcher et al, 2003; Basu, 2003]. Ebenfalls ist anzumerken, dass in den Konzentrationsbereichen, in denen eine scheinbare PKC-Aktivierung statt findet, gleichzeitig auch das Wachstum von HT29-Zellen durch die Apfelpolyphenole gehemmt wird (ohne Abbildung). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen, die Behandlung von HT29-Zellen mit Apfelsaftextrakt oder den Aglyka Phloretin und Quercetin zur Induktion von Apoptose führt (Kapitel 4.5).

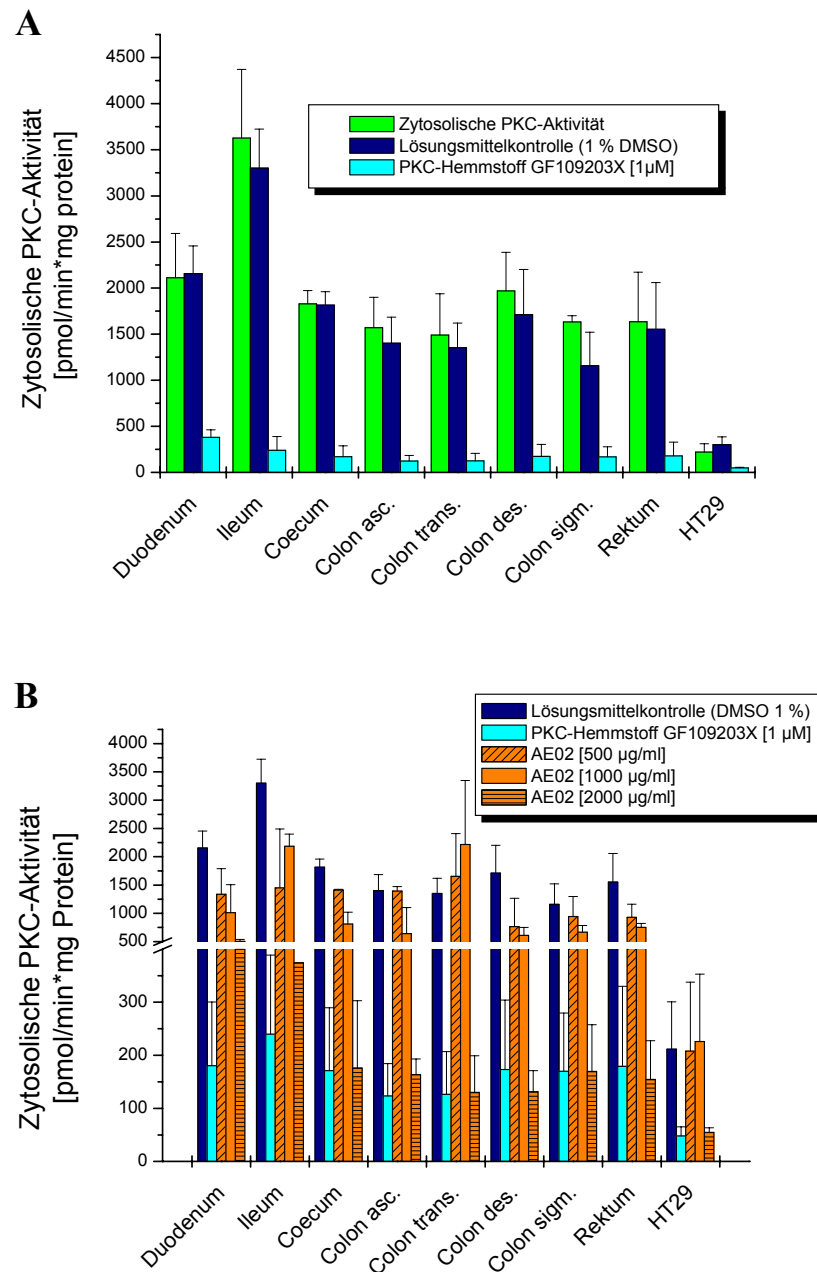
#### 4.4.3 Untersuchungen zur Aktivität der PKC in humanen Darmepithelzellen im Vergleich zu Tumorzelllinie HT29

Die bisherigen Untersuchungen zur Beeinflussung der PKC-Aktivität durch Inhaltsstoffe des polyphenolreichen Apfelsaftextraktes wurden an der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob auch in nichttransformierten Darmzellen PKC als potentielle Zielstruktur exprimiert wird, und inwieweit diese PKC-Aktivität durch den Apfelsaftextrakt beeinflusst werden kann. Aus den verschiedenen Abschnitten des Kolons, sowie im Vergleich dazu aus Duodenum und Ileum, wurden hierzu von Prof. Stallmach Biopsiematerial (damals Universitätsklinikum Homburg/Saar, mittlerweile Klinikum Jena) von freiwilligen gesunden Spendern entnommen und für PKC-Aktivitätsuntersuchungen verwendet.

Die primären Darmzellen wurden modifiziert nach Pool-Zobel et al. [1999] isoliert (Kapitel 6.11.4) und direkt im PKC-Aktivitätsassay mit den Testsubstanzen für 15 min bei 37 °C behandelt. Die PKC-Aktivität wurde anhand der Übertragungsrates von Phosphatresten auf ein PKC-spezifisches Substratpeptid unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (Kit RPN 77, Amersham Bioscience) bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die zytosolische PKC-Aktivität in allen untersuchten Darmabschnitten deutlich höher ist (ca. Faktor 10) als in der Tumorzelllinie HT29 (Abbildung 59A). Einige veröffentlichte Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die PKC-Aktivität im Gewebe von Kolontumoren deutlich verringert ist gegenüber der PKC-Aktivität gesunden Epithelgewebes [Sakanoue et al, 1991; Levy et al, 1993; Doi et al, 1994]. Die im Zelllysate enthaltene PKC-Enzymaktivität aus allen untersuchten Darmabschnitten erwies sich als sensitiv gegenüber der Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes (Abbildung 59B). Der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 (2000 µg/ml) zeigte in allen untersuchten Darmabschnitten mit dem PKC-spezifischen Hemmstoff GF19203X eine vergleichbare Hemmwirkung (Abbildung 59B). Aufgrund der viel höheren PKC-Aktivität in primären Kolonzyten, z. B. *Colon descendens* (~ 2000 pmol/min\*mg Protein) im Vergleich zu der humanen Kolontumorzelllinie HT29 (~ 300 pmol/min\*mg Protein), verfügen die primären Zellen nach Behandlung mit AE02 (2000 µg/ml) noch über eine höhere Restaktivität (*Colon descendens* ~ 150 pmol/min\*mg Protein; HT29-Zellen ~ 50 pmol/min\*mg Protein, Abbildung 59B).





**Abbildung 59:** PKC-Aktivitätsbestimmung durch Messung der Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein PKC-spezifisches Substratpeptid unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP (Kit RPN 77, Amersham Bioscience). **A:** Untersuchungen des Status an zytosolischer PKC-Gesamtaktivität von primären Enterozyten unterschiedlicher Darmabschnitte im Vergleich zur humanen Tumorzelllinie HT29 und deren Sensitivität gegenüber dem spezifischen PKC-Inhibitor Bisindoylmaleimid GF109203X [1 µM]. **B:** Modulation der zytosolischen PKC Aktivität von Enterozyten unterschiedlicher Darmabschnitte durch den Apfelsaftextrakt AE02 und GF109203X im Vergleich zur humanen Tumorzelllinie HT29. MW  $\pm$  SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten in einer Doppelbestimmung. Kolonabschnitte: Asc, ascendens; trans, transversum; des, descendens; sig, sigmoideum.

Die Ergebnisse zeigen, dass nichttransformierte humane Enterozyten über eine höhere PKC-Aktivität verfügen, als die Tumorzelllinie HT29 (Abbildung 59). Jedoch ist anzumerken, dass die Entwicklung von Kolontumoren zu einer Verschiebung des PKC-Enzymmusters führt. In gesunden primären Kolonozyten herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation an der Kryptenbasis und den Apoptoseprozessen an der luminalen Oberfläche mit einer Reihe von Differenzierungsschritten im Laufe der Zellmigration [Cerdea et al, 2001]. Dabei scheint die PKC-Aktivität verschiedener Isoformen eine entscheidende Rolle zu spielen [Verstovsek et al, 1998; Assert et al, 1999]. Deshalb kann eine Veränderung in der Expression oder Aktivität der PKC zu Fehlregulationen im Kolonozytenwachstum führen [Cerdea et al, 2001]. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Expression von PKC $\beta_{II}$  zu einer Hyperproliferation von Kolonepithelzellen führt [Murray et al, 1999; Davidson et al, 2000]. Des Weiteren konnten sowohl in aberranten Krypten als auch in Kolontumoren bei Mäusen erhöhte Expressionswerte an PKC $\beta_{II}$  detektiert werden, wohingegen die anderen klassischen PKC-Isoformen (PKC $\beta_I$ , PKC $\gamma$ ) und die neuartige Isoform PKC $\delta$ , welche vor allem mit apoptotischen Prozessen in Zusammenhang gebracht wird, stark in ihrer Expression verringert waren [Kopp et al, 1991; Gökmen-Polar et al, 2001]. Die PKC $\beta_{II}$  ist auch als Inhibitor der GSK3 $\beta$  beschrieben, wodurch es zur Induktion  $\beta$ -Catenin-vermittelter Genexpression und einem damit verbundenen Proliferationsstimulus kommt [Murray et al, 1999].

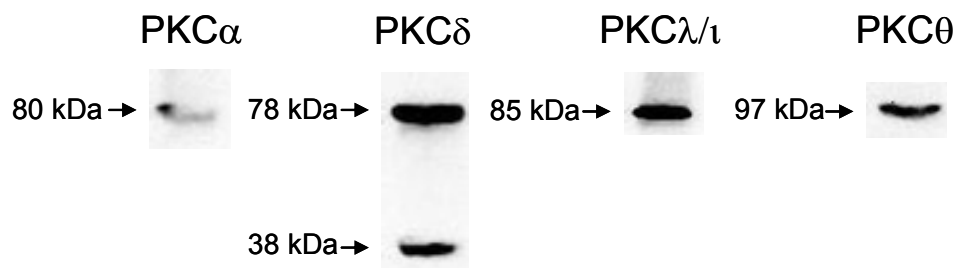
Die in den Enterozyten exprimierte PKC-Aktivität erwies sich als sensitiv gegenüber der Hemmwirkung des eingesetzten polyphenolreichen Apfelsaftextraktes. Jedoch konnte bislang nur die direkte Hemmwirkung von Apfelsaftextrakt auf isolierte primäre Darmzellen gezeigt werden. Ausstehend ist die Frage, ob Apfelpolyphenole auch die zelluläre PKC-Aktivität in humanen Darmzellen hemmen. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit, erst Vorversuche durchgeführt. Die primären Zellen wurden nach der Isolierung 1 h bzw. 3 h bei 37 °C im Birtschrank in DMEM (4500 g/l Glukose) mit Apfelsaftextrakt inkubiert und anschließend die PKC-Aktivität bestimmt. Jedoch konnte keine Hemmwirkung detektiert werden (ohne Abbildung). Im Hinblick auf die Kolonkanzerogenese wären jedoch auch weiterführende Versuche zu einer möglichen Hemmwirkung des AE02 auf einzelnen PKC-Isoenzymformen von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Frage nachgegangen, inwieweit Apfelpolyphenole, den Status, der als antiapoptotisch bzw. proapoptotisch beschriebenen PKC-Isoformen PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  modulieren.

## 4.5 Induktion von Apoptose

### 4.5.1 Bestimmung der Expression pro- und antiapoptotischer PKC-Isoenzyme in HT29-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob die PKC-Isoenzyme PKC $\alpha$  und  $\delta$  in HT29-Zellen exprimiert werden, wurden von Fr. Dorothee Hecker im Rahmen ihrer Forschungsarbeit Western Blot Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein PKC-Antikörper-„Sampler Kit“ gegen die PKC-Isoenzymformen PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ , und  $\lambda/\iota$  der Firma Cell Signaling Technology verwendet [Hecker, 2005].

Die Expression der klassischen PKC $\alpha$  der neuartigen PKC  $\delta$  und PKC $\theta$ , sowie der atypischen Isoform  $\lambda/\iota$  (Abbildung 60) konnten in HT29 Zellen mittels monoklonaler Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden [Hecker, 2005].



**Abbildung 60:** Western Blot Analyse mit PKC-Antikörper gegen die Isoenzyme  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\lambda/\iota$  zur Bestimmung des Expressionsmusters von HT29-Zellen [Hecker, 2005].

Kuranami et al. [1994] verglichen die RNA-Expression von neun verschiedenen Kolorektalen Tumorzelllinien, darunter auch HT29-Zellen. Es wurden mRNA-Transkripte für PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  und PKC $\zeta$  in allen neun Zelllinien detektiert. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen der Forschungsarbeit von Fr. Hecker, keine Expression der Isoform PKC $\zeta$  in HT29-Zellen nachgewiesen werden. Zum eine kann dies bedeuten, dass möglicherweise trotz mRNA-Transkription, dass Protein nicht exprimiert wird oder dass sich HT29-Zellen der DSMZ in ihrem Expressionsmuster von denen der „American Type Culture Collection“ unterscheiden. Im Einklang mit den Ergebnissen von Kuranami et al.

[1994] wurde die Expression der Isoenzyme PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  in HT29-Zellen nachgewiesen, wobei die Isoform PKC $\delta$  am stärksten exprimiert wird (Abbildung 60).

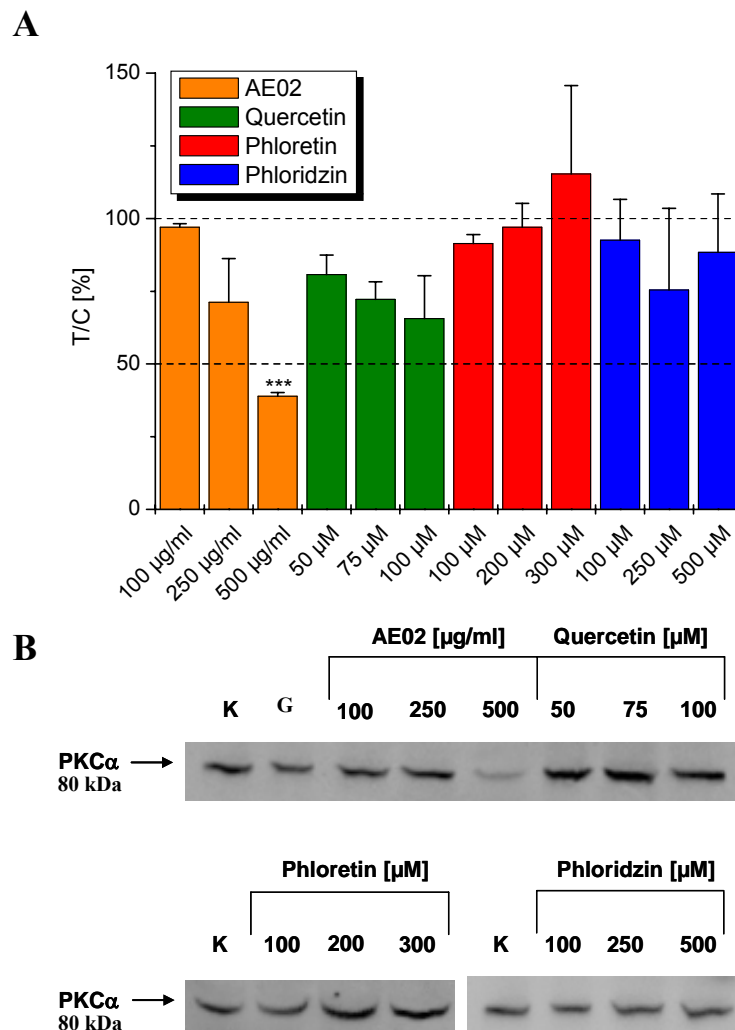
Vor allem die neuartigen PKC Isoformen, wie die in HT29-Zellen exprimierten PKC Isoformen  $\delta$  und  $\theta$ , werden in der Literatur in Zusammenhang mit proapoptotischen Prozessen beschrieben [Gutcher et al, 2003; Sodhi und Sethi, 2005]. Die klassischen PKC Isoformen wie z. B. die in HT29-Zellen exprimierte Isoform PKC $\alpha$  oder die in der Literatur beschriebene PKC $\beta_{II}$  werden eher mit antiapoptotischen Wirkungen in Verbindung gebracht [Mandil et al, 2001; Leverrier et al, 2002; Basu, 2003]. Die Untersuchungen von Fr. Hecker zeigten, dass PKC $\beta$  wahrscheinlich nicht oder nur marginal in HT29-Zellen exprimiert wird. Des Weiteren werden keine Antikörper, die spezifisch nur eine „Splice“-Varianten der PKC $\beta$  detektieren angeboten. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Modulation der antiapoptotischen PKC $\alpha$  und der proapoptotischen PKC $\delta$  durch Apfelpolyphenole untersucht.

#### **4.5.2 Modulation der Expression der PKC-Isoformen $\alpha$ und $\delta$ durch Apfelpolyphenole**

Damit stellte sich die Frage, ob der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt sowie einige ausgewählte Flavonoide im Apoptoseprozess die Proteinmenge der PKC $\delta$  induzieren bzw. der PKC $\alpha$  reduzieren. Die Untersuchungen erfolgten mittels Western Blot Analyse mit monoklonalen Antikörpern gegen PKC $\alpha$  (80 kDa) und PKC $\delta$  (72/38 kDa) (Santa Cruz) nach 24-stündiger serumfreier Substanzinkubation von HT29-Zellen.

Als Positivkontrolle wurde der PKC-spezifische Inhibitor GF109203X (Abbildung 56) in einer Konzentration von 100 nM mitgeführt. Der PKC-spezifische Inhibitor GF109203X (100 nm) vermindert den Proteingehalt der Isoformen PKC $\alpha$  und  $\delta$  um 25% nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen (ohne Abbildung). Die Erhöhung der Konzentration von GF109203X auf 1  $\mu$ M führte jedoch zu einer verstärkten Abnahme der Zellzahl (ohne Abbildung) und konnte somit nicht als Konzentration für die Western Blot Analyse eingesetzt werden.

Der Apfelsaftextrakt AE02 und das Aglykon Quercetin führten nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer Erniedrigung der Proteinmenge der antiapoptotischen PKC-Isoform PKC $\alpha$  (Abbildung 61), wobei die Proteinmenge an PKC $\alpha$  durch den Apfelsaftextrakt hoch signifikant reduziert wird. Die Dihydrochalkone Phloretin und Phloridzin zeigten keinen Einfluss auf die Proteinmenge der PKC $\alpha$  in HT29-Zellen (Abbildung 61).

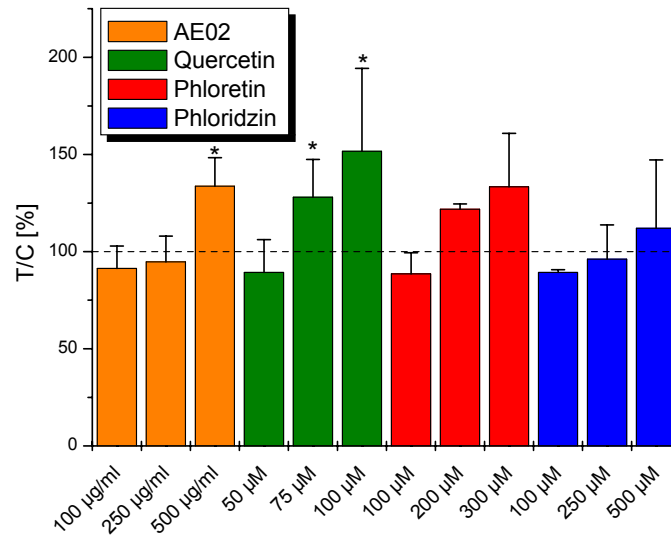
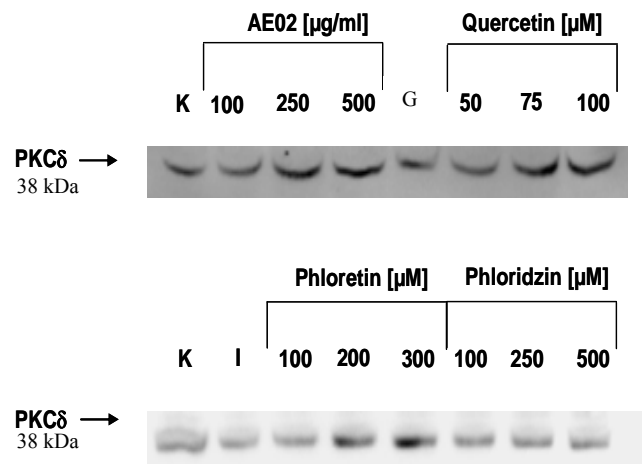


**Abbildung 61:** A+B: Western Blot Analyse zur Modulation der Expression der Isoform PKC $\alpha$  durch Apfelsaftextrakt AE02, die Aglyka Quercetin und Phloretin sowie Phloridzin (HT29-Zellen, 24 h serumfreie Inkubation). Es wurde für die gelelektrophoretische Trennung 40  $\mu$ g Gesamtprotein pro Tasche eingesetzt. B: Repräsentativer Western Blot. MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Student's *t*-Test \*\*\*:  $p < 0,005$ , K: Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz); G: Bisindoylmaleimid GF109203X [100 nM].

Der konventionellen PKC-Isoform PKC $\alpha$  (Abbildung 18A) wird eher ein antiapoptotisches Potential zugesprochen [Mandil et al, 2001; Leverrier et al, 2002; Basu, 2003]. Der Mechanismus der präventiven Wirkung der PKC $\alpha$  vor Apoptosesignalen ist noch nicht aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung wäre die bereits beschriebene Phosphorylierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 oder die Aktivierung von Raf-1 durch die PKC $\alpha$  *in vitro* [Kolch et al, 1993; Ueda et al, 1996; Ruvolo et al, 1998].

Das Isoenzym PKC $\delta$  gehört zur Familie der neuartigen PKCs (nPKCs). PKC $\delta$  wird ubiquitär exprimiert. Apoptose-induzierende Signale (Abbildung 18B), wie z. B. das Initiationsignal des Transmembranrezeptors (CD95) oder eine Inkubation von Tumorzellen *in vitro* mit dem Topoisomerasegift Etoposid, führen zur Aktivierung der PKC $\delta$  [Reyland et al, 1999; Basu, 2003]. Des Weiteren führt ein Verlust an PKC $\delta$ -Expression zu einem verstärkten Tumorzellwachstum *in vitro* [Lu et al, 1997]. Das Isoenzym PKC $\delta$  ist ein Substrat der Caspase-3, die proteolytisch die PKC $\delta$  an der V3-Domäne spaltet und somit ein katalytisch aktives Fragment freisetzt [Endo et al, 2000]. Zusätzlich wird auch der PKC $\delta$  selbst, proapoptotisches Potential zugesprochen [Fujii et al, 2000; Lewis et al, 2005]. Es wird vermutet, dass die „komplette“ PKC $\delta$  an frühen Apoptoseprozessen, wie z. B. der Ausschüttung von Cytochrom C beteiligt ist. Wohingegen das katalytisch aktive Fragment nach Caspaseaktivierung eher an der Regulation spätaoptotischer Signale mitwirkt [Reyland et al, 1999].

Der Apfelsaftextrakt AE02 erhöht ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  (32  $\mu\text{M}$  Phloridzin Äq.) signifikant die Proteinmenge des 38 kDa großen Fragments der PKC $\delta$  (Abbildung 62). Die Inkubation von HT29-Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  Quercetin führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge der PKC $\delta$  (Abbildung 62). Phloridzin und Phloretin zeigten in sehr hohen Konzentrationen eine Induktion der PKC $\delta$ , die sich jedoch als nicht signifikant erwies (Abbildung 62).

**A****B**

**Abbildung 62: A+B:** Western Blot Analyse zur Modulation der Isoform PKC $\delta$  in HT29-Zellen durch Apfelsaftextrakt AE02, die Aglyka Quercetin und Phloretin sowie durch den Apfelinhaltsstoff Phloridzin (24 h Inkubation, serumfrei). Es wurde für die gelelektrophoretische Trennung 40 µg Gesamtprotein pro Tasche eingesetzt **B:** Repräsentativer Western Blot. MW  $\pm$  SD von vier unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test \*:  $p < 0,05$ ; K, Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz); G, Inhibitor GF109203X [100 nM].

Erstmals konnte gezeigt werden, dass ein polyphenolreicher Apfelsaftextrakt in einer Konzentration von 500 µg/ml, *in vitro* die Proteinmenge der proapoptotischen PKC $\delta$  (Abbildung 62) signifikant induziert und gleichzeitig den Proteingehalt der antiapoptotischen PKC $\alpha$  (Abbildung 61) hoch signifikant reduziert.

Gleichzeitig wird die zytosolische PKC-Aktivität in HT29-Zellen durch Inkubation mit AE02 signifikant gehemmt (Abbildung 58A). Der scheinbare Anstieg der PKC-Aktivität bei Konzentrationen  $> 500 \mu\text{M}$  könnte möglicherweise auf apoptotischen Prozessen beruhen.

Das Aglykon Quercetin, das in freier Form nicht im Extrakt vorliegt, induziert signifikant den Proteingehalt an PKC $\delta$  (Abbildung 62) und verringert die Expression an PKC $\alpha$  (Abbildung 61). Der Effekt von  $100 \mu\text{M}$  Quercetin auf den Proteingehalt an PKC $\alpha$  ist jedoch nicht signifikant. Der U-förmige Kurvenverlauf der PKC-Aktivität nach Inkubation der HT29-Zellen mit Quercetin erreicht bei  $100 \mu\text{M}$  ihr Minimum (Abbildung 58 B). Die Induktion der PKC-Aktivität könnte auch hier auf apoptotische Wirkungen zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Russo et al. [2005] eine Aktivierung der PKC $\alpha$  in der humanen Leukämiezellenlinie ALL durch Quercetin *in vitro*. Russo et al. [2005] postulierten einen Beitrag der PKC $\alpha$  bei der CD95-vermittelten Apoptose. Insgesamt wird der Beitrag der PKC $\alpha$  bei pro- bzw. antiapoptotischen Prozessen noch sehr kontrovers diskutiert [Basu, 2003; Koivunen et al, 2006]. So scheint die Rolle der PKC $\alpha$  sehr zellspezifisch zu sein, wobei im Falle des kolorektalen Karzinoms die antiapoptotischen Wirkungen der PKC $\alpha$  im Vordergrund stehen [Koivunen et al, 2006].

Eine maximale Hemmwirkung auf die zytosolische PKC-Aktivität zeigte Phloretin bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  (Abbildung 58B). In dieser Konzentration konnte keine signifikante Beeinflussung der Expression an PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  (Abbildung 61, Abbildung 62) verzeichnet werden. In Konzentrationen, in denen eine signifikante Induktion der zytosolischen PKC-Aktivität durch Inkubation der HT29-Zellen mit Phloretin ( $\geq 300 \mu\text{M}$ , Abbildung 58B) detektiert wurde, kam es zu keiner signifikanten Modulation der Expression der untersuchten PKC-Isoenzyme. Die scheinbare Aktivierung der PKC-Aktivität durch Phloretin, scheint nicht direkt mit einer PKC-vermittelten Apoptoseinduktion im Zusammenhang zu stehen. Im Einklang mit den Ergebnissen der PKC-Aktivitätsbestimmung führt eine Inkubation von HT29-Zellen mit dem charakteristischen Apfelinhaltsstoff Phloridzin zu keiner Modulation der PKC-Isoenzyme PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  (Abbildung 61, Abbildung 62).



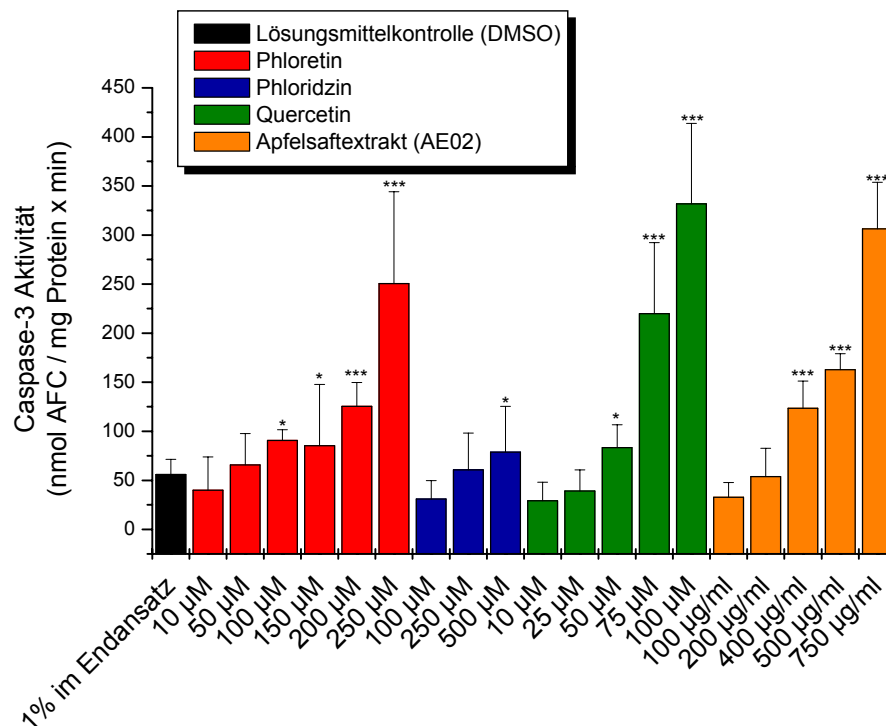
Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass Apfelpolyphenole PKC-Isoenzyme in ihrer Expression und/oder Aktivität modulieren und somit in proliferative Prozesse *in vitro* eingreifen können. Zur weiteren Absicherung der bislang erzielten Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit, Versuche zur Aktivierung der Caspase-3-Aktivität (frühes apoptotisches Merkmal) und zur DNA-Fragmentierung (späte Apoptose) durchgeführt.

### 4.5.3 Modulation der Caspase-3-Aktivität durch Apfelpolyphenole

Die Aktivierung der Caspase-3, einer Cystein-abhängigen Aspartase, stellt einen charakteristischen Bestandteil apoptotischer Prozesse dar. Die Apoptoseinduktion ist verknüpft mit der Aktivierung von Caspase-Kaskaden (intrinsischer und extrinsischer Signalweg, Kapitel 2.4). Diese Kaskaden beginnen mit der Aktivierung so genannter Initiatorcaspasen, die wiederum die Effektorcaspasen aktivieren. Das verwendete Testsystem zur Messung der Effektorcaspase-3 beruht auf der fluorimetrischen Bestimmung der Caspase-3-Aktivität. Das eingesetzte Substrat DEVD-AFC (Asp-Glu-Val-Asp-AFC (7-Amino-4-trifluormethylcumarin)) wird nach Asp-4 durch die Caspase-3 gespalten. Dabei wird fluoreszierendes AFC frei. Da dies nicht nur durch Caspase-3, sondern auch durch unspezifische Proteasen geschieht, wurde der spezifische Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO (DEVD-Aldehyd) eingesetzt (Kapitel 6.7.2). Die spezifische Caspase-3-Aktivität berechnet sich aus der Gesamt-DEVDase (ohne DEVD-CHO) – unspezifische DEVDase (mit DEVD-CHO).

Die Inkubation (24h, serumfrei) von HT29-Zellen mit Apfelsaftextrakt AE02 führte ab einer Konzentration von 400 µg/ml (25,6 µM Phloridzin Äq.) zur hochsignifikanten Aktivierung der Caspase-3-Aktivität (Abbildung 63). Diese Ergebnisse stehen im Einklang zur Caspase-3-Aktivierung in humanen Kolonkarzinomzellen durch einen procyanidinreichen Apfelsaftextrakt [Gossé et al, 2005].

Die beiden, als Referenzsubstanzen eingesetzten Aglyka Phloretin (ab 100 µM, Abbildung 63) und Quercetin (ab 50 µM, Abbildung 63) aktivierten ebenfalls signifikant die Caspase-3. Das Phloretinlukosid, Phloridzin, führte ebenfalls zu einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität, jedoch erst in sehr hohen Konzentrationen (500 µM, Abbildung 63).



**Abbildung 63:** Die Modulation der Caspase-3-Aktivität in HT29-Zellen nach 24stündiger serumfreier Inkubation mit AE02, Phloretin, Phloridzin und Quercetin wurde fluorimetrisch bestimmt. Die Caspase-3-Aktivität berechnet sich aus dem Umsatz des Caspasesubstrates abzüglich des mittels spezifischen Caspase-3-Hemmstoffs geblockten Ansatzes. MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Doppelbestimmung; Student's *t*-Test (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ .

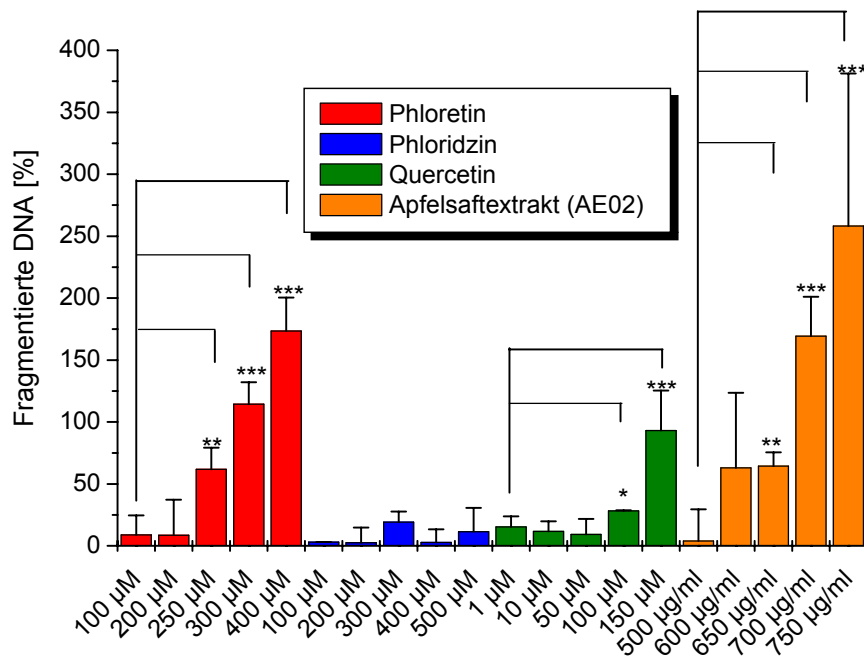
Quercetin ist vielfach in der Literatur als Induktor der Caspase-3 beschrieben [Shen et al, 2003; Spencer et al, 2003; Nguyen et al, 2004]. Wenzel et al. [2004] konnten vergleichbar mit den hier gezeigten Ergebnissen, durch 150  $\mu$ M Quercetin eine Caspase-3-Aktivitätssteigerung in HT29-Zellen erzielen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die im Apfelsaftextrakt vorkommende Quercetinglykoside, Q-3-rut und Q-3-rha, die Caspase-3-Aktivität nicht beeinflussen [Shen et al, 2003]. Auch methylierte und glukuronidierte Quercetinmetabolite erwiesen sich als weitgehend inaktiv [Spencer et al, 2003].

Phloretin führte in einer Konzentration von 250  $\mu$ M, vergleichbar zu den hier gezeigten Ergebnissen an HT29-Zellen zur Induktion von Apoptose durch Aktivierung der Caspase-3 in der humanen Leukämiezelllinie HL-60 [Kobori et al, 1999].

#### 4.5.4 Bestimmung der DNA-Fragmentierung durch Apfelpolyphenole

Charakteristisch für späte apoptotische Prozesse ist die Fragmentierung der DNA, die mittels ELISA (Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup>, Roche) bestimmt wurde. Das Testprinzip des ELISAs („enzyme-linked immunosorbent assay“) beruht auf einem „Sandwich-Enzym-Immunoassay“ mit monoklonalen Antikörpern gegen DNA-Fragmente und Histone. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgt über eine photometrische Vermessung einer Peroxidase-vermittelten Farbreaktion (Kapitel 6.7.1).

Eine 24-stündige serumfreie Inkubation mit Apfelsaftextrakt führte ab einer Konzentration von 600 µg/ml (38 µM Phloridzin Äq.) zu einem signifikanten Anstieg von fragmentierter DNA (Abbildung 64). Im Vergleich dazu waren ähnliche Effekte bei Inkubation mit Phloretin ab 250 µM und mit Quercetin ab 100 µM zu beobachten. Die Behandlung mit Phloridzin führte, bis zu einer Konzentration von 500 µM, zu keinem Anstieg von DNA-Fragmentierung (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** DNA-Fragmentierung von HT29-Zellen nach 24-stündiger serumfreier Inkubation mit AE02, Phloretin, Phloridzin und Quercetin, bestimmt mittels ELISA (Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup>, Roche). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Doppelbestimmung; Student's *t*-Test \*:  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$

Durch 24-stündige serumfreie Inkubation von HT29-Zellen mit Apfelpolyphenolen ist eine Caspase-3-Aktivierung (Abbildung 63), in niedrigeren Konzentrationen zu verzeichnen im Vergleich zur DNA-Fragmentierung (Abbildung 64). Eine mögliche Erklärung wäre, dass in HT29-Zellen zuerst die Caspase-3 als frühes apoptotisches Ereignis aktiviert wird, wodurch es anschließend zur DNA-Fragmentierung kommt. Dafür spräche auch, dass in den Konzentrationsbereichen, in denen hoch signifikant die Caspase-3-Aktivität (Abbildung 63) durch polyphenolreichen Apfelsaftextrakt AE02 und die Aglyka Phloretin und Quercetin induziert wird, auch schon signifikante DNA-Fragmentierung (Abbildung 64) zu beobachten ist.

Im Einklang mit Literaturdaten [Kobori et al, 1999] wurde eine apoptosecharakteristische DNA-Fragmentierung, nach 24-stündiger Zellinkubation mit Phloretin detektiert (Abbildung 64). Des Weiteren konnte die PKC-Gesamtaktivität signifikant durch Phloretin in humanen Leukämiezellen (HL-60) *in vitro* gehemmt werden [Kobori et al, 1999]. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Phloretin sowohl die PKC-Gesamtaktivität (Abbildung 58) signifikant verringert als auch die Caspase-3, als ein früher Schritt in der Apoptosekaskade, signifikant aktiviert (Abbildung 63). Der gezeigte Wiederanstieg der PKC-Aktivität in HT29-Zellen nach Inkubation mit Phloretin (Abbildung 58B) könnte möglicherweise mit späten apoptotischen Prozessen im Zusammenhang stehen.

Auch das Flavonol Quercetin ist als apoptoseinduzierend durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade *in vitro* beschrieben [Shen et al, 2003; Wenzel et al, 2004]. Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen. Quercetin induziert nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen DNA-Fragmentierung (Abbildung 64), Caspase-3-Aktivität (Abbildung 63) sowie die Expression der proapoptotischen PKC-Isoform PKC $\delta$  (Abbildung 62) und moduliert die zytosolischen PKC-Aktivität (Abbildung 58B). Des Weiteren konnte eine Abnahme der Zellzahl ( $IC_{50}$ -Werte (24h, serumfrei, HT29-Zellen, SRB-Test), Quercetin  $124 \pm 8 \mu\text{M}$ ; ohne Abbildung), verzeichnet werden [Pahlke et al, *J. Agric. Food Chem.*, eingereicht]. Somit trägt die Induktion der Apoptose durch das Flavonol Quercetin zumindest zum Teil zur Wachstumshemmung [Kern et al, 2005] der HT29-Zellen bei.

Der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 erwies sich als potenter Induktor von apoptotischen Prozessen in HT29-Zellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Caspase-3-Aktivierung in der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW620 durch pro-cyanidinreichen Apfelsaftextrakt [Gossé et al, 2005].

In Konzentrationsbereichen, in denen bereits nach 24-stündiger Behandlung von HT29-Zellen mit Apfelsaftextrakt AE02 DNA-Fragmentierung (Abbildung 64) und Caspase-3-Aktivierung (Abbildung 63) induziert wurde, konnten auch Viabilitätsverluste ( $IC_{50}$ -Werte (24h, serumfrei, HT29, SRB-Test): AE02  $401 \pm 36 \mu\text{g/ml}$ , ohne Abbildung) verzeichnet werden. Somit trägt die Apoptoseinduktion zumindest mit zu der Hemmwirkung des AE02 auf das Wachstum von humanen Kolonzellen bei.

Nicht geklärt ist die Frage welche Apfelinhaltsstoffe für die Apoptoseinduktion durch den AE02 verantwortlich sind. Die apoptoseinduzierenden Aglyka Phloretin und Quercetin sind in ihrer freien Form noch nicht im Apfelsaftextrakt beschrieben [Kern et al, 2005; Schäfer et al, 2006; Veeriah et al, 2006]. Durch eine totale Hydrolyse von Phloridzin und den Quercetinglykosiden, Q-3-gal, Q-3-glu, Q-3-rha und Q-3-rut zu den entsprechenden Aglyka im Gastrointestinaltrakt könnte durch die Inkubation mit  $750 \mu\text{g/ml}$  Apfelsaftextrakt die Entstehung von max.  $21 \mu\text{g/ml}$  Phloretin und  $6,5 \mu\text{g/ml}$  Quercetin postuliert werden. Diese Konzentrationen der Aglyka würden erwartungsgemäß nur zu einem marginalen Anteil zur Apoptoseinduktion durch den Apfelsaftextrakt AE02 in humanen Kolontumorzellen beitragen. Weitere bekannte Apfelinhaltsstoffe, wie die Chlorogensäure und EC induzieren ebenfalls keine DNA-Fragmentierung in humanen Tumorzellen *in vitro* [Tan et al, 2000; Zheng et al, 2002; Ramos et al, 2005]. Somit ist davon auszugehen, dass die bereits identifizierten Inhaltsstoffe des Apfelextraktes (Phloridzin, Quercetinglykoside, EC und Chlorogensäure) nur einen marginalen Beitrag zur Apoptoseinduktion in HT29-Zellen durch AE02 leisten und deswegen bislang nicht identifizierte Apfelpolyphenole größtenteils dafür verantwortlich sein müssen.

Insgesamt legen die Ergebnisse jedoch nahe, dass die gezeigte scheinbare Aktivierung der PKC-Aktivität (Abbildung 58) durch Behandlung von HT29-Zellen mit AE02 ( $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ ) und Quercetin ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) möglicherweise intermediär als Teil des apoptotischen Prozesses auftritt.

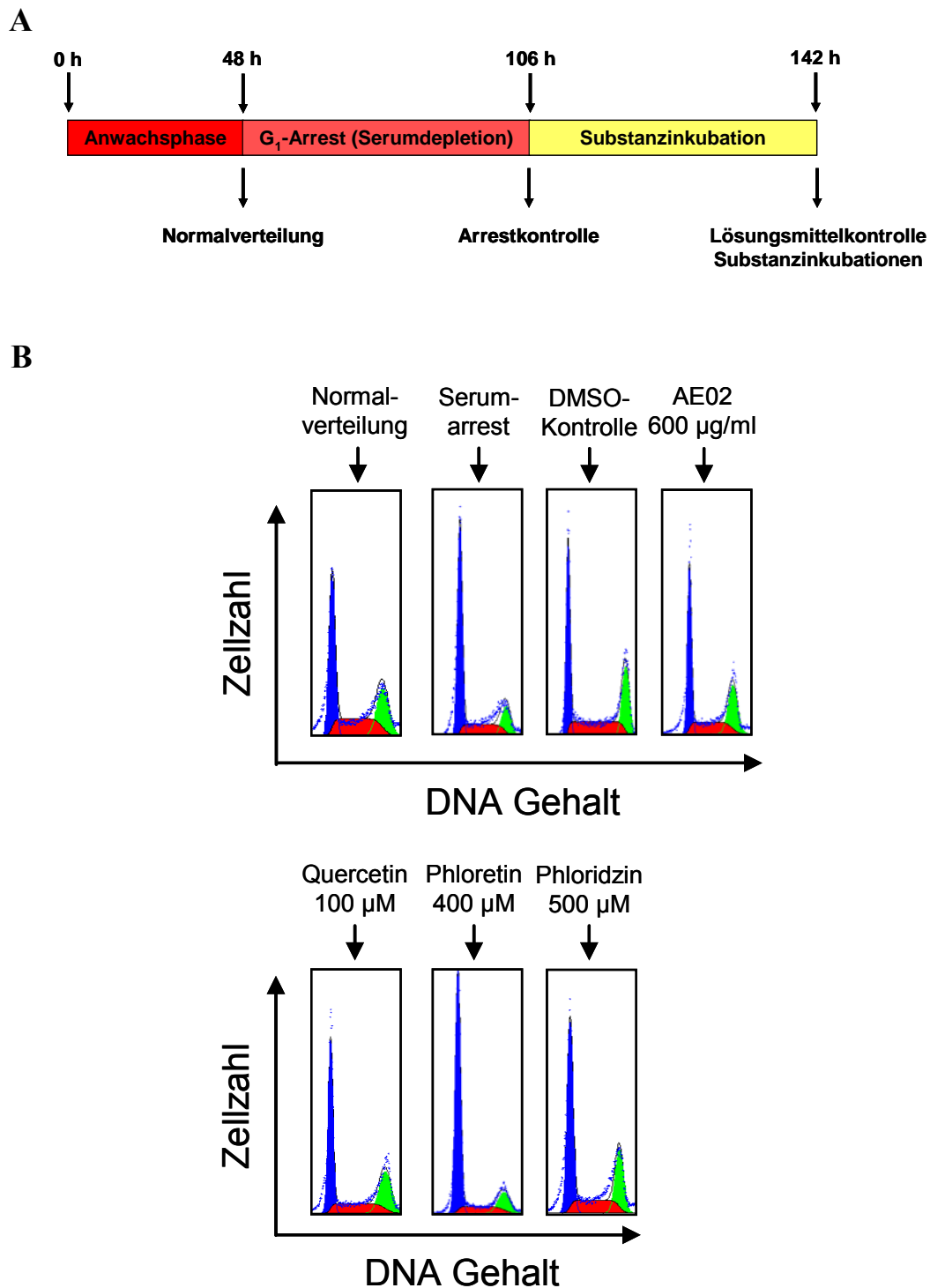
## 4.6 Zellzykluseffekte durch Apfelpolyphenole

Die vorausgegangenen Ergebnisse dieser Arbeit konnten bereits zeigen, dass der Apfelsaftextrakt AE02 sowie einige Polyphenole (z.B. das Aglykon Quercetin) hoch effizient in Signalkaskaden eingreifen, die entscheidend sind für das Tumorzellwachstum. Es stellte sich nun die Frage, ob sich diese Effekte von Apfelpolyphenolen auf proliferationsassoziierte Signalkaskaden, sich auch in der Zellzyklusverteilung widerspiegeln. Bei potenten Hemmstoffen des EGFR und der nachgeschalteten Kinasekaskade wäre eine Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus zu erwarten. Des Weiteren würde sich auch eine Apoptoseinduktion in einem sub-G<sub>1</sub> Peak in der Zellzyklusverteilung äußern. Ergänzend wurden vergleichende Untersuchungen zu möglichen Effekte auf das Durchlaufen der G<sub>2</sub>/M-Phase durchgeführt. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei der DNA-Gehalt, der mit DAPI/SR101 gefärbten HT29-Zellen, fluorimetrisch bestimmt wurde. Zur differenziellen Betrachtung, der sich potenziell überlagernder Effekte auf unterschiedliche Zellzyklusphasen, ist es notwendig, die zu behandelnden Zellen vor Versuchstart in ihrer Zellzyklusverteilung zu synchronisieren (Kapitel 6.6). Die Synchronisierung in der G<sub>1</sub>-Phase erfolgte durch 48-stündige Inkubation mit serumfreiem Medium. Zur G<sub>2</sub>/M-Synchronisierung wurden die Zellen 16 h mit Nocodazol (0,5 µg/ml) in serumhaltigem Medium inkubiert. Nach der Synchronisierung erfolgte die serumhaltige Substanzinkubation für 36 h.

### 4.6.1 Synchronisierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus

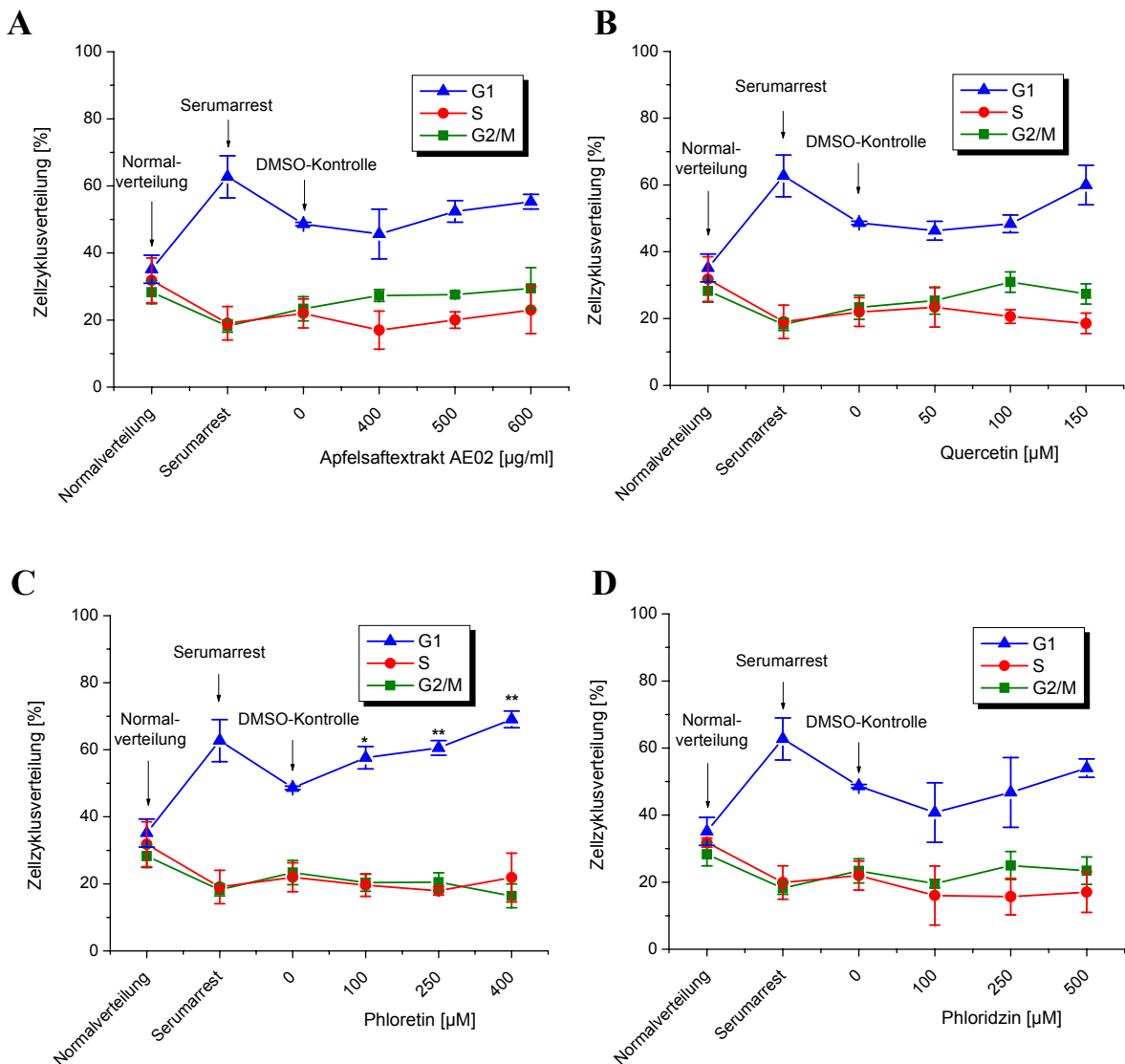
Das Inkubationsschema zur Synchronisierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus ist in Abbildung 65A dargestellt.

Durch 48-stündige serumfreie Inkubation, erhöht sich der Anteil an Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase von 35 % auf 62 % (Abbildung 65B + Abbildung 66). Die Zellzyklusverteilung (48 % in G<sub>1</sub>) der HT29-Zellen ist auch nach 36-stündiger serumhaltiger Inkubation mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle (1 % Endkonzentration) immer noch zwischen G<sub>1</sub>-Arrest und Normalverteilung (35 % in G<sub>1</sub>, Abbildung 65B).



**Abbildung 65:** **A:** Inkubationsschema zur Synchronisierung der HT29-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. **B:** Histogramme der durchflusszytometrischen Messung zum Einfluss von Apfelpolyphenolen (36 h, serumhaltig (10 % FKS im Endansatz)) auf HT29-Zellen nach deren Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase durch 48 h Serumdepletion. Blau, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, rot, Zellen in der S-Phase und grün, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. G<sub>1</sub>-Peak erscheint bei 200 nm und der G<sub>2</sub>/M Peak bei 400 nm.

Aus diesem Grund kommt es durch Inkubation mit Apfelsaftextrakt AE02 und dem Aglykon Quercetin zwar zu einer Anreicherung von HT29-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, diese erwies sich jedoch aufgrund des relativ geringen Messintervalls als nicht signifikant (Abbildung 66A + B). In Konzentrationen des Apfelsaftextraktes AE02 > 600 µg/ml (38,4 µM Phloridzin Äq.) und Quercetin > 150 µM war eine deutliche Zunahme an toten Zellen zu beobachten (ohne Abbildung).



**Abbildung 66:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase und anschließender serumhaltiger Inkubation für 36 Stunden mit **A:** Apfelsaftextrakt AE02, **B:** Quercetin, **C:** Phloretin und **D:** Phloridzin. MW ± SD von drei unabhängigen Experimenten. Student's *t*-Test (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz)) \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .



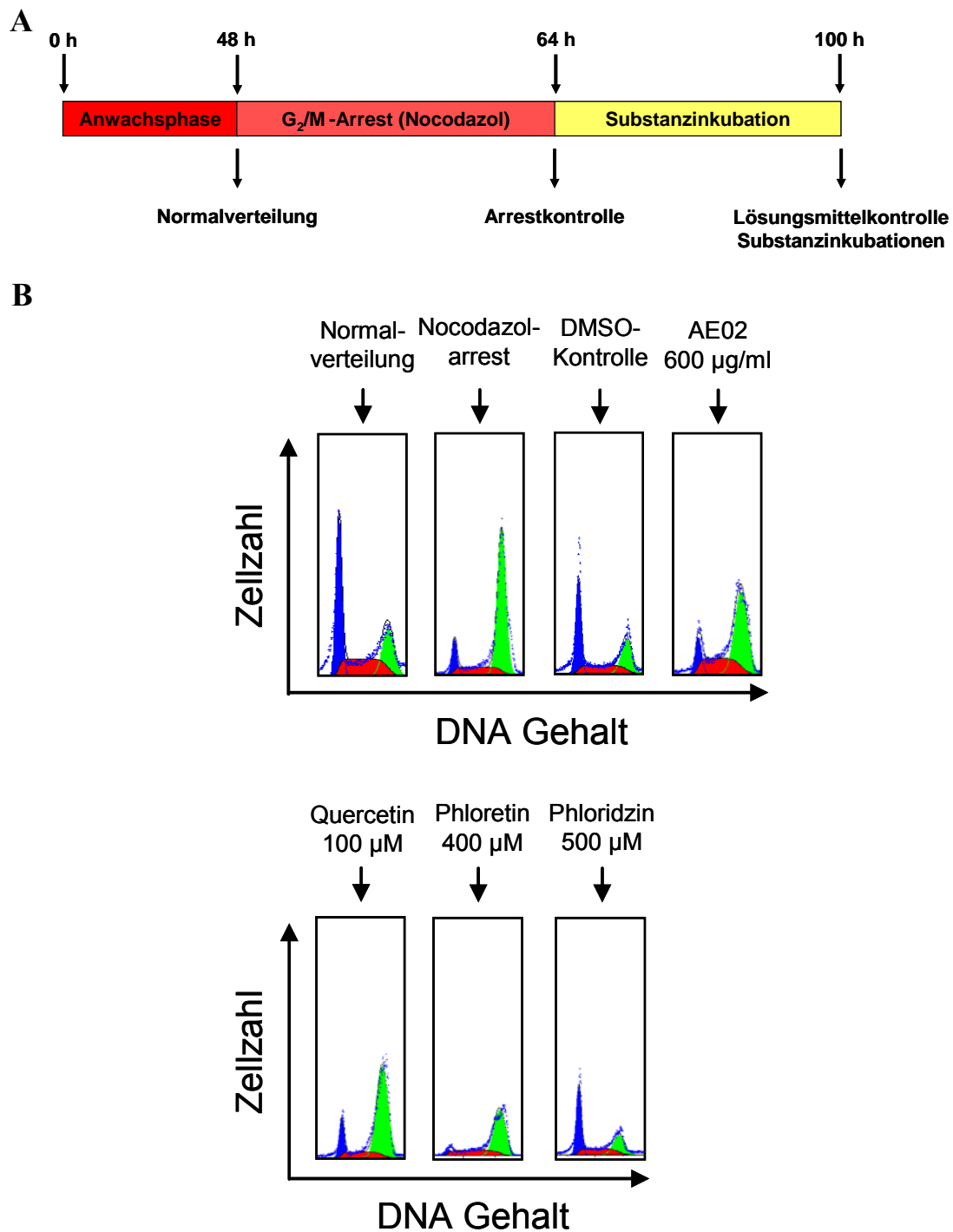
Eine Inkubation mit dem Dihydrochalkon Phloretin führte ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu einem signifikanten Anstieg in der  $G_1$ -Phase (Abbildung 66C). Die Arretierung der Zellen in der  $G_1$ -Phase resultiert möglicherweise aus der Beeinflussung von Elementen der MAPK-Kaskade (Kapitel 4.2) in diesem Konzentrationsbereich. Die Inkubation mit dem charakteristischen Apfelinhaltsstoff Phloridzin führt in Konzentration bis 500  $\mu\text{M}$  zu keinem signifikanten Anstieg in  $G_1$  (Abbildung 66D).

Aufgrund des geringeren Viabilitätsverlustes durch Phloretin im Vergleich zu Quercetin und dem Apfelsaftextrakt AE02, konnten mit Phloretin aussagekräftigere Ergebnisse auf die  $G_1$ -Phase verzeichnet werden, da in einem größeren Konzentrationsbereich gemessen werden konnte. Die Histogramme von HT29-Zellen nach 48 h Serumentzug und der Inkubation mit AE02 oder Quercetin in höheren Konzentrationen waren oft, aufgrund zu hoher Zellschädigung nicht auswertbar. Dadurch konnte auch nur einmal ein deutlicher Sub- $G_1$ -Peak als Merkmal apoptotischer Prozesse bei einer Konzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  AE02 detektiert werden (ohne Abbildung). Im Gegensatz zur Arretierung der HT29-Zellen in der  $G_1$ -Phase durch Serumentzug, schienen die Zellen die Synchronisation in der  $G_2/M$ -Phase besser zu tolerieren.

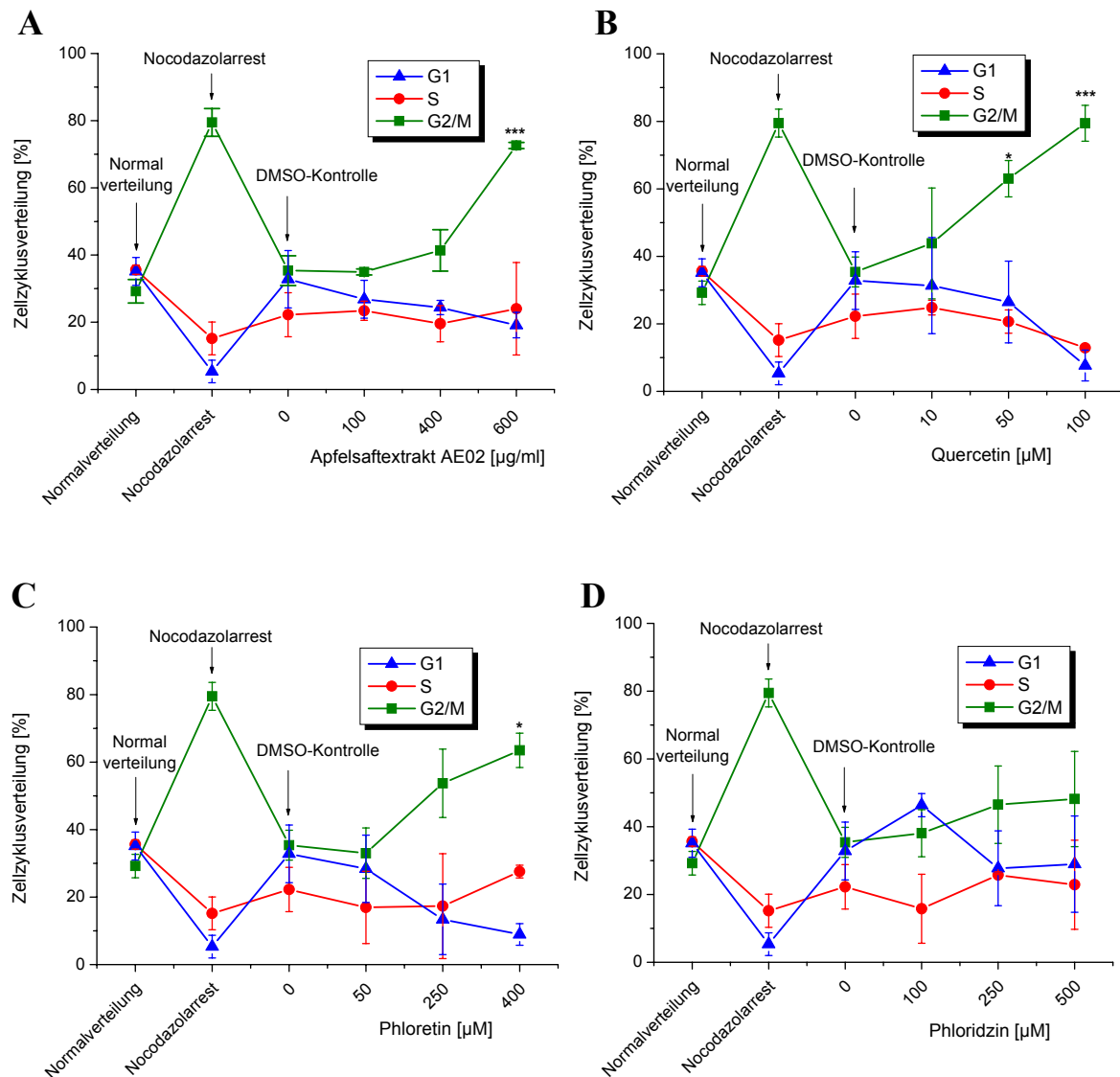
#### 4.6.2 Synchronisation der Zellen in der $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus

Nach Synchronisierung (Inkubationsschema Abbildung 67A) der Zellen für 16 h mit Nocodazol (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) ist ein charakteristischer Arrest in der  $G_2/M$ -Phase zu erkennen (Abbildung 67B).

Der Anteil an HT29-Zellen in der  $G_2/M$ -Phase steigt durch Nocodazol von 29 % auf ca. 80 % an. Die DMSO-Kontrolle zeigt an, dass die Zellen nach einer Inkubation von 36 h mit serumhaltigem Medium sich wieder aus dem Zellzyklusarrest befreien und der Normalverteilung annähern (Abbildung 67B).



**Abbildung 67:** **A:** Inkubationsschema zur Synchronisierung der HT29-Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. **B:** Histogramme der durchflusszytometrischen Messung zum Einfluss von Apfelpolyphenolen (36 h, serumhaltig (10 % FKS im Endansatz)) auf HT29-Zellen nach Synchronisation mit Nocodazol (0,5 µg/ml) in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Blau, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase; rot, Zellen in der S-Phase und grün, Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. G<sub>1</sub>-Peak erscheint bei 200 nm und der G<sub>2</sub>/M-Peak bei 400 nm.



**Abbildung 68:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Synchronisation mit Nocodazol (0,5 µg/ml Kulturmedium, serumhaltig) in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender serumhaltiger Inkubation für 36 Stunden mit **A:** Apfelsaftextrakt AE02, **B:** Quercetin, **C:** Phloretin und **D:** Phloridzin. MW ± SD von drei unabhängigen Experimenten; Student's *t*-Test (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO im Endansatz)) \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Inkubation der HT29-Zellen mit dem Apfelsaftextrakt AE02 führt ab einer Konzentration von 400 µg/ml (26,6 µM Phloridzin Äq.) zu einem Anstieg der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, der bei 600 µg/ml (38,4 µM Phloridzin Äq.) hochsignifikant war (Abbildung 68A). Gossé et al. [2005] zeigten ebenfalls einen Arrest von humanen Kolontumorzellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase durch Inkubation mit procyanidinreichem Apfelsaftextrakt.

Quercetin führt ab 50  $\mu\text{M}$  signifikant zu einer Arretierung in  $G_2/M$  (Abbildung 68B). Aufgrund der potenten Hemmwirkung auf die Aktivität humaner Topoisomerasen sowie auf die Tubulinpolymerisation [Boege et al, 1996; Gupta und Panda, 2002], konnte ein Effekt auf die  $G_2/M$ -Phase durch Quercetin erwartet werden. Die Inkubation mit dem Apfelinhaltsstoff Phloridzin führte zu keiner signifikanten Arretierung in  $G_2/M$ , wohingegen sein Aglykon Phloretin eine Wirkung auf die Zellzyklusverteilung zeigte (Abbildung 68D + C). Aus der Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe konnten schon eine Reihe von Flavonoiden identifiziert werden, die in der Lage sind, humane Tumorzellen *in vitro* entweder in  $G_1$ -Phase [Casagrande und Darbon, 2001] oder in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus zu arretieren [Matsukawa et al, 1993; Wang et al, 2000]. Andere Flavonoide, wie das Flavonol Quercetin sind aufgrund ihrer biologischen Wirkungen in der Lage, Zellen sowohl in der  $G_1$ - als auch in der  $G_2$ -Phase zurück zu halten [Ranelletti et al, 1992; Yoshida et al, 1992; Wang et al, 2000; Choi et al, 2001; Ramos et al, 2005].

Die Interaktion von Apfelpolyphenolen mit Elementen von Signaltransduktionskaskaden, die von Bedeutung sind für die Zellproliferation, wie die MAPK-Kaskade, der Wnt-Signalweg oder PKC-vermittelte Signale (Tabelle 12), lassen eine Rückhaltung der HT29-Zellen in der  $G_1$ -Phase des Zellzyklus erwarten. Des Weiteren wird der  $G_1$ -Arrest durch Quercetin damit in Zusammenhang gebracht, dass die CDK-inhibierenden Proteine p21 und p27 aktiviert werden [Casagrande und Darbon, 2001]. Außerdem inhibiert Quercetin die Aktivität der CDK2 und der Phosphoinositol-3-Kinase, was ebenfalls mit einer Blockierung in der  $G_1$ -Phase assoziiert wird [Agullo et al, 1997; Ferriola et al, 1989; Casagrande und Darbon, 2001]. Die Behandlung der in  $G_1$ -synchronisierten Zellen mit den potenten EGFR-Hemmstoffen AE02 und Quercetin führten zu einem leichten jedoch zu keinem signifikanten Anstieg der HT29-Zellen in  $G_1$  (Abbildung 66A+B). Im Gegensatz dazu, blockieren sowohl der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 als auch Quercetin  $G_2/M$ -synchronisierte HT29-Zellen signifikant in der  $G_2/M$ -Phase (Abbildung 68A+B). Die effektive Blockierung in der  $G_2/M$ -Phase durch Quercetin kann mit dessen Hemmwirkung auf die Aktivität humaner Topoisomerasen oder auf die Tubulinpolymerisation in Verbindung gebracht werden [Boege et al, 1996; Constantinou et al, 1996; Gupta und Panda, 2002]. Phloretin, welches im Vergleich zu Quercetin und AE02 eher als schlechterer Hemmstoff der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA angesehen werden kann (Abbildung 38B), blockiert hoch signifikant den  $G_1$ -Übergang (Abbildung 66C). Der Effekt von Phloretin auf die  $G_2/M$ -Phase von HT29-Zellen ist deutlich weniger ausgeprägt (Abbildung

68C). Insgesamt zeigt Phloretin erst in hohen Konzentrationen ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) signifikante Effekte auf die Zellzyklusverteilung von humanen Kolontumorzellen, was sich auch in der Beeinflussung weiterer zellulärer Zielstrukturen widerspiegelt (Tabelle 12)

Die Blockierung der Zellzyklusphasen ( $G_1$ -Phase und vor allem  $G_2$ -Phase) durch Inkubation von HT29-Zellen mit polyphenolreichen Apfelsaftextrakt kann nicht auf die untersuchten Polyphenole Phloretin und Quercetin zurückgeführt werden, da die freien Aglyka bislang noch nicht im Apfelsaftextrakt AE02 detektiert wurden. Der Apfelinhaltsstoff Phloridzin erwies sich als unwirksam (Abbildung 66D, Abbildung 68D), was aufgrund seiner marginalen zellulären Wirkungen (Tabelle 12) zu erwarten war. Die bekannten Apfelinhaltsstoffe Chlorogensäure und EC zeigen nur marginale Effekte auf die Zellzyklusverteilung der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 [Ramos et al, 2005]. Im Gegensatz dazu wurden schon oligomere Procyanidine als Substanzklasse beschrieben, die humane Tumorzellen sowohl in der  $G_1$ -Phase als auch in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus *in vitro* arretieren und Apoptose induzieren [Agarwal et al, 2000; Carnesecchi et al, 2002; Koziowski et al, 2003]. Dies könnte zum einen auf die Hemmwirkung der oligomeren Procyanidine auf die Aktivität des EGFR (Abbildung 44, Abbildung 47) und zum anderen auf die Inhibierung humaner Topoisomerasen zurückgeführt werden [Jo et al, 2006]. Die Procyanidine könnten auch zum starken Arrest in der  $G_2/M$ -Phase unsynchronisierter Kolontumorzellen (SW620) durch procyanidinreichen Apfelsaftextrakt beitragen, da sich im Gegensatz dazu, die Apfelsaftfraktion reich an monomeren Polyphenolen als unwirksam erwies [Gossé et al, 2005].

Zusammenfassend unterstützt der durch Apfelpolyphenole induzierte Arrest in der  $G_1$ -Phase (Abbildung 66A+B+C) die Vermutung, dass die Hemmung der Aktivität und/oder Expression von Elementen proliferationsassoziiierter Signalkaskaden, einen Beitrag zur Wachstumshemmung von humanen Tumorzellen *in vitro* leistet. Jedoch legen die stärkeren Effekte auf die  $G_2/M$ -Phase, vor allem durch AE02 und Quercetin (Abbildung 68A+B) nahe, dass weitere zelluläre Zielstrukturen im Wesentlichen durch Apfelpolyphenole beeinflusst werden müssen.

## 4.7 Zusammenfassende Tabelle zur zellulären Wirkung von Apfelpolyphenolen

In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse der zellulären Wirkungen des Apfelsaftextraktes AE02 sowie des charakteristischen Apfelinhaltsstoffes Phloridzin und der Aglyka Phloretin und Quercetin zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Zelluläre Effekte des Apfelsaftextraktes AE02, Phloridzin und der Aglyka Phloretin und Quercetin. n. b. nicht getestet; **a)** keine Hemmwirkung bis 300  $\mu\text{M}$ ; **b)** Zellinkubation (HT29, 24 h, serumfrei); \* $\text{IC}_{50}$ -Werte. In Klammern sind inhibitorische Effekte, die nicht den  $\text{IC}_{50}$ -Wert erreichen bzw. induzierende Effekte dargestellt.

	AE02 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Quercetin [ $\mu\text{M}$ ]	Phloretin [ $\mu\text{M}$ ]	Phloridzin [ $\mu\text{M}$ ]
Wachstumshemmung (72 h Inkubation, Kapitel 4.1)	134 $\pm$ 18*	52 $\pm$ 11*	89 $\pm$ 18*	- <sup>a</sup>
PTK-Aktivität des EGFR (ELISA, Kapitel 4.2.1)	10 $\pm$ 5*	0,9 $\pm$ 0,4*	43 $\pm$ 5*	267 $\pm$ 50*
Autophosphorylierung des EGFR (HT29-Zellen, 45 min Inkubation, Kapitel 4.2.2)	4,9 $\pm$ 2,4*	0,6 $\pm$ 0,1*	- <sup>a</sup>	n. b.
Phospho-ERK1/2 (HT29-Zellen, 5 h Inkubation, Kapitel 4.2.3)	0,1 (~ 50%)	10 (50 %)	150 (~50 %)	n. b.
Aktivität der isolierten GSK3 $\beta$ (Kapitel 4.3.1)	329 $\pm$ 30*	7,5 $\pm$ 1,8*	123 $\pm$ 27*	- <sup>a</sup>
Zelluläre GSK3 $\beta$ -Aktivität <sup>b</sup> (Kapitel 4.3.2)	500 (~ 50 %)	100 (~150 %)	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
GSK3 $\beta$ -Gesamtproteinmenge <sup>b</sup> (Kapitel 4.3.3)	500 (~ 155 %)	n. b.	- <sup>a</sup>	n. b.
$\beta$ -Catenin <sup>b</sup> (Kapitel 4.3.3)	500 (~ 65 %)	n. b.	- <sup>a</sup>	n. b.
Phosphoryliertes $\beta$ -Catenin <sup>b</sup> (Kapitel 4.3.3)	500 (~ 72 %)	n. b.	- <sup>a</sup>	n. b.
Aktivität der isolierten PKC (Kapitel 4.4.1)	1875 $\pm$ 65*	25 (40 %)	203 $\pm$ 19*	- <sup>a</sup>
Zelluläre PKC-Aktivität <sup>b</sup>	403 $\pm$ 88*	82 $\pm$ 5*	100 (~ 58 %)	- <sup>a</sup>

(Kapitel 4.4.2)				
PKC $\alpha$ -Gesamtproteinmenge <sup>b</sup> (Kapitel 4.5.1)	424 $\pm$ 17*	100 (66 %)	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
PKC $\delta$ -Gesamtproteinmenge <sup>b</sup> (Kapitel 4.5.1)	500 (134%)	100 (152 %)	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Caspase-3-Aktivierung <sup>b</sup> (Kapitel 4.5.3)	750 (550 %)	100 (600 %)	250 (450 %)	500 (140 %)
DNA-Fragmentierung <sup>b</sup> (Kapitel 4.5.4)	750 (360 %)	150 (190 %)	400 (274 %)	- <sup>a</sup>
Zellzykluseffekte auf G <sub>1</sub> (HT29-Zellen, 36 h Inkubation, Kapitel 4.6.1)	Anreicherung	Anreicherung	Anreicherung * p: < 0,05	Leichte Anreicherung
Zellzykluseffekte auf G <sub>2</sub> /M (HT29-Zellen, 36 h Inkubation, Kapitel 4.6.2)	Anreicherung *** p: < 0,005	Anreicherung *** p: < 0,005	Anreicherung * p: < 0,05	- <sup>a</sup>

Die Zusammenfassung der Ergebnisse verdeutlicht die herausragende Wirkqualität des polyphenolreichen Apfelsaftextraktes AE02 auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor und seiner nachgeschalteten Kinasekaskade. Im Falle des AE02 können die zellulären Wirkungen wie folgt zusammengefasst werden:

EGFR  $\approx$  MAPK-Kaskade  $\gg$  PKC  $\approx$  Wnt-Signalweg  $\approx$  Apoptose

Quercetin zeigte ebenfalls hoch potente Hemmwirkungen auf die Aktivität des EGFR und Elemente der MAPK-Kaskade. Im Gegensatz zum AE02, konnte Quercetin als potenter Hemmstoff der isolierten Kinasen PKC und GSK3 $\beta$  identifiziert werden. Die Wirkqualität von Quercetin kann somit wie folgt zusammengefasst werden:

EGFR > pERK1/2  $\approx$  isolierte GSK3 $\beta$   $\approx$  isolierte PKC [Agullo et al, 1999] > zelluläre

PKC  $\approx$  zelluläre GSK3 $\beta$   $\approx$  Apoptose

Das Dihydrochalcon Phloretin greift nur marginal in proliferationsassoziierte Signalwege ein. Seine Hemmwirkungen liegen im Vergleich zum Quercetin in deutlich höheren Konzentrationen (3 – 40 x). Der Apfelinhaltsstoff Phloridzin erwies sich nahezu in allen Testsystemen als unwirksam.

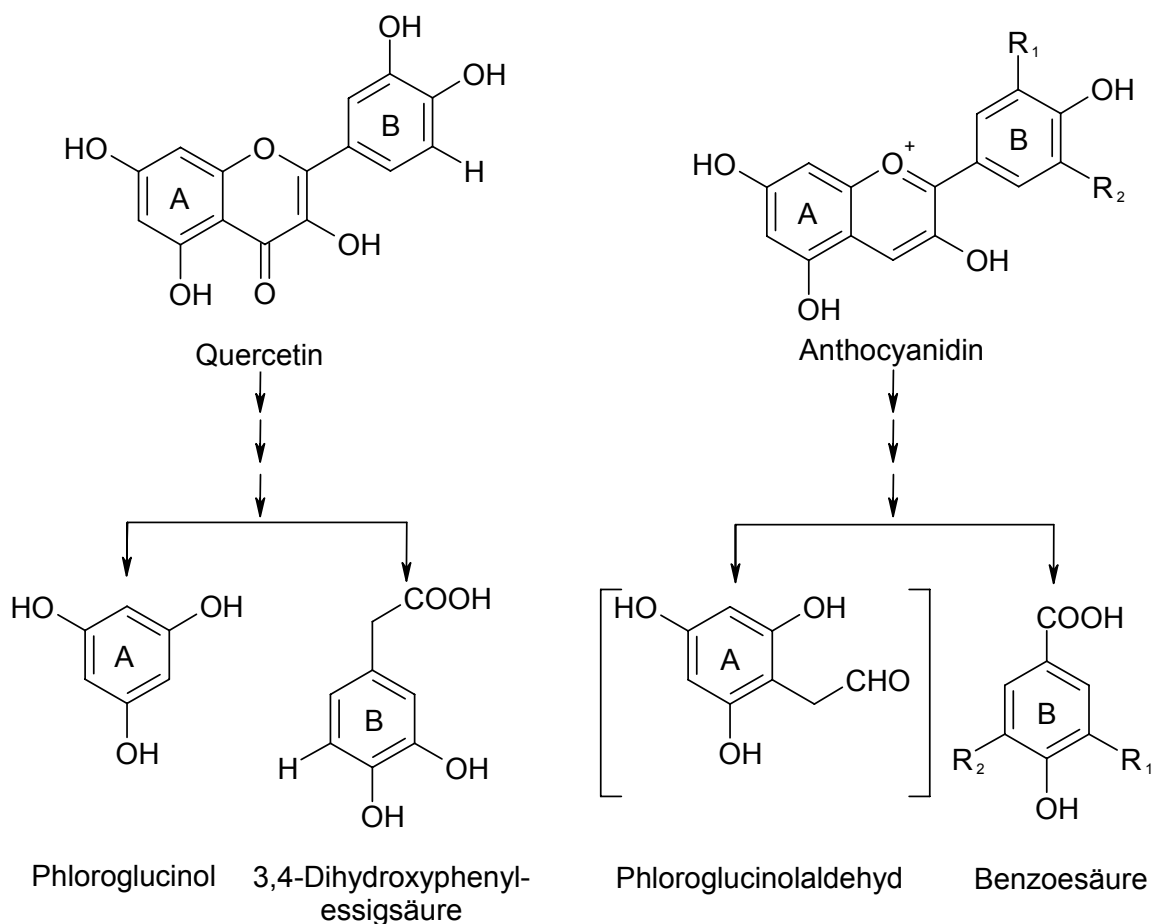
#### 4.8 Zelluläre Wirkungen von Flavonoidabbauprodukten

Polyphenole unterliegen einem intensiven Abbau sowohl unter den gegebenen Kulturbedingungen *in vitro* als auch durch die Mikroflora des GIT *in vivo*. So konnte für einige Inhaltsstoffe der untersuchten Apfelsaftextrakte bereits ein schneller Abbau gezeigt werden [Schäfer et al, 2005]. In den Versuchen erwies sich, dass die Glykoside (Phloridzin, Rutin) wesentlich langsamer abgebaut werden als die freien Aglyka Phloretin und Quercetin, welche geringe Halbwertszeiten von 2 h aufweisen. Für die Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure und Chlorogensäure sowie das Flavan-3-ol EC wurden Halbwertszeiten zwischen sieben und dreizehn Stunden bestimmt [Schäfer et al, 2006]. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Abbau der untersuchten Apfelpolyphenole in den verwendeten *in vitro*-Testsystemen nicht auszuschließen ist. Daraus ergab sich einerseits die Frage nach der biologischen Wirksamkeit der Abbauprodukte und andererseits die Frage, ob die beschriebenen biologischen Wirkungen der Apfelpolyphenole auf die Ursprungssubstanzen selbst zurückzuführen sind, bzw. welchen Anteil die korrespondierenden Abbauprodukte dazu beitragen.

Durch Inkubation der Flavonoide mit humanen Mikroorganismen (*Eubacterium ramulus*, *Clostridium orbiscindens*, *Enterococcus casseliflavus*) wurden bereits eine Reihe von Abbauprodukten charakterisiert. Als Hauptabbauprodukte von Quercetin bzw. seiner Glykoside wurde 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (B-Ring) und Phloroglucinol (A-Ring) identifiziert (Abbildung 69) [Aura et al, 2002; Blaut et al, 2003]. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure kann weiter zu 3-Hydroxyessigsäure dehydroxyliert werden [Aura et al. 2002]. Auch in anderen *in vitro*-Untersuchungen wurden Mono- und Dihydroxyphenylelessigsäuren, sowie Hydroxybenzoesäuren, und Hydroxyzimtsäuren als Abbauprodukte von Quercetinglykosiden nachgewiesen [Schneider et al. 1999; Justensens et al. 2000]. Im Wesentlichen führt der mikrobielle Abbau also zu einer Spaltung des C-Ringes unter Entstehung verschiedener hydroxylierter, monomerer Phenolsäuren. Phloroglucinol kann je nach Bakterienart einem weiteren Abbau zu kurzkettigen Fettsäuren unterliegen. Intestinale Mikroorganismen sind ebenfalls in der Lage, Anthocyane abzubauen. Nach Abspaltung des Zuckerrestes wird ein Abbau zum nicht stabilen Phloroglucinolaldehyd (A-Ring) und der entsprechenden Benzoessäure (B-Ring; Abbildung 69; Tabelle 13) postuliert [Keppler und Humpf, 2005; Fleschhut et al, 2006].



Jedoch ist die Datenlage zu potentiellen Abbauprodukten bislang so limitiert, dass nicht auszuschließen ist, dass die bislang postulierten Abbauprodukte nicht auch aus den Polyphenolen z. B. den Procyanidinen der Apfelsaftextrakte entstehen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb zelluläre Wirkungen von postulierten Flavonoidabbauprodukten im Vergleich zu ihren beschriebenen Ursprungssubstanzen untersucht.



**Abbildung 69:** Schematische Darstellung der Abbaupfade von Quercetin [Braune et al, 2001; Blaut et al, 2003; Schoefer et al, 2003] und den Anthocyanidinen [Kepler und Humpf, 2005; Feschhut et al, 2006]. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> siehe Tabelle 13

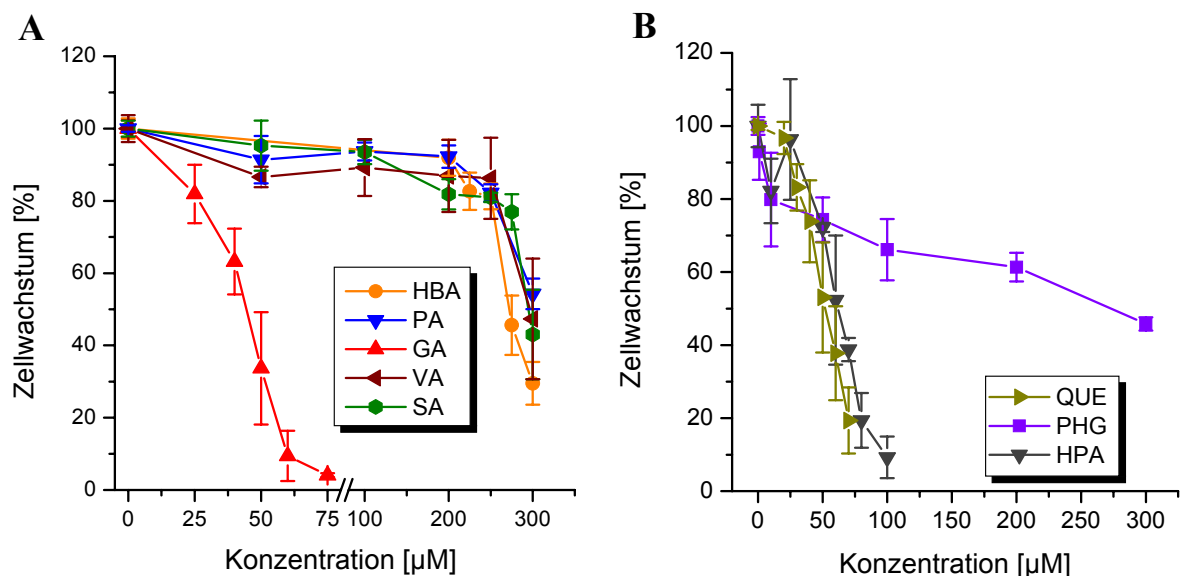
**Tabelle 13:** Anthocyanidine und ihre korrespondierenden Benzoessäuren [Fleschhut et al, 2006]

Anthocyanidin	Korrespondierende Benzoessäure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoessäure (HBA)	H	H
Cyanidin	Protocatechusäure (PA)	OH	H
Delphinidin	Gallussäure (GA)	OH	OH
Päonidin	Vanillinsäure (VA)	OCH <sub>3</sub>	H
Malvidin	Syringasäure (SA)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

### 4.8.1 Modulation des Wachstums von HT29-Zellen *in vitro* durch die Abbauprodukte der Flavonoide

Die Effekte von Phenolcarbonsäuren als potentielle Flavonoidabbauprodukte auf das Wachstum von HT29-Zellen, wurde mittels SRB-Test (72 h Inkubation, serumhaltig) bestimmt (Kapitel 6.5).

Aus der Gruppe der Benzoesäuren, die durch Abbau der Anthocyanidine postuliert wurden, zeigte nur die Gallussäure (GA) wachstumshemmende Eigenschaften (Abbildung 70A, Tabelle 14). Das aus dem A-Ring von Quercetin resultierende Phloroglucinol (PHG) beeinflusst nur marginal das Wachstum von HT29-Zellen (Abbildung 70B, Tabelle 14). Im Gegensatz dazu konnte die aus dem B-Ring entstehende 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (HPA) als potenter Inhibitor des Wachstums der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit vergleichbarer Hemmwirkung im Bezug auf Quercetin (QUE), identifiziert werden (Abbildung 70B, Tabelle 14) [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht].

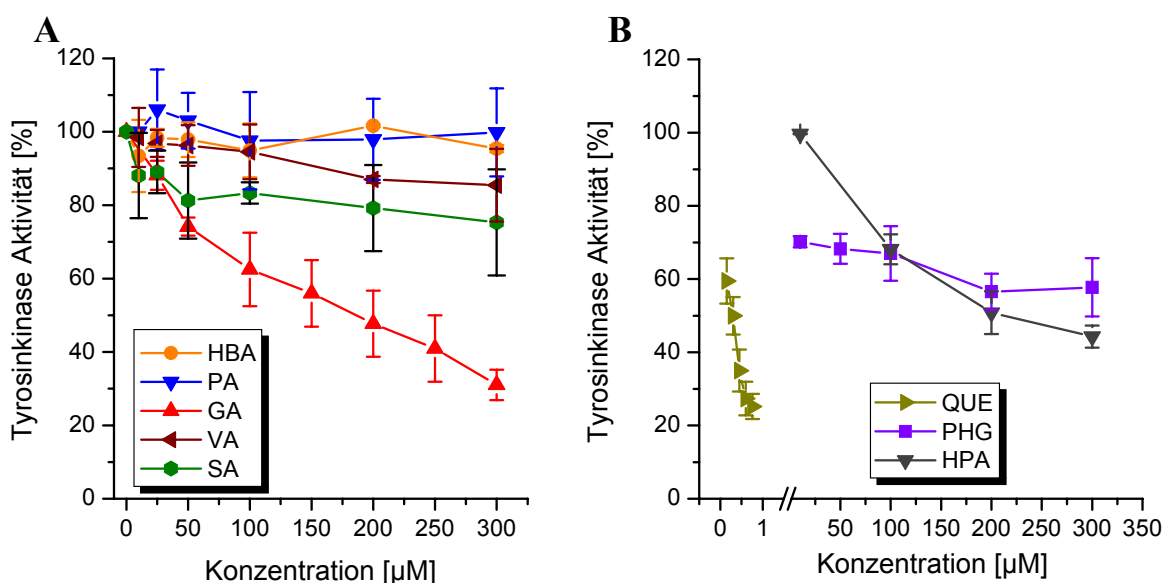


**Abbildung 70:** Hemmung des Wachstums von HT29-Zellen (72 h, serumfrei) im SRB-Test durch **A:** Benzoesäuren und **B:** QUE [Kern et al, 2005] im Vergleich zu seinen Abbauprodukten PHG und HPA gemessen im SRB-Test. MW  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht]. Im Kapitel 4.8.1 nicht erklärte Abkürzungen, HBA, 4-Hydroxybenzoesäure; PA, Protocatechusäure; VA, Vanillinsäure; SA, Syringasäure.

#### 4.8.2 Modulation der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA

Die Hemmwirkung ausgewählter Abbauprodukte auf die PTK-Aktivität des aus A431-Zellen isolierten EGFR wurde mittels ELISA bestimmt (Kapitel 6.8).

GA erwies sich als Hemmstoff der PTK-Aktivität im ELISA, jedoch erst in sehr hohen Konzentrationen (Abbildung 71A, Tabelle 14). Die Benzoessäuren Vanillinsäure (VA) und Syringasäure (SA) zeigten nur marginale Hemmeffekte in Konzentrationen  $> 300 \mu\text{M}$  (Abbildung 71A, Tabelle 14). 4-Hydroxybenzoessäure (HBA) und Protocatechusäure (PA) erwiesen sich als ineffektiv bis  $300 \mu\text{M}$  (Abbildung 71A, Tabelle 14). PHG und HPA stellten schlechtere Inhibitoren der PTK-Aktivität des EGFR im Vergleich zum entsprechenden Flavonol QUE (Abbildung 71B, Tabelle 14) dar [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht].



**Abbildung 71:** Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch **A:** Benzoessäuren und **B:** Quercetin im Vergleich zu den entsprechenden Abbauprodukten PHG und HPA. MW  $\pm$  SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht].

In der Tabelle 14 sind alle Daten zu den biologischen Wirkungen (SRB-Test, EGFR-ELISA) sowohl der Flavonoide als auch der untersuchten Abbauprodukte zusammengefasst.

**Tabelle 14:** Effekte der Anthocyanidine, Quercetin und ihren beschriebenen Abbauprodukten auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB-Test, 72h Inkubation) und auf die PTK-Aktivität des EGFR (ELISA). <sup>a</sup>Kein Effekt bis 300  $\mu\text{M}$ . <sup>1</sup>Bereits veröffentlicht in [Marko et al, 2004; Kern et al, 2005]

Testsubstanz	Wachstumshemmung IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	EGFR ELISA IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
p-Hydroxybenzoesäure (HPA)	269 $\pm$ 26	- <sup>a</sup>
Protocatechusäure (PA)	> 300	- <sup>a</sup>
Gallussäure (GA)	42 $\pm$ 8	189 $\pm$ 15
Vanillinsäure (VA)	297 $\pm$ 88	- <sup>a</sup>
Syringasäure (SA)	295 $\pm$ 75	> 300
Phloroglucinol (PHG)	273 $\pm$ 33	> 300
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (HPA)	58 $\pm$ 8	253 $\pm$ 33
Pelargonidin (PG) <sup>1</sup>	213 $\pm$ 66	90 $\pm$ 17
Cyanidin (CY) <sup>1</sup>	57 $\pm$ 3	0,8 $\pm$ 0,2
Delphinidin (DEL) <sup>1</sup>	35 $\pm$ 5	1,1 $\pm$ 0,2
Päonidin (PN) <sup>1</sup>	90 $\pm$ 21	143 $\pm$ 18
Malvidin (MV) <sup>1</sup>	35 $\pm$ 6	210 $\pm$ 41
Quercetin (QUE) <sup>1</sup>	52 $\pm$ 11	0,9 $\pm$ 0,4

Als potente Inhibitoren des Wachstums von humanen Tumorzellen wurden bereits die Anthocyanidine DEL, CY und MV identifiziert [Meiers et al, 2001; Marko et al, 2004; Hyun und Chung, 2004; Shih et al, 2005]. Von den postulierten Abbauprodukten der Anthocyanidine, den Benzoesäuren, zeigte nur GA potente wachstumshemmende Eigenschaften (Abbildung 70A, Tabelle 14). GA, das durch den Abbau von DEL entsteht kann, ist in der Literatur als Inhibitor des Wachstums von humanen Kolonkarzinomzellen beschrieben [Yoshioka et al, 2000; Salucci et al, 2002]. Der zellwachstumshemmende Effekt von GA ist vergleichbar mit dem der beschriebenen Ursprungssubstanz DEL (Tabelle 14), so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Abbau zu GA zu den wachstumshemmenden Eigenschaften von DEL beiträgt. Die Anthocyanidine MV und CY erwiesen sich

ebenfalls als potente Inhibitoren des Wachstums von HT29-Zellen [Marko et al, 2004], wohingegen ihre korrespondierenden Abbauprodukte, SA und PA, nur marginal das Zellwachstum beeinflussen (Tabelle 14, Abbildung 70A). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Benzoesäuren SA und PA, einen Beitrag zum wachstumshemmenden Potential von MV und CY leisten.

Aufgrund der chemischen Instabilität des aus dem A-Ring der Anthocyanidine generierten Phloroglucinolaldehyds [Seeram et al, 2001; Keppler und Humpf, 2005; Fleischhut et al, 2006], konnte dessen biologische Wirkungen nicht bestimmt werden. Unabhängig vom Substitutionsmuster des B-Ringes wird durch den Abbau aller Anthocyanidine immer derselbe Aldehyd erzeugt [Fleischhut et al, 2006]. Die korrespondierenden Benzoesäuren von CY, PG, PN und MV beeinflussen nur marginal das Tumorzellwachstum (Abbildung 70A). Die Anthocyanidine müssten jedoch gleiche Hemmwirkungen aufweisen, wenn der Aldehyd für die wachstumshemmenden Eigenschaften verantwortlich sein sollte, was sie aber nicht tun (Tabelle 14). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Substitutionsmuster am B-Ring die Stabilität der Anthocyanidine im gewählten *in vitro*-Testsystem beeinflusst und somit auch die Freisetzung des Aldehyds [Fleischhut et al, 2006]. DEL und GA besitzen vergleichbare inhibitorische Eigenschaften auf das Wachstum von HT29-Zellen im SRB-Test. Würden dem Aldehyd wachstumshemmende Eigenschaften zugesprochen werden, müsste DEL, das sowohl zu GA als auch dem Aldehyd abgebaut wird, ein potenterer Inhibitor des Zellwachstums im Vergleich zur GA sein. Des Weiteren müsste die Hemmwirkung von DEL besser sein als die von CY und MV, was sich nicht so darstellt (Tabelle 14). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Abbauprodukte nicht verantwortlich sind für die gefundenen wachstumshemmenden Eigenschaften der Anthocyanidine. Im Fall vom DEL kann ein additiver wachstumshemmender Effekt seines Abbauproduktes GA nicht ausgeschlossen werden. Die Steigerung des wachstumshemmenden Potentials von DEL durch sein Abbauprodukt GA, könnte möglicherweise eine Erklärung für den gefundenen Unterschied der inhibitorischen Eigenschaften von DEL und CY (Tabelle 14) auf das Wachstum von HT29-Zellen sein, obwohl DEL und CY identische Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität im EGFR-ELISA zeigen [Marko et al, 2004]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der postulierte Abbau von Anthocyanidinen verbunden ist mit einem Verlust an biologischer Aktivität. Nur im Falle von DEL entsteht ein Abbauprodukt, GA, das ein vergleichbares wachstumshemmendes Potential besitzt. Jedoch scheinen DEL und GA unterschiedliche Wirkmechanismen zu besitzen. DEL ist ein be-

kannter Inhibitor der PTK-Aktivität des EGFR, wohingegen GA nur eine marginale Hemmwirkung aufweist (Tabelle 14, Abbildung 71A). Die effektive Wachstumshemmung von GA muss somit durch einen noch unbekanntem Mechanismus vermittelt werden.

Der Abbau des Flavonols QUE resultiert unter anderem in zwei Abbauprodukte mit wachstumshemmenden Eigenschaften. Das aus dem A-Ring entstehende PHG zählt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $273 \pm 33 \mu\text{M}$  zu den eher schlechten Hemmstoffen des Kolontumorzellwachstums. HPA weist eine ähnlich potente Hemmwirkung wie das Ausgangsflavonol QUE auf (Abbildung 70, Tabelle 14). Die Hemmwirkung von HPA auf das Wachstum von humanen Kolontumorzellen wurde auch von Gao et al. [2006] beschrieben. Die kalkulierte Summe der wachstumshemmenden Eigenschaften von HPA und PHG ergibt die Hemmwirkung von QUE alleine. Aufgrund dieser Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Abbauprodukte für die beschriebenen wachstumshemmenden Eigenschaften von QUE *in vitro* verantwortlich sind. Jedoch scheinen die Abbauprodukte ein anderes zelluläres Wirkprofil als QUE zu besitzen. QUE hemmt potent die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA (Abbildung 38A) sowie auch die Autophosphorylierung des EGFR (Abbildung 46) und weitere Elemente, der dem EGFR nachgeschalteten MAPK-Kaskade (Abbildung 49). Im Gegensatz dazu beeinflusst HPA nur marginal die PTK-Aktivität (Abbildung 71B, Tabelle 14) [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.* eingereicht].

Der EGFR und seine nachgeschaltete MAPK-Kaskade sind involviert in die Regulation der Zellproliferation. Flavonoide verschiedener Klassen modulieren die Aktivität des EGFR sowie verschiedener Elemente der MAPK-Kaskade [Akiyama et al, 1987; Agullo et al, 1997; Liang et al, 1997; Hagiwara et al, 1998; Meiers et al, 2001; Marko et al, 2004; Kern et al, 2005]. DEL, CY und QUE wurden als Hemmstoffe der PTK-Aktivität des EGFR identifiziert [Marko et al, 2004; Kern et al, 2005]. Vicinale OH-Gruppen scheinen daher ein wichtiges Strukturmerkmal für eine potente EGFR-Hemmung zu sein [Agullo et al, 1997; Marko et al, 2004]. Im Gegensatz zu den Flavonoiden sind die entsprechenden Benzoesäuren mit vergleichbarem Hydroxylierungsmuster entweder schlechte EGFR-Inhibitoren (GA, PHA) oder inaktiv bis  $300 \mu\text{M}$  (PA). Dies führt zur Annahme, dass zusätzlich zu den Hydroxygruppen am B-Ring auch die Flavonoidstruktur zu einer potenten EGFR-Hemmung beiträgt.

Die MAPK-Kaskade ist über Schlüsselenzyme mit weiteren Signalkaskaden verknüpft (Abbildung 5). So kann die Serin/Threonin-Kinase Raf-1 durch die Proteinkinase A, einem

Element des cAMP-Weges, phosphoryliert und damit inaktiviert werden. Eine bedeutende Enzymfamilie des cAMP-Signalweges ist die Isoenzymfamilie der cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterasen (PDEs). In einer Vielzahl von Tumorzellen wird hauptsächlich die cAMP-spezifische PDE4 exprimiert [Marko et al, 2000; Marko et al, 2004]. Eine Hemmung der PDE4-Aktivität durch Lebensmittelinhaltsstoffe ist somit vom besonderen Interesse im Hinblick auf eine mögliche Chemoprävention. Einige Flavonoide sind bereits als Inhibitoren der isolierten und zellulären PDE-Aktivität *in vitro* beschrieben [Nikaido et al, 1989; Kuppusamy et al, 1992; Marko et al, 2004; Dell'Agli et al, 2005]. Marko et al. [2004] zeigten, dass aus der Gruppe der Anthocyanidine, vor allem am B-Ring methoxylierte Verbindungen (MV, PN) potente Inhibitoren der aus HT29-Zellen isolierten cAMP-hydrolysierenden PDE4-Aktivität darstellen. Jedoch scheint diese Struktur-Aktivitätsbeziehung nicht für alle Klassen der Flavonoide zu gelten, da das methoxylierte Flavon Tricin nur marginale inhibitorische Eigenschaften (40 % Hemmung bei 300  $\mu\text{M}$ ) besitzt [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res*, eingereicht]. Im Gegensatz dazu konnte QUE als potenter Inhibitor der isolierten cAMP-hydrolysierenden PDE4-Aktivität ( $\text{IC}_{50}$ -Wert  $17,6 = 5,7 \mu\text{M}$ ) in HT29-Zellen identifiziert werden [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht]. Eine zunehmende Hydroxylierung des B-Ringes der Anthocyanidine ist dagegen verbunden mit einem Verlust der Hemmwirkung auf die PDE4-Aktivität [Marko et al, 2004]. Ein weiterer Hinweis für die wichtige Rolle des Flavonoidgrundgerüsts für eine effektive Hemmwirkung auf die cAMP-hydrolysierende PDE4-Aktivität zeigen auch die Ergebnisse mit den untersuchten postulierten Abbauprodukten (VA, SA, GA, PA, HBA, HPA). Keines der untersuchten Abbauprodukte beeinflusst die PDE-Aktivität bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  (ohne Abbildung) [Kern et al, *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht].

Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zur Annahme, dass die Anthocyanidine selbst und nicht nur die Abbauprodukte das Wachstum von HT29-Zellen *in vitro* beeinflussen. Dies lässt sich möglicherweise auch auf die Apfelpolyphenole übertragen, da die Phenolcarbonsäuren vielleicht je nach Kulturbedingungen *in vitro* oder durch individuelle Unterschiede der Mikroflora *in vivo*, aus weiteren Polyphenolen entstehen können. So sind beispielsweise Phenolcarbonsäuren als Abbauprodukte der Procyanidine beschrieben [Rios et al, 2002].

Die untersuchten Phenolcarbonsäuren und Phloroglucinol besitzen nur marginale EGFR-inhibitorische Eigenschaften und erwiesen sich bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  als

ineffektiv auf die isolierte cAMP-hydrolysierende PDE4-Aktivität. Deshalb können die gemessenen Effekte auf die PTK-Aktivität des EGFR und auf die PDE4-Aktivität wahrscheinlich den nativen Polyphenolen zugesprochen werden. Durch den Abbau von QUE und DEL werden die Verbindungen HPA und GA postuliert, die das Wachstum von HT29-Zellen hemmen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen sind der Lebensmittelinhaltsstoff GA [Yoshioka et al, 2000; Salucci et al, 2002] und das postulierte Abbauprodukt HPA [Gao et al, 2006] schon als Hemmstoffe des Wachstums von humanen Tumorzellen beschrieben. Jedoch kann die gefundene Wachstumshemmung durch GA und HPA nicht auf eine Hemmung der Aktivität der untersuchten Signalkettenelemente begründet werden. Der Wirkmechanismus von HPA und GA, der zu einer Reduktion des Wachstums von humanen Kolonkarzinomzellen führt, wird derzeit intensiv untersucht.

Insgesamt lässt sich sagen, dass falls die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavonoidabbauprodukte auch *in vitro* durch Inkubation mit polyphenolreichen Apfelextrakten (z. B. AE02) entstehen, sie nur einen marginalen Anteil zu den gezeigten zellulären Effekten der Originalextrakte beitragen.



#### 4.9 Zusammenfassende Diskussion der zellulären Wirkungen von Apfelpolyphenole und potentiellen Abbauprodukten

Die getesteten Apfelsaftextrakte AE02, AE04 sowie der Apfeltresterextrakt AE03B erwiesen sich als potente Inhibitoren des Wachstums der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 *in vitro* (Abbildung 32). Auch die untersuchten Referenzsubstanzen, die Aglyka Phloretin und Quercetin besitzen wachstumshemmende Eigenschaften, wohingegen der charakteristische Apfelinhaltsstoff Phloridzin bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  das Wachstum der HT29-Zellen nicht beeinflusste (Tabelle 12). Apfelextrakte und Apfelpolyphenole werden in der Literatur als Hemmstoffe des Wachstums humaner Tumorzellen beschrieben [Eberhardt et al, 2000; Liu et al, 2001; Wolfe et al, 2003; Kern et al, 2005; Gossé et al, 2005; Veeriah et al, 2006]. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Abbildung 34) werden auch in der Literatur den bislang identifizierten Apfelpolyphenolen Kaffeesäure, Chlorogensäure und (-)-Epicatechin wachstumshemmende Eigenschaften *in vitro* zugesprochen [Hudson et al, 2000; Uesato et al, 2002; Seeram et al, 2003; Kampa et al, 2004; Ramos et al, 2005; Kern et al, 2005; Veeriah et al, 2006].

Jedoch tragen die bislang aus den Extrakten identifizierten Apfelpolyphenole aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in den Originalextrakten vermutlich nur wenig zur Hemmung des Wachstums von humanen Kolonkarzinomzellen *in vitro* durch Apfelextrakte bei. Die rekonstituierte Mischung A der identifizierten Inhaltsstoffe (Tabelle 10) stellte sich im Vergleich zum Originalextrakt AE02 als deutlich weniger potent heraus (Abbildung 33), weshalb eher von einer überadditiven Wirkung der Polyphenole in den Extrakten ausgegangen werden muss. Veeriah et al. [2006] untersuchten ebenfalls die wachstumshemmenden Eigenschaften von Polyphenolgemischen im Vergleich zum Apfelsaftextrakt AE02. Sie konnten analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit eine Diskrepanz zwischen den wachstumshemmenden Konzentrationen der rekonstituierten Mischungen und dem AE02 detektieren [Veeriah et al, 2006]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten legen nahe, dass bislang nicht identifizierte Inhaltsstoffe zum wachstumshemmenden Potential des Originalextraktes beitragen müssen. So wird z. B. den oligomeren Procyanidinen ein solches Potential zugesprochen, da gezeigt werden konnte, dass eine procyanidinreiche Apfelextraktfraktion (Procyanidingehalt 78 %) das Wachstum von humanen Kolontumorzellen *in vitro* hemmt [Gossé et al, 2005]. Im Gegensatz dazu beeinflusste eine Fraktion rein an monomeren Polyphenolen das Tumorzellwachstum nicht [Gossé et al, 2005].

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und seine nachgeschaltete Kinasekaskade spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Wachstums von HT29-Zellen *in vitro* [Marko et al, 2004]. Deswegen wurde untersucht, ob Apfelextrakte und ihre Inhaltsstoffe den EGFR sowie Elemente der mitogen aktivierbaren (MAPK)-Kaskade beeinflussen. Der Apfelsaftextrakt AE02 sowie der quercetinglykosidangereicherte Tresterextrakt AE03B zeigten eine hochpotente Hemmwirkung auf die Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität des EGFR im ELISA (Abbildung 40). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Apfelsaftextrakt AE02 potent die EGF-induzierte Phosphorylierung des EGFR nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen hemmt (Abbildung 45; Tabelle 12). Somit ist die beschriebene Hemmwirkung des AE02 nicht beschränkt auf das System der isolierten Rezeptorpräparation, sondern kommt auch im zellulären Testsystem zum Tragen.

Das Dihydrochalkon Phloretin hemmt die Aktivität des isolierten EGFR im ELISA (Abbildung 38B), jedoch zeigte Phloretin keine Hemmwirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen (Tabelle 12).

Quercetin erwies sich als potenter Inhibitor, sowohl der PTK-Aktivität des isolierten EGFR als auch der Autophosphorylierung des EGFR in intakten HT29-Zellen (Abbildung 38, Abbildung 46, Tabelle 12). Diese Ergebnisse stehen im Einklang, mit weiteren in der Literatur beschriebenen, *in vitro*-Untersuchungen an verschiedenen Zellsystemen [Richter et al, 1999; Lee et al, 2002; Boyer et al, 2004]. Die inhibitorischen Eigenschaften von Quercetin sind möglicherweise auf die vicinalen OH-Gruppen am B-Ring zu begründen, da dieses Strukturmerkmal entscheidend für eine potente Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität zu sein scheint [Agullo et al, 1997; Ferriola et al, 1989; Marko et al, 2004]. Jedoch konnte Quercetin in freier Form bislang nicht in den Apfelextrakten identifiziert werden.

Von den bislang identifizierten Inhaltsstoffen erwiesen sich die Quercetinglykoside Q-3-glc und Q-3-gal, sowie die Procyanidine B1 und B2 als potente Inhibitoren der PTK-Aktivität des isolierten EGFR (Abbildung 38A und C; Tabelle 11). Die Hemmwirkung der Quercetinglykoside auf die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA führten zu der Frage, ob sich ein möglicher Beitrag in der Hemmwirkung eines Quercetinglykosid-angereicherten Tresterextraktes (AE03B, Tabelle 9) im Vergleich zum Apfelsaftextrakt AE02 widerspiegelt. Es wurde gezeigt, dass der Tresterextrakt AE03B ( $IC_{50} = 1,6 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zum Apfelsaftextrakt AE02 ( $IC_{50} = 10 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ; Abbildung 40) potenter die PTK-Aktivität des EGFR im ELISA hemmt. Dies lässt auf einen möglichen Beitrag der Quercetinglykoside zur Hemmung des EGFR im ELISA schließen. Jedoch erwies sich der Trester-

reextrakt AE03B als schlechterer Hemmstoff des Wachstums von humanen Kolontumorzellen *in vitro* im Vergleich zum AE02 (Abbildung 32). Die untersuchten isoliert getesteten Quercetinglykoside zeigten keine Wachstumshemmwirkung bis 300  $\mu\text{M}$  im SRB-Test (HT29-Zellen, 72 h, Tabelle 11) [Kern et al, 2005]. Somit könnte die schlechtere Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch den AE03B möglicherweise eine geringere zelluläre Aufnahme (durch die Anreicherung der Quercetinglykoside) zurückgeführt werden. Damit wäre eine Quercetinglykosid-Anreicherung zwar von Relevanz für das Testsystem der isolierten Rezeptorpräparation im ELISA, jedoch käme es nicht im zellulären Testsystem zum Tragen. Einen Aufschluss dazu könnten weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus des EGFR, als ein Maß für dessen Aktivität in HT29-Zellen, durch den Tresterextrakt AE03B liefern [Fridrich et al, in Bearbeitung].

Den bislang identifizierten Inhaltsstoffen kann jedoch insgesamt ein marginaler Beitrag zur inhibitorischen Qualität am EGFR der Extrakte zugesprochen werden, da sie nur in geringeren Konzentrationen (niedriger nanomolarer Bereich) in den Apfelextrakten vorliegen. Überadditive/synergistische Effekte der bislang identifizierten Einzelverbindungen können ebenso weitestgehend ausgeschlossen werden, da sich Mischungen dieser Verbindungen (Mischung A und B; Tabelle 10, Abbildung 38D) als unwirksam erwiesen. Mit Hilfe von aktivitätsgeleiteter Fraktionierung wurde begonnen, die Inhaltsstoffe zu identifizieren, die für die potente Hemmwirkung der Apfelextrakte auf die PTK-Aktivität des EGFR verantwortlichen sein könnten. Es konnten vor allem procyanidinhaltige Fraktionen als besonders effektiv im EGFR-ELISA ( $\text{IC}_{50}$ -Wert  $< 0,1 \mu\text{g/ml}$ , Abbildung 43) identifiziert werden. Die Hemmwirkung steigt dabei mit dem Grad der Oligomerisierung (Monomer bis Tetramer) der Procyanidine an (Abbildung 43). Aufgrund von Untersuchungen mit isolierten Apfelprocyanidinen konnten die Hemmwirkungen auf die PTK-Aktivität des isolierten EGFR wie folgt festgelegt werden: Procyanidintetramer  $>$  Procyanidintrimer  $\gg$  Procyanidindimer  $\gg$  Procyanidinmonomer (Abbildung 44). Ein procyanidinreicher Extrakt aus Traubenkernen wurde bereits als Hemmstoff der EGF-induzierten Phosphorylierung des EGFR humaner Tumorzellen beschrieben [Tyagi et al, 2003]. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Reduktion des Phosphorylierungsstatus des EGFR (als Maß für dessen Aktivität) durch ein aus dem Apfelextrakt aufgereinigtes Procyanidintrimer gezeigt werden (Abbildung 47). In der Literatur sind Effekte von procyanidinreichen Extrakten auf die extrazellulär regulierten Kinasen ERK1/2, Elemente der dem EGFR nachgeschalteten MAPK-Kaskade, beschrieben [Agarwal et al, 2000; Tyagi et al, 2003; Vayalil et al, 2004].

Procyanidine können somit in Signaltransduktionskaskaden eingreifen, die entscheidend sind für Zellproliferation und Induktion von Apoptose und könnten dadurch zu den inhibitorischen Eigenschaften von Apfelextrakten auf das Tumorzellwachstum *in vitro* beitragen. Interaktionen eines procyanidinreichen Apfelsaftextraktes mit der Zellmembran, die möglicherweise zu zusätzlichen Modulationen von Elementen verschiedener Signaltransduktionskaskaden führen, wurden ebenfalls postuliert [Gossé et al, 2005]. Jedoch ist zu beachten, dass auch *in vitro* die Bioverfügbarkeit von Procyanidinen limitiert ist. So wurden in einem Modellversuch zur intestinalen Resorption durch die humane Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 nur Procyanidindimere und Procyanidintrimere so effektiv wie das Monomer (-)-Epicatechin zellulär aufgenommen [Deprez et al, 2001].

Der Apfelsaftextrakt AE02 sowie die Aglyka Quercetin und Phloretin hemmen den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 (Abbildung 48 +Abbildung 49 +Abbildung 50). Konzentrationen des Apfelsaftextraktes ( $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ , 5 h Inkubation) und Quercetin ( $\geq 50 \mu\text{M}$ , 45 min Inkubation) führen in HT29-Zellen zu einem Wiederanstieg des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2. Die Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 geht jedoch nicht einher mit einer gesteigerten Zellproliferation von HT29-Zellen (Tabelle 11) [Kern et al, 2005]. Dies legt den Schluss nahe, dass ein Anstieg von phosphoryliertem ERK1/2 in höheren Konzentrationen des AE02 möglicherweise durch die Interferenz von Extraktinhaltsstoffen mit anderen zellulären Zielstrukturen kompensiert wird. Zum einen kann dies an der Beeinflussung weiterer Signalelemente/Signalwege liegen, die den wachstumsstimulierenden Effekt durch den Wiederanstieg an phosphoryliertem ERK1/2 aufheben. Zum anderen wird in der Literatur die Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 als Teil des apoptotischen Prozesses diskutiert [Tyagi et al, 2003; Park et al, 2004; Nguyen et al, 2004; Vayalil et al, 2004; Gossé et al, 2005]. Anzumerken ist, dass die Fähigkeit des MAPK/ERK-Signalweges, die Zellproliferation bzw. den Zelltod zu regulieren, abhängig ist vom Zelltyp und der Dauer der ERK-Aktivierung. So soll eine kurzzeitige Aktivierung mit der Zellproliferation assoziiert sein, wohingegen eine anhaltende Aktivierung die DNA-Synthese inhibiert [Nguyen et al, 2004]. Deswegen würde möglicherweise der Anstieg des Gehaltes an phosphoryliertem ERK1/2 durch eine fünfständige Inkubation mit dem Apfelsaftextrakt für proapoptotische Signale sprechen. Vor allem, da der Wiederanstieg an phospho-ERK1/2 in Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{g/ml}$ , Maximum bei  $500 \mu\text{g/ml}$ , Abbildung 48) zu beobachten ist, in denen nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 Apoptose ausgelöst wird (Tabelle 12, Abbildung 63, Abbildung 64). Eine zusätzliche Er-

klärung wäre eine mögliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 bei hohen Apfelsaftextraktkonzentrationen (>100 µg/ml). *In vitro* wurde bereits die Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beschrieben [Hung et al, 2003; Nguyen et al, 2004]. Jedoch entstehen durch die Inkubation von HT29-Zellen mit 500 µg/ml AE02 nur niedrig mikromolare Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Pool-Zobel, persönliche Mitteilung]. In den oben beschriebenen Versuchen zur Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 wurden jedoch millimolare Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingesetzt [Hung et al, 2003; Nguyen et al, 2004], so dass die Aufklärung des Beitrags der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion an den zellulären Effekten des AE02 weiteren Forschungsbedarf aufweist.

Die Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 durch Quercetin scheint nur eine kurzzeitige Zellreaktion zu sein, deren zellwachstumsstimulierender Effekt möglicherweise durch die Modulation weitere Signalkaskaden kompensiert wird. Dies würde sich auch in der Abnahme des Status an phosphoryliertem ERK1/2 durch Quercetin (100 µM) nach fünfständiger Inkubation widerspiegeln (Abbildung 49). Die Modulation von phosphoryliertem ERK1/2 trägt wahrscheinlich zu den beschriebenen antiproliferativen Wirkungen von Quercetin auf humane Kolonkarzinomzellen *in vitro* bei (Tabelle 12). Eine zweite Begründung zur Induktion von phosphoryliertem ERK1/2 nach 45-minütiger Inkubation mit Quercetin (Abbildung 49) wäre die bereits beschriebene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entwicklung durch Zellinkubation mit Quercetin *in vitro* [Lapidot et al, 2002; Dashwood et al, 2002]. Das Peakmaximum dieser H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entwicklung wird jedoch schon nach wenigen Minuten erreicht; nach einer Stunde ist keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mehr im Medium nachweisbar [Lapidot et al, 2002]. Die schnelle Abnahme an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Kulturmedium könnte möglicherweise die Hemmwirkung von Quercetin auf den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nach fünfständiger Inkubation (kein U-förmiger Kurvenverlauf, Abbildung 49) erklären.

Des Weiteren wird eine Erhöhung der Expression an phosphoryliertem ERK1/2 im Zusammenhang mit der Inhibierung der Proteinkinase C (PKC)-Gesamtaktivität beschrieben [Pettersson et al, 2004]. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt (AE02) sowohl die aus HT29-Zellen isolierte PKC als auch die PKC-Aktivität nach Zellinkubation (24 h, HT29-Zellen) hemmt (Abbildung 57A, Abbildung 58A, Tabelle 12). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Gossé et al. [2005], die in der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW620 ebenfalls die PKC-Aktivität mit procyanidinreichen Apfelsaftextrakt hemmten.

Das Dihydrochalkon Phloretin erwies sich, wie in der Literatur beschrieben [Kobori et al, 1999], als Hemmstoff der PKC-Aktivität (Abbildung 57B, Abbildung 58B, Tabelle 12). In der Literatur wird Quercetin bereits als effektiver Hemmstoff der PKC diskutiert [Kang und Liang, 1997; Agullo et al, 1997; Williams et al, 2004]. Dies steht im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse (Abbildung 58B). Jedoch wird durch die Inkubation mit dem Apfelsaftextrakt AE02 bzw. mit den untersuchten Aglyka eine U-förmige Hemmkurve erhalten (Abbildung 58A und B). Eine Konzentrationserhöhung bewirkt einen Wiederanstieg der PKC-Enzymaktivität, der mit einer deutlichen Abnahme der Zellzahl einhergeht. Da keine PKC-Aktivierung durch Zugabe von AE02 bzw. von Phloretin und Quercetin zur isolierten Enzympräparation zu beobachten war, ist eine direkte substanzvermittelte Aktivierung, wie dies beispielsweise durch Phorbol ester und/oder  $\text{Ca}^{2+}$  für bestimmte PKC-Isoformen beschrieben ist [Dempsey et al, 2000], auszuschließen. Da die PKC-Aktivität durch Kurzzeitinkubationen (1 h und 3 h, Daten nicht gezeigt) mit Apfelpolyphenolen nicht beeinflusst wurde, sondern erst nach 24-stündiger Inkubationszeit, ist die Modulation der PKC-Aktivität möglicherweise ein durch Transkription und Translation, z.B. von Apoptose-induzierenden Genen und Proteinen, ausgelöster Folgeeffekt. So wird der Induktion einzelner PKC-Isoformen, wie z. B. der neuartigen PKC $\delta$  proapoptotischen Wirkungen zugesprochen [Koriyama et al, 1999; Gutcher et al, 2003; Sodhi und Sethi, 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Modulation der Expression proapoptotischer PKC $\delta$  durch Apfelpolyphenole im Zusammenhang mit einer möglichen Apoptoseinduktion untersucht. Der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 erhöhte in hoher Konzentration (500  $\mu\text{g/ml}$ ) signifikant den Proteingehalt an PKC $\delta$  in HT29-Zellen nach 24-stündiger serumfreier Inkubation (Abbildung 62, Tabelle 12). Die Inkubation von HT29-Zellen mit Quercetin führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge an PKC $\delta$  (Abbildung 62, Tabelle 12). Des Weiteren wird die Expression der als antiapoptotisch beschriebenen PKC $\alpha$  durch den Apfelsaftextrakt AE02 (500  $\mu\text{g/ml}$ ) hoch signifikant verringert (Abbildung 61, Tabelle 12). Die Reduktion der PKC $\alpha$ -Gesamtproteinmenge durch Quercetin erwies sich hingegen als nicht signifikant (Abbildung 61, Tabelle 12). Insgesamt stellte sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse der PKC-Untersuchungen im Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion stehen. Der Apfelsaftextrakt sowie die Aglyka Quercetin und Phloretin induzieren Caspase-3-Aktivität (Abbildung 63) und DNA-

Fragmentierung (Abbildung 64) nach 24-stündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen, wohingegen sich der charakteristische Apfelinhaltsstoff Phloridzin als weitgehend unwirksam erwies (Tabelle 12). Gossé et al. [2005] beschrieben ebenfalls eine Induktion der Caspase-3-Aktivität durch Inkubation von humanen Kolontumorzellen mit Apfel-extrakt. Auch Quercetin und Phloretin sind in der Literatur bereits als apoptoseinduzierende Flavonoide *in vitro* beschrieben [Kobori et al, 1999, Shen et al, 2003; Spencer et al, 2003, Nguyen et al, 2004; Wenzel et al, 2004].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Konzentrationsbereichen, in denen bereits nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit dem Apfelsaftextrakt AE02 und Quercetin eine DNA-Fragmentierung (Abbildung 64) und Caspase-3-Aktivierung (Abbildung 63) zu beobachten war, auch gleichzeitig ein Wiederanstieg, sowohl der Proteinmenge an pro-apoptotischer PKC $\delta$  (Abbildung 62) als auch der zellulären Gesamt-PKC-Aktivität, (Abbildung 58A und B) zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Aktivierung der PKC-Aktivität möglicherweise intermediär als Teil des apoptotischen Prozesses auftritt.

Die Modulation proliferationsassoziierter Signalkaskaden durch Apfelpolyphenole und deren Relevanz für die Tumorzellen *in vitro*, kann anhand von charakteristischen Zellzyklusverschiebungen analysiert werden. So sollten die gezeigten Hemmwirkungen der Apfelpolyphenole auf Elemente der MAPK-Kaskade (Kapitel 4.2) und des Wnt-Signalweges (Kapitel 4.3) sowie auf die PKC-Aktivität (Kapitel 4.4) zu einer charakteristischen Anreicherung in der G<sub>1</sub>-Phase führen. Da vor allem Quercetin aufgrund seiner beschriebenen zellulären Wirkungen sowohl in der Lage sein sollte, die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, als auch in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus zu arretieren, wurden HT29-Zellen vor Versuchsstart in ihrer Zellzyklusverteilung entsprechend synchronisiert. Die vorliegende Arbeit zeigte im Einklang mit Literaturdaten [Choi et al, 2001; Wang et al, 2003; Ramos et al, 2005], dass Quercetin *in vitro* humane Tumorzellen sowohl in der G<sub>1</sub>-Phase als auch in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus arretiert (Abbildung 66B, Abbildung 68B, Tabelle 12). Im Gegensatz zur Blockierung der G<sub>1</sub>-Phase (nicht signifikant) ist der gezeigte Arrest von HT29-Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase hoch signifikant. Die Effekte von Quercetin auf die G<sub>1</sub>- und die G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus lassen sich auf die Beeinflussung einer Reihe von Enzymen zurückführen. So hemmt Quercetin Signalelemente der MAPK-Kaskade in ihrer Expression und/oder Aktivität, was zu einer Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase führen kann (Tabelle 12) [Kern et al, 2005]. Des Weiteren wird der G<sub>1</sub>-Arrest durch Quercetin auf die Aktivierung

der CDK-inhibierenden Proteine p21 und p27 bzw. die cdc25-Phosphatase in humanen Tumorzellen zurückgeführt [Casagrande und Darbon, 2001; Aligiannis et al, 2001]. Weiterhin inhibiert Quercetin die Aktivität der CDK2, der PKC und der Phosphoinositol-3-Kinase, was ebenfalls mit einer Blockierung in der G<sub>1</sub>-Phase *in vitro* assoziiert wird [Agullo et al, 1997; Ferriola et al, 1989; Gamet-Payraastre et al, 1999; Casagrande und Darbon, 2001]. Der Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus durch Quercetin wird hingegen mit der Interaktion von Quercetin mit humanen Topoisomerasen sowie mit der Hemmung der Tubulinpolymerisation in Zusammenhang gebracht [Boege et al, 1996; Gupta und Panda, 2002].

Das Dihydrochalkon Phloretin arretiert HT29-Zellen signifikant in der G<sub>1</sub>-Phase und in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus (Abbildung 66C, Abbildung 68C). Der Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus könnte auf der Modulation von Signaltransduktionskaskaden (MAPK-Kaskade und PKC, Tabelle 12) durch Phloretin beruhen. Im Gegensatz dazu wurden bislang keine Wirkmechanismen für die Blockierung in G<sub>2</sub>-Phase durch Phloretin identifiziert. Das für den Apfel charakteristische Phloretinlukosid Phloridzin beeinflusst bis zu einer Konzentration von 500 µM nicht signifikant die Zellzyklusverteilung in HT29-Zellen (Abbildung 66D, Abbildung 68D). Insgesamt betrachtet zeigte Phloridzin nur marginale zelluläre Wirkungen. So konnten nur in isolierten Testsystemen bzw. mit sehr hohen Konzentration (500 µM) geringfügige Effekte auf die untersuchten potentiellen Zielstrukturen erzielt werden (Tabelle 12), was wahrscheinlich auf die schlechte zelluläre Aufnahme von Polyphenolglykosiden zurückzuführen ist [Kahle et al, 2005]. *In vivo* konnte nach Gabe von Phloridzin an Ratten kein intaktes Phloridzin im Plasma nachgewiesen werden, sondern hauptsächlich Metabolite des Phloridzins und freies Phloretin [Crespy et al, 2001]. Dies spricht für eine Hydrolyse von Phloridzin, möglicherweise durch die Lactat-Phloridzin-Hydrolase [Crespy et al, 2001]. Unter Zellkulturbedingungen scheint weder durch chemische Instabilität noch durch einen zellulären Metabolismus freies Phloretin zu entstehen, da sonst dieses zu den zellulären Wirkungen von Phloridzin beitragen müsste. Durch Arbeiten unseres Projektpartners (Arbeitsgruppe Prof. Eisenbrand) wurde bereits gezeigt, dass kein Phloretin bei der 24-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit Phloridzin entsteht [Schäfer et al, 2006].

Die Inkubation von HT29-Zellen mit dem Apfelsaftextrakt AE02 führte zu einer hoch signifikanten Arretierung in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus (Abbildung 68A). Analog zu diesen Ergebnissen konnten Gossé et al. [2005] ebenfalls zeigen, dass ein procyanidinreicher Apfelsaftextrakt hoch signifikant humane Kolonkarzinomzellen (SW620) in der G<sub>2</sub>/M-



Phase arretiert. Der Effekt auf die G<sub>1</sub>-Phase von HT29-Zellen durch die Inkubation mit AE02 erwies sich hingegen als nicht signifikant, obwohl aufgrund der Ergebnisse zur MAPK-Kaskade ein Effekt zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 66A, Tabelle 12). Möglicherweise ist der geringe Effekt auf die G<sub>1</sub>-Phase dadurch zu begründen, dass die arretierten HT29-Zellen (Serumdepletion für 48 h), auch nach Inkubation mit serumhaltigem Medium (36 h) zum großen Teil weiterhin in der G<sub>1</sub>-Phase verweilen. Somit erscheinen Zellzyklus-blockierende Effekte weniger stark im Bezug zur Lösungsmittelkontrolle. Die Ansammlung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase (Abbildung 66A) zeigt die Relevanz der Modulation von Signalkettenelemente für die Wachstumshemmung *in vitro*. Jedoch legen die stärkeren Effekte auf die G<sub>2</sub>/M-Phase durch Inkubation mit AE02 (Abbildung 68A) nahe, dass weitere, noch unbekannte zelluläre Zielstrukturen im Wesentlichen durch Apfelpolyphenole beeinflusst werden.

Insgesamt könnten die Ergebnisse zur Beeinflussung des Wachstums humaner Kolonkarzinomzellen und die Modulation von Elementen proliferationsassoziiierter Signalskaskaden *in vitro* darauf hindeuten, dass Apfelpolyphenole möglicherweise auch *in vivo*, vor allem im Gastrointestinaltrakt, wo auch lokal höhere Polyphenolkonzentrationen erreicht werden können, die Kolonkanzerogenese beeinflussen.

*In vivo* wurde bereits gezeigt, dass trüber Apfelsaft die Anzahl der durch Dimethylhydrazin (DMH)-induzierten aberranten Krypten in Ratten verringert, wohingegen sich der entsprechende klare Apfelsaft als unwirksam erwies [Barth et al, 2005]. Ein Rückgang von aberranten Krypten war durch die Trubstoffe alleine ebenfalls nicht zu erklären, weshalb vermutlich der Effekt auf die Apfelpolyphenole zurückzuführen ist. Nach oraler Gabe eines Traubenkernextraktes an Ratten wurde gezeigt, dass höher oligomere Procyanidine an Speichelproteine binden und somit niedere oligomere Procyanidine den Gastrointestinaltrakt erreichen [Sarni-Manchado et al, 1999]. Dies könnte darauf hindeuten, dass oligomere Apfelprocyanidine in trüben Apfelsäften an die Trubstoffe binden und so ins Kolon gelangen, wo die oligomeren Procyanidine nach Freisetzung ihr chemopräventives Potential entfalten könnten. So konnte bereits gezeigt werden, dass Apfelprocyanidine die Anzahl von hyperproliferierenden und aberranten Krypten im Kolon von Ratten, in einem mit Azoxymethan (AOM)-induzierten Tumormodell, um 50 % reduzieren [Gossé et al, 2005]. Nomoto et al. [2004] erzielten mit procyanidinreichem Traubenkernextrakt ebenfalls eine Reduktion von AOM-induzierten, hyperproliferierenden Krypten in Ratten. Interessanterweise ist die im angesprochenen Versuch verwendete Dosierung des Procyanidins

B2 im Traubenkernextrakt (2 mg/kg KG), die zu einer signifikanten Reduktion der AOM-induzierten Hyperproliferation im Kolonepithel führte, vergleichbar mit der Procyanidinaufnahme der DMH-induzierten Ratten durch den trüben Apfelsaft [Fähndrich, 2005].

Es wurden auch schon, 2 h nach Aufnahme, niedrige Konzentrationen an Apfelprocyanidindimeren und -trimeren im Serum von Ratten detektiert [Shoji et al, 2006]. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass polymere Procyanidine positiv die Resorption von oligomeren Procyanidine beeinflussen, obwohl polymere Procyanidine selbst nicht resorbiert werden [Shoji et al, 2006].

Somit weisen sowohl *in vitro*- [Gossé et al, 2005; Kern et al, 2005; Veeriah et al, 2006] als auch die *in vivo*-Untersuchungen [Bath et al, 2005; Gossé et al, 2005] darauf hin, dass Apfelpolyphenole wahrscheinlich einen wesentlichen Beitrag zur chemopräventiven Wirkung von Apfelsaft/-Extrakt, besonders im Hinblick auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms leisten.

Bislang ist wenig über mögliche proliferationsfördernde und damit unerwünschte Effekte von Apfelpolyphenolen bekannt, die ihre Anwendung in der Chemoprävention limitieren würden. Solche „unerwünschten“ wachstumsfördernden Stimuli könnten beispielsweise durch Interaktionen mit Elementen des Wnt-Signalweges (Abbildung 10), der eine wichtige Rolle in der Kolonkanzerogenese spielt, ausgelöst werden. Ein zentraler Regulator der  $\beta$ -Catenin-Homöostase ist die Glykogensynthasekinase-3. Der Apfelsaftextrakt AE02 erwies sich als potenter Inhibitor der aus HT29-Zellen immunopräzipitierten GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 51). Die Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit AE02 führte ebenfalls zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion der zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 53A). Von den untersuchten Einzelsubstanzen erwies sich das apfelcharakteristische Dihydrochalkonglukosid Phloridzin als inaktiv bis 500  $\mu$ M. Die Aglyka Phloretin und Quercetin, die sich als potente Hemmstoffe der isolierten GSK3 $\beta$ -Aktivität (Abbildung 52) herausstellten, modulieren nicht bzw. nur marginal die Aktivität der zellulären GSK3 $\beta$  (Abbildung 53B). Im Einklang mit der Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität führte die Inkubation von HT29-Zellen zu einer Reduktion an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin (Abbildung 54). Jedoch zeigte sich auch eine Abnahme des Gesamtproteingehaltes von  $\beta$ -Catenin (Abbildung 54), was verdeutlicht, dass die Hemmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität durch Apfelinhaltsstoffe nicht assoziiert ist mit einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in HT29-Zellen. In einem entsprechenden Reportergensystem führte die Inkubation von transfizierten Hek293-Zellen mit Apfelpolyphenolen zu keinem Anschalten der

Tcf/Lef-vermittelten Gentranskription [Kern et al, *J. Agric Food Chem.*, eingereicht]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben, dass Apfelpolyphenole in Konzentrationen, wie sie im AE02 zugrunde liegendem Apfelsaft (AS02, 500 mg/l) vorliegen, keinen Proliferationsstimulus über den Wnt-Signalweg in HT29-Zellen setzen, sondern hinsichtlich der Abnahme des Proteingehaltes an Gesamt- $\beta$ -Catenin eher antiproliferativ wirken.

Im Vergleich der zellulären Wirkungen von Apfelpolyphenolen *in vitro* ist vor allem die herausragende Hemmwirkung auf den EGFR und seine nachgeschaltete Kinasekaskade hervorzuheben (Kapitel 4.2, Tabelle 12). Die Wirkqualität des polyphenolreichen Apfelsaftextraktes AE02 auf die MAPK/ERK-Kaskade spiegelt sich in um Größenordnungen (bis 1000 x) niedrigeren Konzentrationsbereichen im Vergleich zu den anderen untersuchten potentiellen Zielstrukturen (z. B. PKC und GSK3 $\beta$ ) wider. Die Wirkqualitäten des AE02 lassen sich wie folgt zusammenfassen.

EGFR  $\approx$  MAPK-Kaskade  $\gg$  PKC  $\approx$  Wnt-Signalweg  $\approx$  Apoptose

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass polyphenolreiche Apfelsaftextrakte in der Lage sind, *in vitro* das Wachstum von Kolontumorzellen nachhaltig zu beeinflussen und effektiv in Signalwege einzugreifen, die eine wesentliche Rolle in der Regulation des Zellwachstums und der Tumorentstehung spielen. Dabei liegt die Hemmwirkung des polyphenolreichen Extraktes AE02 in/unter den Polyphenolkonzentrationen des Originalsaftes AS02 (500  $\mu$ g/ml) [Kern et al, 2005; Schäfer et al, 2006]. Es wurden eine Reihe potentieller zellulärer Zielstrukturen von Apfelpolyphenolen, wie beispielsweise PKC oder der Wnt-Signalweg, identifiziert. Jedoch zeigte sich die stärkste Hemmwirkung auf den EGFR und Elemente der nachgeschalteten MAPK-Kaskade. Jedoch scheinen hierbei bislang nicht identifizierte Apfelinhaltsstoffe eine maßgebliche Rolle zu spielen. Auch postulierte Abbauprodukte von Flavonoiden/Polyphenolen scheinen keinen oder nur einen marginalen Beitrag zur potenten Hemmwirkung des AE02 auf die MAPK/ERK-Kaskade zu leisten. Mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierung konnten oligomere Procyanidine als eine Substanzklasse identifiziert werden, die möglicherweise zum EGFR-hemmenden Potential des Apfelsaftextraktes beiträgt.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Apfelpolyphenole in Konzentrationen, wie sie in polyphenolreichen Säften, wie z. B. dem AS02, vorliegen zur möglichen chemopräventiven Wirkung von Apfelsaft, besonders im Hinblick auf die Entstehung von Karzinomen des Kolons beitragen können.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Aufklärung zellulärer Wirkmechanismen von Apfelpolyphenolen und deren möglicher Relevanz im Hinblick auf die Chemoprävention, insbesondere des kolorektalen Karzinoms.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass polyphenolreiche Apfelextrakte *in vitro* das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 hemmen, wobei die Induktion von Apoptose eine Rolle zu spielen scheint. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass polyphenolreiche Apfelsaftextrakte modulierend in Signalübertragungswege eingreifen, die wesentlich sind für die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. In erster Linie zeichnen sich dabei Effekte auf wachstumsfaktorvermittelte Signalwege ab. Als herausragende Wirkqualität des polyphenolreichen Apfelsaftextraktes AE02 bzw. des Apfeltresterextraktes AE03B ist ihre hocheffektive Hemmung der Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) zu nennen. Anhand von Untersuchungen zur Modulation des Phosphorylierungsstatus (als ein Maß für die Aktivität des EGFR) konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkung des AE02 nicht limitiert ist auf den isolierten EGFR, sondern auch in intakten Zellen zum Tragen kommt. Des Weiteren bewirkte die Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit dem polyphenolreichen Apfelsaftextrakt AE02 eine deutliche Verminderung des Phosphorylierungsstatus der extrazellulär regulierten Kinasen ERK1 und ERK2, Elementen der nachgeschalteten MAPK-Kaskade. Insgesamt zeigte sich allerdings, dass die bislang in Apfelextrakten identifizierten Inhaltsstoffe alleine bzw. in der Summe (rekonstituierte Mischung A und B) nur marginal sowohl zur Wachstumshemmung als auch zur Hemmung des EGFR beitragen. Oligomere Procyanidine dagegen erwiesen sich als hoch potente Hemmstoffe der PTK-Aktivität des isolierten EGFR. Aufgrund der limitierten Datenlage zur zellulären Aufnahme, zur Bioverfügbarkeit und fehlender Angaben zum Gehalt der einzelnen Procyanidine in den untersuchten Apfelextrakten ist es noch nicht möglich, den Beitrag der Procyanidine an den EGFR- und wachstumshemmenden Eigenschaften der Apfelsaftextrakte abzuschätzen.

Die PKC-Isoenzymfamilie spielt ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Apfelpolyphenole die PKC-Aktivität im Kolon beeinflussen. Dafür wurden humane Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu primären humanen Enterozyten (Biopsie) untersucht. Die Ergebnis-

se zeigen, dass sowohl die PKC-Aktivität nicht transformierter humaner Enterozyten als auch humaner Kolonkarzinomzellen durch Apfelpolyphenole gehemmt wird. Der Apfelsaftextrakt AE02 konnte als Hemmstoff der isolierten zytosolischen PKC-Aktivität von HT29-Zellen charakterisiert werden. Eine 24-stündige serumfreie Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 führt zu einer Hemmung der zytosolischen PKC-Aktivität; sogar in geringeren Konzentrationen im Vergleich zur Hemmwirkung an isolierten PKC. Dies könnte auf einer Hemmung PKC-vorgeschalteter Signalelemente beruhen, die so den hemmenden Effekt von AE02 auf die PKC-Aktivität verstärken könnten. Jedoch zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen ein U-förmiger Kurvenverlauf mit einem Anstieg der PKC-Aktivität in hohen Konzentrationen. Nachdem keine PKC-Aktivierung bei Zugabe von Apfelpolyphenolen zu isolierten Enzympräparationen zu beobachten war, kann eine direkte substanzvermittelte Aktivierung ausgeschlossen werden. Die Caspase-3-Aktivierung und die DNA-Fragmentierung, als Merkmale apoptotischer Prozesse; sowie der gezeigte Wiederanstieg des Gesamtproteingehaltes an proapoptotischer PKC $\delta$  nach 24-stündiger Zellinkubation mit AE02 deuten darauf hin, dass die PKC-Aktivierung intermediär als Teil des apoptotischen Prozesses auftritt.

Untersuchungen zu möglichen proliferationsfördernden Effekten von Apfelpolyphenolen, die deren Anwendung in der Chemoprävention limitieren würden, sind bislang nicht beschrieben. Solche zellwachstumsfördernden Stimuli könnten z. B. auf der Modulation von Elementen des Wnt-Signalweges, der eine zentrale Rolle in der Kolonkanzerogenese spielt, beruhen. Es konnte gezeigt werden, dass polyphenolreicher Apfelsaftextrakt potent die isolierte, aus humanen Kolonkarzinomzellen immunopräzipitierte, GSK3 $\beta$ -Aktivität hemmt. Auch in intakten Zellen führt die Inkubation (24 h) von HT29-Zellen mit Apfelpolyphenolen zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Hemmung der zellulären GSK3 $\beta$ -Aktivität. Damit einher geht die signifikante Abnahme an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin. Gleichzeitig nimmt unerwarteterweise der Gehalt an Gesamt- $\beta$ -Catenin ebenfalls ab. Die Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 in humanen Kolonkarzinomzellen keinen Wachstumsstimulus über den Wnt-Signalweg induziert und aufgrund der Reduktion der Expression von  $\beta$ -Catenin eher antiproliferative Effekte des AE02 zu erwarten sind.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Modulation von Elementen proliferationsassoziierter Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole zum Teil zu den wachstumshemmenden Eigenschaften des Extraktes AE02 auf die Kolonkarzinomzelllinie HT29 *in vitro* beitragen. Die Wirkqualität von Apfelpolyphen-

nolen auf die untersuchten zellulären Zielstrukturen kann wir folgt zusammengefasst werden:

$$\text{EGFR} \approx \text{MAPK-Kaskade} \gg \text{PKC} \approx \text{Wnt-Signalweg} \approx \text{Apoptose}$$

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit waren wirkmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch potentielle chemische und mikrobielle Abbauprodukte von Polyphenolen, da ein extensiver Abbau von Apfelpolyphenolen auch in den verwendeten *in vitro*-Testsystemen nicht auszuschließen ist. Neben der Frage nach der biologischen Wirksamkeit der Abbauprodukte stellte sich die Frage, inwieweit die beschriebenen biologischen Wirkungen der Flavonoide auf die Ursprungssubstanzen selbst zurückzuführen sind bzw. welchen Anteil die korrespondierenden Abbauprodukte dazu beitragen. Von den Phenolcarbonsäuren, die als Abbauprodukten der Anthocyanidine postuliert werden, erwies sich die Gallussäure als potenter Inhibitor des Wachstums von HT29-Zellen *in vitro*. Dieser wachstumshemmende Effekt der Gallussäure war vergleichbar mit dem des Delphinidins [Marko et al, 2004], so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beim Abbau entstehende Gallussäure zur Wachstumshemmung der Ursprungssubstanz beiträgt. Der postulierte Abbau von Quercetin führt zu den Hauptverbindungen Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucinol, die ebenfalls das Wachstum von HT29-Zellen hemmen. Diese Abbauprodukte könnten beispielsweise durch Deglykosylierung der Quercetinglykoside aus polyphenolreichen Apfelextrakten generiert werden und somit möglicherweise zur Hemmwirkung von Apfelextrakten auf das Wachstum von humanen Kolonkarzinomzellen beitragen. Gallussäure, Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucinol bewirken jedoch keine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR. Sie erwiesen sich somit als ineffektiv im Gegensatz zu den bereits beschriebenen EGFR-Hemmstoffen Delphinidin und Quercetin [Marko et al, 2004; Kern et al, 2005]. Deswegen müssen zur Aufklärung des Wirkmechanismus postulierter Flavonoidabbauprodukte, der zu einer Reduktion des Wachstums von humanen Kolonkarzinomzellen *in vitro* führt, noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Abschließend ist festzustellen, dass Apfelpolyphenole in/unterhalb der Polyphenolkonzentration von polyphenolreichen Apfelsäften (z. B. 500 mg/l im Projektsaft AS02), *in vitro* in Signaltransduktionskaskaden eingreifen, die mit der Entstehung kolorektaler Karzinome assoziiert werden.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Apfelsaftextrakte

#### 6.1.1 Apfelsaftextrakt AE01

Der Apfelsaftextrakt AE01 wurde aus einem sortenreinen klaren Apfelsaft (Boskop), der Ernte 2001, nach der in Kapitel 6.1.2 beschriebenen Methode gewonnen. Die Charakterisierung erfolgte nach der von Will et al, 2000 beschriebenen Methode.

#### 6.1.2 Apfelsaftextrakt AE02

Der klare Apfelsaft AS02 wurde aus 20 % Tafeläpfeln und einem Gemisch aus Mostapfelsorten (25 % Topaz, 17,5 % Bohnapfel, 22,5 % Winterrambour und 15 % Bittenfelder) hergestellt. 100 l des klaren Projektsafts wurden auf eine mit 5 l Adsorberharz (XAD 16 HP, Rohm & Haas, Frankfurt, Deutschland) gefüllte Pharmacia Glassäule (BPG 100, 100x10 cm) gegeben. Die wasserlöslichen Bestandteile (Zucker, organische Säuren und Mineralien) wurden durch Spülung mit destilliertem Wasser entfernt und die Polyphenole mit 96 %igem Ethanol eluiert. Der ethanolische Extrakt wurde eingeeengt, die Polyphenole in die wässrige Phase überführt und gefriergetrocknet. Der resultierende polyphenolreiche Apfelsaftextrakt (AE02) wurde kühl und dunkel gelagert. Die Charakterisierung der polyphenolischen Inhaltsstoffe des AE02 erfolgte mittels HPLC/Diodenarraydetektor (DAD) (Einwaage, 1 g/l in 20 % Methanol; Säule Phenomenex Aqua (250/4 mm), Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland; Acetonitril/Phosphorsäuregradient; Detektionswellenlänge:  $\lambda = 280$  nm für Flavonoide,  $\lambda = 320$  nm für Phenolcarbonsäuren und  $\lambda = 360$  nm für Quercetinderivate) [Will et al, 2000; Schieber et al, 2001; Kern et al, 2005; Schäfer et al, 2005]. Die Methode zur Analytik der Apfelpolyphenole wurde im Jahre 2004 zugunsten von kürzeren Analysezeiten, einem umweltfreundlicheren Arbeiten und einer LC-MS-Kompatibilität, verifiziert. Die Apfelpolyphenole wurden von nun an mit einem ThermoFinnigan HPLC/DAD-System (Dreieich, Deutschland; Trennsäule, 3  $\mu$ m RP-Reprosil-Pur

C18-AQ der Firma Maisch, Ammerbruch; Acetonitril/Wasser/Essigsäuregradient) getrennt.

### **6.1.3 Tresterextrakt AE03B**

Durch die enzymatische Aufarbeitung des Pressrückstandes (Trester) mit Pektinasen und Zellulasen werden Zellmembrane aufgebrochen und es kann ein so genannter B-Saft mit einem signifikant erhöhten Anteil an Quercetinderivaten und Dihydrochalkonen gewonnen werden. Der Trester wurde aus Tafelapfelsorten (Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold) der Ernte 2003 hergestellt. Zur Extraktherstellung wurde der Apfeltrester im Verhältnis 1:1 (v/v) mit heißem entmineralisiertem Wasser (90 °C) sowie mit jeweils 300 ppm des Pektinasepräparates Rohapect MA-1 und der Zellulasepräparate Rohapect AF2 und Rohament CL (alle AB Enzyms, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Die enzymatische Aufarbeitung erfolgte für 2 h bei 50 °C im Maischetank unter kontinuierlichem Rühren. Nach der Entsaftung des Tresters wurde der gewonnene B-Saft (550 l) auf eine mit 55 l Adsorberharz (P-495, Bucher-Alimentech, Neuseeland) gefüllte Säule (Edelstahl) gegeben. Die wasserlöslichen Komponenten wurden entfernt, die Polyphenole mit Ethanol eluiert und gefriergetrocknet. Die Polyphenole des entstandenen Extraktes AE03B (Einwaage 1 g/l in 10 % Methanol) wurden nach der unter Kapitel 6.1.2 beschriebenen Methode charakterisiert.

### **6.1.4 Apfelsaftextrakt AE04**

Der Apfelsaftextrakt AE04 wurde aus 250 l des Klarsaftes AE02, 50 l Tresterextraktions-saft und je ca. 200 l verschiedener naturtrüber Mostapfelsäfte (aus den Apfelsorten Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambour) hergestellt. Die Extraktherstellung und Polyphenol-analytik erfolgte nach der unter Kapitel 6.1.2 beschriebenen Methode.



**Tabelle 15:** Polyphenolzusammensetzung der Apfelextrakte (Einwaage von 1g Extrakt/11 H<sub>2</sub>O) [Schäfer et al, 2005, Kern et al, 2005]. Die in Klammer gesetzten Zahlen bedeuten die gefundenen Polyphenolgehalte mit veränderter Analytik (Kapitel 6.1.2). n. n.: nicht nachweisbar; kursiv: in dieser Arbeit verwendete Apfelinhaltsstoffe.

Polyphenole	AE01 [mg]	AE02 [mg]	AE03B [mg]	AE04 [mg]
<i>Procyanidin B1</i>	2,9	7 (n. n.)	6,2 (0,9)	n. n. (3,1)
<i>Procyanidin B2</i>	16,0	15,1 (15,1)	18,4 (16,4)	12,1 (5,1)
<i>(-)-Epicatechin</i>	11,8	19,2 (25,3)	17,7 (15,2)	12,5 (15,7)
<i>Catechin</i>	n. n.	n. n. (4,8)	2,7 (2,9)	n. n. (1,8)
Phloretinxyloglukosid	42,7	66,2 (155,8)	31,7 (68,8)	4,2 (136,3)
Phloretinxyloglykosid 1	n. n.	24,7 (n. n.)	n. n. (n. n.)	n. n.
Phloretinxyloglykosid 2	n. n.	9 (n. n.)	n. n. (n. n.)	n. n.
<i>Phloridzin</i>	34,7	27,9 (35)	78,9 (64)	48(52,8)
<i>Chlorogensäure</i>	171,8	181,5 (240,8)	19,2 (20,6)	183,2 (245,9)
Kryptochlorogensäure	n. n.	(9,2)	n. n. (n. n.)	3,3 (13,9)
3-Cumaroylchinasäure	16,0	9,5 (9,2)	3,0 (n. n.)	9,4 (8,8)
4-Cumaroylchinasäure	72,4	77,3 (61,0)	5,0 (3,5)	66 (63,8)
5-Cumaroylchinasäure	7,0	10,4 (n. n.)	3,8 (n. n.)	39,8 (n. n.)
<i>Kaffeesäure</i>	102,7	9,5 (11,9)	4,0 (3,9)	7,5 (3,1)
p-Cumarsäure	n. n.	n. n. (2,9)	4,2 (4,3)	2,6 (3,3)
Quercetin-3-xylosid	n. n.	n. n. (n. n.)	18,1 (12,3)	n. n. (2,1)
Quercetin-3-arabinosid	n. n.	n. n. (n. n.)	3,5 (12,2)	n. n. (n. n.)
<i>Quercetin-3-rhamnosid</i>	3,2	4,1 (n. n.)	25,1 (19,1)	4,3 (4,9)
<i>Quercetin-3-galaktosid</i>	0,9	0,8 (1,7)	8,1 (26,8)	1,8 (3,8)
<i>Quercetin-3-glukosid</i>	1,4	1,4 (n. n.)	12,3 (8,5)	1,5 (2,7)
<i>Quercetin-3-rutinosid</i>	1,8	2,6 (3,6)	49,1 (4,7)	4,5 (n. n.)
Summe (HPLC)	485,3	466,2 (576,4)	310,9 (284)	478,3 (567)

## **6.1.5 Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE02 und des Tresterextraktes AE03B**

### **6.1.5.1 Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE02**

Der Apfelsaftextrakt AE02 wurde mittels Gegenstromverteilungschromatographie (CPC) in die Hauptfraktionen C16.1 bis C16.7 (C: CPC; Zahl: fortlaufend nach Fraktionierungsversuch) getrennt (Abbildung 41). In den Fraktionen nimmt die Polarität mit steigender Zahl (C16.1 - C16.7) ab. Zur weiteren Auftrennung, der immer noch sehr komplex zusammengesetzten Fraktionen, wurden die Hauptfraktionen mittels Größenausschlusschromatographie an einer Sephadex LH20 Säulen weiter aufgereinigt (S10.1 - S19.6; S: Sephadex; Abbildung 41). Alle Trennschritte wurden durch eine HPLC-Trennmethode (Fließmittel: Aqua dest. + 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) / Acetonitril + 0.1 % TFA-Gradient; Säule: Phenomenex Aqua C18, 5  $\mu$ , 250 x 4.6 mm) überprüft und dokumentiert [Zeßner, persönliche Mitteilung].

### **6.1.5.2 Fraktionierung des Tresterextraktes AE03B**

Der in Methanol gelöste Tresterextrakt AE03B wurde einer Sephadex LH 20-Gelchromatographie unterzogen. Als Elutionsmittel diente Methanol. Die nicht löslichen Bestandteile wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Der Trennverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Mit dem Naturstoffreagenz A (Gemisch aus Diphenylborsäureaminoethylester und Polyethylenglykol (PEG) 400) konnten unter UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm) die getrennten phenolischen Säuren, Dihydrochalkone und Quercetinglykoside sichtbar gemacht werden. Der Extrakt wurde in sieben Grundfraktionen S20.1 – S20.7 eingeteilt (Abbildung 42) [Zeßner, persönliche Mitteilung]. Die Fraktionen wurden mittels HPLC der Marke Water-Separation Module 2690 „Alliance“ mit Photodiodearraydetektor (Waters, Milford, USA; Phenomenex Aqua-Säule C18, 5  $\mu$ M, 250 x 4,6 mm; Fließmittel: Gradient aus destilliertem Wasser + 0,1 % TCA und Acetonitril + 0,1 % TCA) charakterisiert.

Die Fraktionen S20.3 - S20.6 konnten mittels CPC in die entsprechenden Subfraktionen getrennt werden (Abbildung 42). Als Trennsystem diente ein Gemisch aus Ethylace-

tat/Ethanol/Wasser (2/1/2). Die Trennung wurde ebenfalls dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Die Fraktion S20.7 wurde im präparativen Maßstab nach der Methode von Shibusawa et al, 2001 mittels CPC mit dem Lösungsmittelgemisch Methylacetat und Wasser im Verhältnis 1:1 getrennt (Abbildung 42). Für die Detektion der dünnschichtchromatographischen Trennung wurde eine Sprühreagenz aus Dichlorchinon-4-chlorimid und Natriumcarbonatlösung [Zeßner, persönliche Mitteilung]

## 6.2 Zelllinien

### 6.2.1 HT29-Zelllinie

Die Zelllinie HT29 wurde 1964 aus einem primären Adenokarzinom des Kolons einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau etabliert. Dieser Tumor wird als heterotransplantabel beschrieben und bildet gut differenzierte Tumore ersten Grades aus. HT29-Zellen besitzen einen hypertriploiden Karyotyp mit 17,5 % Polyploidie. Die Verdopplungszeit beträgt 40 – 60 h [von Kleist et al, 1975].

Als Kulturmedium wird für die HT29-Zellen „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, ohne Natriumpyruvat, Invitrogen) mit 10 % fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS, 10000 Einheiten / 10000 µg pro ml) verwendet.

### 6.2.2 A431-Zelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein Epidermoidkarzinom der Vulva. Es wurde einer 85-jährigen Frau entnommen und als Monolayer in Kulturflaschen kultiviert. Die fibroblasten-ähnlichen Zellen zeigen auch noch nach langer Kultivierung ihre maligne Charakteristik. Der Karyotyp dieser Zelllinie ist hypertriploid (Chromosomenzahl 74) [Giard et al, 1973].

Die A431 Zelllinie wird in „Minimum Essential Medium“ (MEM, Sigma) nach Zugabe von 4,5 g/l L-Glutamin sowie 10 % FKS und 1 % PS kultiviert.

Die verwendeten Zelllinien werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert

## 6.3 Kultivierung von Monolayerkulturen

### 6.3.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen

Aufgrund einer Anreicherung von Abfallprodukten im Medium sowie einer Abnahme der zugesetzten Nährstoffe, kommt es durch einen Anstieg des pH-Wertes, etwa alle drei bis vier Tage zum Farbumschlag des Indikators Phenolrot von rot nach gelb. Befinden sich die Zellen in einer subkonfluenten Wachstumsphase, so wird das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Menge beträgt je nach Kulturflaschengröße 40 ml (175 cm<sup>2</sup>) bzw. 20 ml (80 cm<sup>2</sup>). [Lindl, 2000]

### 6.3.2 Passagieren von Monolayerkulturen

Viele Zelllinien von Tumor- oder transformierten Zellen wachsen auch nach vollständiger Einnahme des Kulturflaschenbodens als „Second-“ bzw. Poly-layer weiter. Allerdings sinkt bei zu hoher Zelldichte die Proliferationsrate der Zellen. Nach dem Erreichen der Maximaldichte löst sich der komplette Zellrasen vom Flaschenboden oder die Zellen sterben durch die überhöhte Dichte ab. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Zellen zu passagieren, das heißt, sie werden verdünnt weiterkultiviert. Das verbrauchte Medium wird abgezogen. Zur vollständigen Entfernung von Mediumresten, welche die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen würden, werden die Zellen mit einer auf 37 °C erwärmten phosphatgepufferten Lösung (PBS) gespült. Der Zellrasen wird mit Trypsin-Lösung (etwa 2,5 ml für eine Kulturflasche der Größe von 175 cm<sup>2</sup>) überschichtet und bei 37 °C (2-3 min für HT29, 10-12 min bei A431) inkubiert. Ein zu langes Einwirken der Trypsin-Lösung kann zur irreversiblen Schädigung der Zellen führen. Die abgelösten Zellen werden in 10 ml serumhaltigen Medium zum Abstoppen der Trypsinreaktion resuspendiert. Einige Tropfen der Zellsuspension werden in der Kulturflasche belassen und mit 40 ml (bei einer Flaschengröße von 175 cm<sup>2</sup>) angewärmtes Medium versetzt und unter den in Kapitel 6.3 beschriebenen Bedingungen weiter kultiviert. Nach zwei Passagen sollten die Zelllinien in neue Kulturflaschen überführt werden. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass Zelllinien mit steigender Kultivierungszeit ihre physiologischen Eigenschaften verändern. Deswegen sollten Zelli-

nien nach gewisser Zeit verworfen und neue Zellaliquots in Kultur genommen werden. [Lindl, 2000]

### 10x PBS („Phosphate buffered saline“):

NaCl	1,71	M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100	mM
KCl	34	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18	mM

pH 7,4 einstellen, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auffüllen, und auf 1x PBS verdünnte Lösungen autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

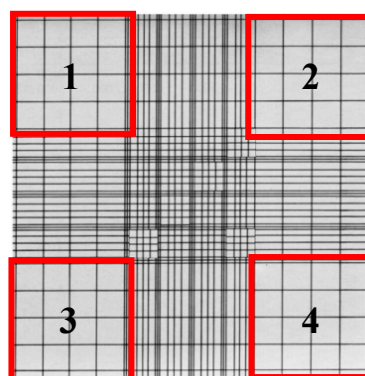
### Trypsin-Lösung:

Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/mg)	500	mg
EDTA	250	mg
10x PBS	100	ml

Über Nacht auf Eis rühren lassen, pH-Wert überprüfen (7-7,4), mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1 l auffüllen, steril filtrieren und aliquotieren (5 ml), Lagerung bei 4 °C

## 6.3.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wird eine Neubauer Zählkammer verwendet. Die Neubauer Zählkammer besteht aus 9 Quadraten. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0,1 mm, weshalb ein Volumen von 0,1 µl entsteht. Nach Resuspension der passagierten Zellen werden 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Trypan-Blau versetzt und lichtmikroskopisch mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Abbildung 72) ausgezählt. Dabei werden die vier Eckquadrate ausgezählt.



**Abbildung 72:** Darstellung der Neubauer Zählkammer [modifiziert nach Lindl, 2000]. In den vier mal vier Eckquadraten (rot umrahmt) werden die lebenden Zellen gezählt und die Zellzahl pro ml bestimmt.

Lebende Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, den Farbstoff Trypan-Blau aktiv aus der Zelle zu befördern und erscheinen deswegen unter dem Mikroskop weiß. Tote Zellen sind dazu nicht mehr fähig, sie weisen eine blaue Farbe auf. Beim Auszählen werden nur die lebenden Zellen berücksichtigt. Es wird der Mittelwert aus den Zellen in den vier Eckquadraten gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor 5 sowie mit 10000 multipliziert. Daraus ergibt sich die Zellzahl pro ml [Lindl, 2000]

#### **6.3.4 Anlegen und Lagerung von Zellstocks**

Nach dem „Abtrypsinieren“ der Zellen (Kapitel 6.3.2) werden diese in 10 ml neuem Kulturmedium aufgenommen. Die zum Lagern bestimmten Aliquots bestehen aus 1 ml Zellsuspension und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO). Das DMSO dient hierbei als Frostschutzmittel. Die „Zellstocks“ werden bei -80 °C zuerst in einer mit Luftpolsterfolie umwickelten Styroporbox schonend eingefroren und nach 24 h in die Lagerungsbox umgesetzt.

#### **6.3.5 In Kultur nehmen von Zellen**

Die bei -80 °C gelagerten Zellen werden so schnell wie möglich bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml serumhaltigen Medium (Endkonzentration 20 % FKS) versetzt. Dadurch wird die toxische DMSO-Konzentration von 10 % auf 1 % verringert. Die Zellsuspension wird für 5 min bei ~130 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt, um so das Frostschutzmittel DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wird in Kulturmedium (20 % FKS) aufgenommen in eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt und bei den unter Kapitel 6.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

#### **6.3.6 Überprüfung auf Mykoplasmenkontamination**

Unter Mykoplasmen versteht man die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten, welche die Sterilfilter ungehindert passieren können. Durch Anwesenheit von Mykoplasmen wird der Stoffwechsel der kultivierten Zelllinien gestört. Aus diesem Grund ist eine

regelmäßige Kontrolle der Zellen auf eine Kontamination durch Mykoplasmen sehr wichtig [Alberts et al, 2003].

Die „passagierten“ Zellen (Kapitel 6.3.2) werden mit geringer Dichte auf einem sterilen Objektträger, welcher sich in einer Gewebekulturschale (d = 9,2 cm) mit 10 ml Medium befindet, ausgestreut. Nach 24 h Inkubationszeit werden die Zellen durch Abspülen mit eiskaltem Methanol von Mediumresten befreit und für mindestens 15 min in eiskaltem Methanol (-20 °C) fixiert. Um die Zellen auf mögliche Mykoplasmenkontamination zu untersuchen, werden die mit Methanol auf dem Objektträger fixierten Zellen kurz getrocknet, mit DAPI/SR101-Lösung betropft und vorsichtig ein mit einem Deckglas abgedeckt. Die Überprüfung auf Mykoplasmen findet mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Anregungswellenlänge  $\lambda = 450 - 490$  nm) statt. Im Bild erscheinen die Zellkerne und die DNA blau. Das Zytosol ist dagegen rot gefärbt. Die Mykoplasmen erscheinen als blaue Punkte in Kernnähe oder im Zytoplasma [Lindl, 2000]. Alle in dieser Dissertation beschriebenen Versuche wurden mit mykoplasmenfreien Zellen durchgeführt.



## 6.4 Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford

### Benötigte Reagenzien: Bradfordreagenz, BSA-Standardlösung

Die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie<sup>®</sup>-Brillantblau G250. Der saure Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum von  $\lambda = 465$  nm, das sich in Gegenwart von Aminosäuren/Proteinen zu  $\lambda = 595$  nm verschiebt. Die Verschiebung wird durch Komplexbildung zwischen dem anionischen Farbstoff und den kationischen bzw. unpolaren Seitenketten der Aminosäuren ausgelöst [Bradford, 1976].

Die Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1,5 mg/ml wird mit Hilfe einer BSA-Standardlösung (2 mg/ml, Pierce) angesetzt. Der Proteingehalt der Proben wird mit linearer Regression über die Eichgerade nach Abzug des Nullwertes (10  $\mu$ l Wasser in 1 ml Bradfordreagenz) bestimmt.

- Die Proben werden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  verdünnt
- Als Kontrollen werden ebenfalls mitgeführt
  - der zur Aufarbeitung verwendete Puffer in entsprechender Verdünnung
  - der Nullwert ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ )
- Sowohl von der Eichreihe sowie den Kontrollen und Proben werden je 10  $\mu$ l in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt.
- Von jeder Lösung werden drei Löcher einer 96-Lochplatte mit je 200  $\mu$ l bestückt.
- Die Mikrotiterplatte wird bei  $\lambda = 595$  nm photometrisch vermessen.

**Tabelle 16:** Pipettierschema der BSA-Standardreihe.

Endkonzentration [mg/ml]	BSA-Standardlösung [ $\mu$ l]	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ [ $\mu$ l]
0,1	10	190
0,2	20	180
0,4	40	160
0,5	50	150
0,6	60	140
0,8	80	120
1	100	100
1,5	150	50

<b>Bradfordreagenz:</b>	100 mg	Coomassie <sup>®</sup> -Brillantblau G250
	50 ml	Ethanol
	100 ml	Phosphorsäure (85%) mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, 4 Wochen stehen lassen und filtrieren, im Dunkeln bei RT lagern

## 6.5 Untersuchungen zur Wachstumshemmung (Sulforhodamin B Test)

**Benötigte Reagenzien:** Trichloressigsäure (TCA)-Lösung, 1 %ige Essigsäurelösung, Sulforhodamin B-Lösung, Tris-Base

Mit Hilfe des Sulforhodamin B (SRB)-Tests lassen sich zellwachstumshemmende Wirkungen von Testsubstanzen bestimmen. Dies erfolgt durch das Anfärben des Lebendproteins mit SRB-Reagenz. Unter mild sauren Bedingungen bindet das SRB an basische Aminosäuren der Zellproteine. Der Farbstoff kann unter basischen Bedingungen (pH ~ 10) wieder aus den Zellproteinen herausgelöst und photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen werden [Skehan et al, 1990].

- Aussäen von 4500 HT29-Zellen pro Well einer 24-Lochplatte und Anwachsen lassen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>
- Die HT29-Zellen werden für 72 h mit den Testsubstanzen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert; Kontrolle, 1 % DMSO
- Abstoppen der Substanzreaktion mit 100 µl 50 %iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
- Zellen mindestens 1 h bei 4 °C belassen; dadurch werden die zum Zeitpunkt des Abstoppens noch lebenden Zellen am Plattenboden fixiert
- Vorsichtiges, viermaliges Waschen unter schwach fließendem Leitungswasser zur Entfernung von Zellresten und überschüssigem Medium
- Trocknung der 24-Lochplatten
- Färbung der fixierte Zellen mit 250 µl 0,4 %iger (w/v) SRB-Lösung für mindestens 30 min im Dunkeln
- Abspülen des nicht an das Zellprotein gebundenen Farbstoffes mit Leitungswasser (2x) sowie mit 1 %iger (v/v) Essigsäure (2x)
- Nach dem Trocknen wird der Farbstoff mit Tris-Base (pH 10) gelöst
- Photometrische Vermessung der Proben gegen Tris-Base mittels Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 570 nm

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf das Wachstum der HT29-Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der Kontrolle und der Testwerte berechnet. Die Mittelwerte der Proben werden auf den Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle bezogen. Der  $IC_{50}$ -Wert bezeichnet die Testsubstanzkonzentration, bei der die Wachstumsrate 50 % gegenüber der Kontrolle beträgt. Die zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes benötigten Formeln sind im Formelverzeichnis dargestellt.

---

**Trichloressigsäure (TCA):** 50 %ig (w/v) in  $H_2O_{bidest}$

---

**Essigsäurelösung:** 1 %ig (v/v) in  $H_2O_{bidest}$

---

**Sulforhodamin B-Lösung:** 0,4 %ig (w/v) in 1 %iger Essigsäurelösung

---

**Tris-Base (pH 10):** 10 mM Tris in  $H_2O_{bidest}$

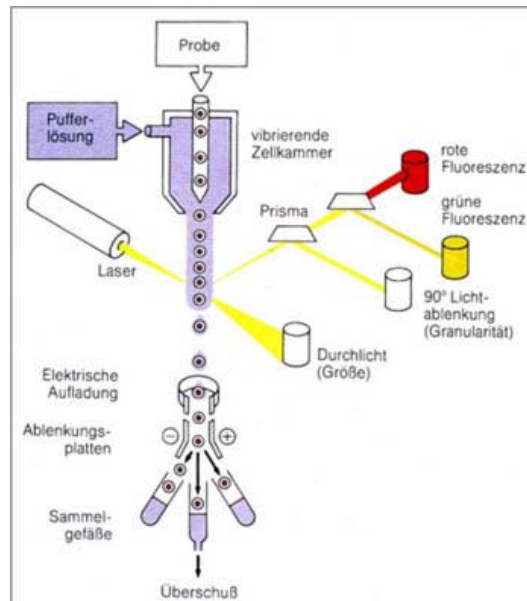
---

## 6.6 Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie

**Benötigte Reagenzien:** DAPI / SR101 (Cystain 2 colour fluorescence; Partec) Ethanol, Nocodazol-Lösung, PBS (1x), Trypsin-Lösung

Die Durchflusszytometrie (Abbildung 73) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen einem Flüssigkeitsstrom. Zur Analyse passieren die in der Lösung vereinzelt vorliegenden Zellen in einem engen Strom eine Durchflussküvette. Durch diese hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen, wie an einer Perlenkette aufgereiht, meist an einem gebündelten Lichtstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die hochempfindliche Interaktionszone ist hierbei der Schnittpunkt zwischen dem Probenstrom und einem bzw. mehreren fokussierten Lichtstrahlen (z. B. Laser oder UV-Lampe) oder einem elektrischen Feld. Optische (Streulicht, Fluoreszenz) oder elektrische Signale werden sequentiell für jeden einzelnen Partikel bzw. jede einzelne Zelle generiert. So kommt es bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes in den abgefärbten Zellen auf ein höheres Energieniveau. Nach dem Lichtpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Zellen. Durch die Lichtbeugung und die Lichtstreuung können weitere Informationen (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) ermittelt werden. Die gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge angeregt werden aber charakteristische Emissionsspektren aufweisen. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert und in Form einer Zellverteilungsanalyse (Histogramm) angezeigt [Valet, 2003].

Die gemessene Fluoreszenz der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe DAPI und Sulforhodamin 101 ist proportional zum DNA-Gehalt der Zellen. Da der DNA-Gehalt von Zellen, welche sich in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus befinden, aufgrund des doppelten Chromosomensatzes größer ist als in Zellen der G<sub>1</sub>-Phase, kann somit die Arretierungen der Zellen in einzelnen Zellzyklus-Phasen ermittelt werden [Valet, 2003].



**Abbildung 73:** Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers mit Zellsortierung [<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>].

### 6.6.1 Zellkultivierung für Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung

300.000 HT29-Zellen werden in Petrischalen ( $d = 5 \text{ cm}$ ) ausgestreut und 48 h unter den in Kapitel 6.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Eine Hälfte der Petrischalen wird zur Arretierung der Zellen in der  $G_1$ -Phase und die andere Hälfte zur Arretierung in der  $G_2/M$ -Phase benötigt.

### 6.6.2 Arretierung der HT29-Zellen

Da die Testsubstanzen aufgrund ihrer zellulären Wirkungen die Zellen sowohl in der  $G_1$ -Phase als auch in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus arretieren können, ist es notwendig, die Zellen vor der Substanzinkubation zu synchronisieren.

**Serumarrest ( $G_1$ -Arrest):** Die Zellen werden nach der 48-stündigen Anwachsphase (10 % FKS im Kulturmedium) weitere 48 h in serumfreiem Medium kultiviert.

**Nocodazol-Arrest ( $G_2/M$ -Arrest)** Nach der Anwachsphase wird das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit  $0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$  Nocodazol in serumhaltigem (10 % FKS) Medium für 16 h inkubiert.

### 6.6.3 Substanzinkubation und Aufarbeitung der HT29-Zellen zur Durchfluss-zytometrie

Nach der Arretierung wird das entsprechende Medium entfernt und die HT29-Zellen für weitere 36 h mit den Testsubstanzen in serumhaltigem Kulturmedium inkubiert. Zu jedem Arrest wird jeweils eine Anwachskontrolle (HT29-Zellen in Kulturmedium (Kapitel 6.3), zum Zeitpunkt an dem die anderen Proben arretiert werden), eine Arrest-Kontrolle (HT29-Zellen in serumfreiem (nach 48 h) bzw. nocodazolhaltigem Medium (nach 16 h)), sowie eine Lösungsmittel-Kontrolle (DMSO, 1 % Endkonzentration) mitgeführt und zum gegebenen Zeitpunkt wie folgt aufgearbeitet.

- Medium in 15 ml PP-Röhrchen überführen
- Petrischale zweimal mit 0,5 ml angewärmten PBS (1x, Kapitel 6.3) waschen und Waschlösung ebenfalls im entsprechenden PP-Röhrchen sammeln
- Zellen werden mit 0,5 ml Trypsin (Kapitel 6.3) bei 37 °C im Brutschrank für 2 Minuten behandelt
- HT29-Zellen mit Pipette ablösen und die Zellsuspension wieder in das entsprechende PP-Röhrchen überführen
- Petrischale dreimal mit 0,5 ml serumhaltigem Medium nachspülen, um alle Zellen abzulösen
- Gesammelte Zellsuspension 10 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren
- Überstand abdekantieren und Zellpellet trocknen lassen
- Zellpellet mit 1 ml 70 %igem, 4 °C kaltem Ethanol resuspendieren
- Lagerung bei 4 °C für mehrere Wochen möglich

### 6.6.4 Durchflusszytometrische Vermessung der Proben

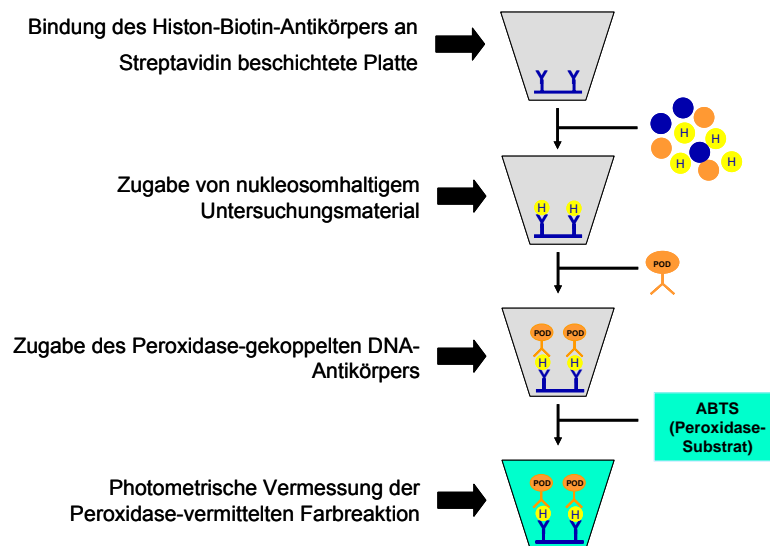
- In 70 %igen EtOH gelagertes Zellpellet nochmals gut auf Vortex resuspendieren (Zellen sollten so gut wie möglich vereinzelt werden)
- Ein Aliquot (200 – 500 µl) entnehmen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Zellsuspension 5 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren
- Überstand verwerfen

- Zellen in 1 ml DAPI / SR101 („Cystain 2 colour fluorescence“; Partec)-Lösung re-suspendieren und nach Überführung sofort in ein Sarstedt-Röhrchen sofort zur Messung einsetzen
- Geräteeinstellung Partec PA II:
  - Speed 3,5 – 4
  - Gain FL3 490  
FL4 333FL3 und FL4 werden linear gemessen
- Filtersatz: KG1, BG38, UG1, TK420, TK560, OG590, GG43
- Auswerte Software Partec FlowMax

## 6.7 Methoden zur Untersuchung von Apoptoseinduktion

### 6.7.1 Bestimmung von fragmentierter DNA mittels Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup> (Roche)

Das Testprinzip des ELISAs („enzyme-linked immunosorbent assay“) der Firma Roche beruht auf einem „Sandwich-Enzym-Immunoassay“ mit monoklonalen Antikörpern gegen DNA-Fragmente und Histone. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgt über eine photometrische Vermessung einer Peroxidase vermittelten Farbreaktion (Abbildung 74).



**Abbildung 74:** Testprinzip des Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup> von Roche.

#### 6.7.1.1 Zellinkubationsbedingungen

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Zellinkubationsbedingungen wurden für die aufgelisteten Versuche analog durchgeführt und werden deswegen in den entsprechenden Kapiteln nicht nochmals erläutert:

- Bestimmung von fragmentierter DNA (Kapitel 6.7.1)
- Caspase-3-Aktivitätsbestimmung (Kapitel 6.7.2)
- PKC-Aktivitätsbestimmung nach Zellinkubation (Kapitel 6.11.3)
- Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen die PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  (Kapitel 6.11.5)



- GSK3 $\beta$ -Aktivitätsassay nach Zellinkubation (Kapitel 6.12.7)
- Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin und phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (Kapitel 6.13)

Es werden  $1,5 \times 10^6$  HT29-Zellen pro Petrischalen (d = 10 cm) bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Nach 48 h wird das FKS von 10 % auf 1 % für 24 h reduziert. Die Substanzinkubation erfolgt serumfrei für weitere 24 h. Die Lösungsmittelkonzentration (DMSO) beträgt 1 % im Endansatz.

### 6.7.1.2 Zellaufarbeitung für den Apoptose-ELISA

Die Aufarbeitung wurde modifiziert nach Marko et al. [2003] durchgeführt.

- Medium in 15 ml PP-Röhrchen überführen
- Petrischale zweimal mit angewärmten 1 ml PBS (1x, Kapitel 6.3) waschen und Waschlösung ebenfalls im entsprechenden PP-Röhrchen sammeln
- Zell mit 1 ml Trypsin (Kapitel 6.3) bei 37 °C im Brutschrank für zwei Minuten inkubieren
- HT29-Zellen mit Pipette ablösen und die Zellsuspension wieder in das entsprechende PP-Röhrchen überführen
- Petrischale dreimal mit 1 ml serumhaltigem DMEM-Medium (Kapitel 6.3) nachspülen, um alle Zellen abzulösen und Medium ebenfalls sammeln
- Zellsuspension 10 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren
- Pellet in 2 ml 1x PBS vorsichtig resuspendieren und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer für jede Platte (Kapitel 6.3.3)
- Das entsprechende Volumen mit 15.000 Zellen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Lyse-Puffer (Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>) erfolgt die Zelllyse bei RT für 30 min und ein Zentrifugationsschritt bei 20.000 g für 10 min bei RT

### 6.7.1.3 Durchführung des Cell Death Detection ELISA<sup>Plus</sup> (Roche)

Alle benötigten Antikörper, die Positivkontrolle (Histone), der Inkubationspuffer, der Lysepuffer, der Substratpuffer, ABTS<sup>®</sup> und eine Streptavidin-beschichtete 96-Lochplatte sind im ELISA-Testsystem von Roche enthalten.

- Lösen der Lyophilisate des primären Anti-Histon-Biotin Antikörpers, des sekundären Peroxidase (POD)-gekoppelten Anti-DNA-Antikörpers und des DNA-Histon-Komplexes (Positivkontrolle) in je 450 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- 10 min bei RT stehen lassen und danach gut mischen (Vortex)
- Lagerung bei 2 – 8 °C, stabil für zwei Monate
- Direkt vor der Versuchsdurchführung eine ABTS<sup>®</sup>-Tablette in 5 ml Substratpuffer lösen und bei 15 – 25 °C lagern (vor Licht schützen!)
- Herstellung des Immunoreagenzes durch Mischen von 1/20 (v/v) Anti-DNA Antikörper und 1/20 (v/v) Anti-Histon-Biotin Antikörper in 18/20 (v/v) in Inkubationspuffer (Tabelle 17)

Der Anti-Histon-Biotin Antikörper bindet spezifisch Histon H1, H2A, H2B, H3 und H4, der Anti-DNA Antikörper an einzel- und doppelsträngige DNA.

**Tabelle 17:** Pipettierschema für das Immunoreagenz

	<b>100 Ansätze</b>
Inkubationspuffer	7200 µl
Anti-Histon Biotin	400 µl
Anti-DNA-POD	400 µl
Σ = Immunoreagenz	8000 µl

Versuchsdurchführung: Alle Ansätze werden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

- 20 µl Zellysat werden pro Vertiefung in eine Streptavidin-beschichtete 96-Lochplatte pipettiert (dabei darauf achten, dass bei Überführung des Zentrifugationsüberstandes, dass Zellpellet nicht beschädigt wird)
- Hintergrund: 20 µl Inkubationspuffer/Loch
- Positivkontrolle: 20 µl/Loch

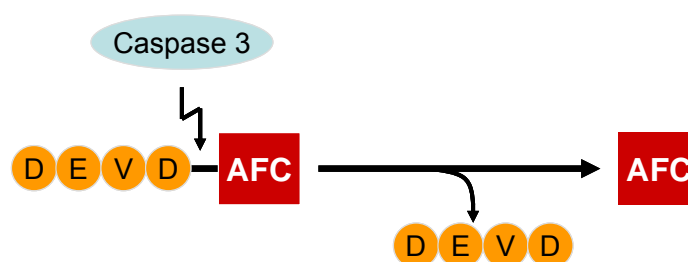
- Negativkontrolle: 20 µl DMSO-Lösung (1 % im Endansatz)/Loch
- In jede Vertiefung der 96-Lochtiterplatte werden 80 µl Immunoreagenz hinzupipetiert
- Die Mikrotiterplatte abdecken und 2 h bei RT und 300 rpm auf dem Vortexer schütteln
- Die Lösung entfernen und die Platte dreimal mit 100 µl Inkubationspuffer ausspülen
- Zugabe von 100 µl ABTS<sup>®</sup>-Puffer
- Photometrische Vermessung bei  $\lambda = 405$  nm gegen ABTS<sup>®</sup>-Lösung als Leerwert ( $\lambda_{\text{Ref}} = 490$  nm)
- Die Messung wird alle 2 Minuten durchgeführt, bis der Absorptionswert der Positivkontrolle zwischen 0,7-1 liegt (linearer Bereich)

Die DNA-Fragmentierung wird in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle als T/C [%] berechnet.

## 6.7.2 Untersuchung zur Caspase-3-Induktion

**Benötigte Reagenzien:** AFC-Stammlösung, Caspase-3-Substrat (DEVD-AFC), Caspase-3-Inhibitor (DEVD-CHO), Fluoreszenzstandard, Dithiothreitol (DTT)-Stammlösung, Lyse-Puffer und Assay-puffer

Das eingesetzte Substrat DEVD-AFC (Asp-Glu-Val-Asp-AFC (7-Amino-4-trifluormethylcumarin)) wird nach Asp-4 durch die Caspase-3 gespalten. Dabei wird fluoreszierendes AFC frei. Da dies nicht nur durch Caspase-3, sondern auch durch unspezifische Proteasen geschieht, wurde der spezifische Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO (Aldehyd) eingesetzt (Abbildung 75).



**Abbildung 75:** Schematische Darstellung des Caspase 3-Aktivitätsassays. D, Asparaginsäure; E, Glutaminsäure; Val, Valin; AFC, 7-Amino-4-trifluormethylcumarin)

Die spezifische Caspase-3-Aktivität berechnet sich aus der Gesamt-DEVDase (ohne DEVD-CHO) – unspezifische DEVDase (mit DEVD-CHO).

### 6.7.2.1 Erstellung der AFC-Standardgerade

Messpunkte der Standardgerade: 0 – 10  $\mu\text{M}$  (Tabelle 18)

- AFC-Arbeitslösung [10  $\mu\text{M}$ ]: 10 mM Stammlösung in Assay-Puffer mit 1 % (v/v) DTT-Stammlösung verdünnen (Lichtempfindlichkeit beachten und Stock gleich wieder einfrieren).
- Messung am Fluoreszenzdetektor (Plattenlesegerät) sofort bei RT beginnen! (4-fach-Bestimmung)
- Zugehörige Fluoreszenzen bestimmen und Linearitätsbereich festlegen
- Filterpaar: Extinktion 390 nm, Emission 520 nm

**Tabelle 18:** Pipettierschema für AFC-Standardgerade.

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Arbeitslösung [ $\mu\text{l}$ ]	Assay-Puffer [ $\mu\text{l}$ ]
0	-	100
0,1	1	99
0,3	3	97
0,5	5	95
0,8	8	92
1	10	90
2	20	80
4	40	60
6	60	40
8	80	20
10	100	0

Die Inkubation der HT29-Zellen wird wie unter Kapitel 6.7.1.1 beschrieben durchgeführt

### 6.7.2.2 Zellaufarbeitung für die Caspase-3-Aktivitätsbestimmung

- Medium in 15 ml PP-Röhrchen überführen
- Petrischale zweimal mit 1 ml angewärmten PBS (Kapitel 6.3) waschen und Waschlösung ebenfalls im entsprechenden PP-Röhrchen sammeln
- Zellen mit 1 ml Trypsin (Kapitel 6.3.2) bei 37 °C im Brutschrank für 2 Minuten inkubieren
- HT29-Zellen mit Pipette ablösen und die Zellsuspension wieder in das entsprechende PP-Röhrchen überführen
- Petrischale dreimal mit 1 ml serumhaltigem DMEM-Medium (Kapitel 6.3) nachspülen, um alle Zellen abzulösen und das Medium ebenfalls sammeln
- Zellsuspension 10 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren
- Pellet in 2 ml 1x PBS vorsichtig resuspendieren und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation für 5 min, 200 g bei RT
- Pellet trocken ziehen, 150 µl Lyse-Puffer hinzufügen und 30 min auf Eis stehen lassen (alle 5 min gut „vortexen“)
- Zentrifugation bei 20.000 g für 10 min und 4 °C
- Überstand aufteilen: ein Aliquot à 120 µl (Caspase-3-Assay) und ein Aliquot à 20 µl (Proteinbestimmung nach Bradford). Bis zur Caspase-3-Bestimmung bei -80 °C lagern (max. 3 Monate)

### 6.7.2.3 Caspase-3-Aktivitätsassay

- Die bei -80 °C gelagerten Zelllysate langsam auf Eis auftauen
- Assay-Puffer vorbereiten: pro Ansatz werden 100 µl Assay-Puffer und 1 µl DTT-Stammlösung benötigt
- Spezifischen Caspase-3-Inhibitor vorbereiten: pro Block-Ansatz werden 10 µl Inhibitor-Arbeitslösung (1 µM) benötigt:
  - Stock (200 µM) 1:200 mit Assay-Puffer verdünnen
- Caspase-Substrat vorbereiten: pro ungeblocktem Ansatz werden 10 µl Substrat-Arbeitslösung (2 mM) benötigt (lichtempfindlich!)

- Alle Lösungen bis zum Gebrauch auf Eis lagern!

**Tabelle 19:** Pipettierschema für Caspase-3-Aktivitätsbestimmung.

	Assay-Puffer [ $\mu$ l]	Zellysat [ $\mu$ l]	DEVD-CHO [ $\mu$ l]	DEVD-AFC [ $\mu$ l]
Leerwert	90	-	-	10
Leerwert mit Inhibitor	80	-	10	10
Zellysat	40	50	-	10
geblocktes Zellysat	30	50	10	10

- Außer Caspase-3-Substrat alles zusammenpipettieren (Tabelle 19)
- Im Fluoreszenzplattenlesegerät 10 min bei RT schütteln
- Zwischenzeitlich Caspase-Substrat auf RT bringen
- Mit 10  $\mu$ l Substrat die Caspasereaktion starten
- Kurz im Plattenlesegerät schütteln
- Messintervall: jede Minute für eine Stunde (61 Messungen)
- AFC-Zunahme über die Zeit ermitteln
- Die Leerwert-Fluoreszenz wird überall abgezogen
- Leerwert-bereinigte Fluoreszenzen mit Hilfe der Standardgeraden (Kapitel 6.7.2.1) in AFC-Konzentrationen umrechnen (nur linearen Bereich der Kinetik berücksichtigen)

### 6.7.2.3.1 Berechnung der spezifischen Caspase-3-Aktivität

- Aus berechneter AFC-Konzentration den AFC-Gehalt in nmol berechnen:
  - entstandenes AFC = umgesetztes Substrat in  $\mu$ mol
- umgesetztes Substrat in nmol in Bezug zur Reaktionszeit in min setzen:
  - Aktivität = nmol AFC/min
- Aktivität in Bezug zur eingesetzten Proteinmenge setzen:
  - Proteinmenge in den eingesetzten 50  $\mu$ l Lysat in mg
- Daraus ergibt sich die DEVDase-Aktivität in nmol AFC pro min x mg Protein
- Die spezifische Caspase-Aktivität berechnet sich aus der Differenz zwischen ungeblockter und geblockter DEVDase-Aktivität

<b>Fluoreszenzstandard:</b>	5	mg	7-Amino-4-trifluormethylcumarin (AFC, Sigma #A8401)
	2,18	ml	DMSO
<b>Caspase 3-Substrat:</b>	5	mg	DEVD-AFC (Biomol # P409)
	392	$\mu$ l	DMSO Lagerung des 20 mM Stocks bei -20°C in Alufolie
<b>Caspase 3-Inhibitor:</b>	1	mg	DEVD-CHO (Biomol # P410)
	400	$\mu$ l	DMSO Lagerung des 200 mM Stocks bei -80 °C
<b>1 M DTT-Stammlösung:</b>	100	mg	DTT
	650	$\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> Lagerung bei -20 °C
<b>Lysepuffer:</b>	50	mM	HEPES (pH 7,4)
	0,1	mM	EDTA
	0,1 %	(v/v)	Triton X-100
	0,1 %	(w/v)	CHAPS
			Lagerung bei 4 °C Vor Verwendung frisch hinzugeben (End- konzentration): ○ 1 mM DTT-Lösung; 1 mM PMSF und je 1 $\mu$ g/ml Leupeptin und Pep- statin
<b>Assaypuffer</b>	50	mM	HEPES (pH 7,4)
	1	mM	EDTA
	100	mM	NaCl
	0,1 %	(w/v)	CHAPS
	10 %	(v/v)	Glyzerol Lagerung bei 4 °C Vor Verwendung frisch hinzugeben (End- konzentration): ○ 10 mM DTT-Lösung

## 6.8 Bestimmung der Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR)

### 6.8.1 Kultivierung der Zellen

Zur Aufreinigung des EGFR werden 40 Petrischalen (d = 14 cm) mit jeweils  $3,6 \times 10^6$  A431-Zellen in serumhaltigem ME-Medium ausgesät und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Die Aufarbeitung zur Rezeptorisolierung erfolgt nach dem Erreichen einer Zelldichte von 80-90 % [Gastpar 1997]. Alle Aufarbeitungsschritte werden auf Eis durchgeführt.

### 6.8.2 Isolierung und Aufreinigung des EGF Rezeptors

**Benötigte Reagenzien:** CaCl<sub>2</sub>-Lösung, DTT-Lösung, KMP-Puffer, KMP-T-Puffer, N-Acetylglukosamin-haltiger Säulenpuffer, NaCl-Lösung, NaN<sub>3</sub>-haltige NaCl-Lösung, PBS (1x), Trypsin/ EDTA-Lösung, Säulenpuffer

Nach Entfernung des Kulturmediums werden die Petrischalen zweimal mit je 3 ml PBS (1x) gewaschen. Zur Abtrypsinierung der Zellen werden diese mit 3 ml Trypsin/EDTA für 12 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die A431-Zellen werden danach mit 2 ml serumhaltigem Medium von der Oberfläche der Petrischale mit Hilfe eines Zellschabers gelöst. Diese Zellsuspension wird in 50 ml PP-Röhrchen überführt. Mit 3 ml PBS (1x) werden die Schalen nachgespült und die Lösung mit der Zellsuspension in den PP-Röhrchen vereinigt. Anschließend folgt ein Zentrifugationsschritt von 8 min bei 2000 g und 4 °C. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird mit 1 x PBS (Kapitel 6.3) resuspendiert. Nach Vereinigung der Zellpellets wird nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes wird das Zellfeuchtgewicht bestimmt, welches bei 40 großen Petrischalen in etwa 2 g betragen sollte. Das Zellpellet wird in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert. Mit einer dreimaligen Ultraschallbehandlung (je 10 s auf Eis mit jeweils 20 s Pausen), wird das Aufbrechen der Zellmembran erreicht. Durch vier Zentrifugationsschritte in der Ultrazentrifuge (UZ) von je 18 min bei 15000 g (2 – 4 °C) wird die gelöste, EGFR-haltige Membran von anderen Zellbestandteilen getrennt. Nach



jedem Zentrifugationsschritt werden die Überstände auf Eis gesammelt. Das Pellet wird jeweils in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert und vor jeder neuen Zentrifugation erneut mit Ultraschall für 3 x 5 s behandelt. Das Pellet kann schließlich nach dem vierten UZ-Schritt verworfen werden; der Überstand dagegen wird mit 1 M CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O-Lösung auf eine Endkonzentration von 10 mM CaCl<sub>2</sub> eingestellt. Dadurch aggregieren die intrazellulären Membranbestandteile bei Raumtemperatur (15 min), was durch eine deutliche Trübung der Suspension sichtbar wird. Die aggregierten Membranbestandteile werden 30 min bei 7000 g (2 °C) abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird halbiert und nochmals für 60 min (2 – 4 °C) bei 100.000 g in der UZ zentrifugiert. Die erhaltenen Membranpellets werden bei -80 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen 6 - 12 Monate haltbar.

Die Aufreinigung des EGFR erfolgt mittels Absorptionschromatographie an Weizenkeimlektinagarose [Gastpar, 1997]. Dazu wird eine Säule mit Natriumazid-stabilisierte Weizenkeimlektinagarose befüllt und über Nacht mit 1 M NaCl-Lösung und einer Durchflussrate von 0,1 ml/min bei 4 °C gespült, um die Weizenkeimlektinagarose von dem antimikrobiell und -fungizid wirkenden Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) zu befreien. Um Aktivitätsverluste des EGFR bei der Aufreinigung zu vermeiden, werden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Einer der gelagerten Membranpellets (von 20 Platten) wird mit KMP-T-Puffer resuspendiert und eine Stunde gerührt. Die Abtrennung ungelöster Bestandteile erfolgt durch die Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 1 h und 4 °C.

Unterdessen wird die Säule mit etwa 100 ml Säulenpuffer equilibriert. Der Zentrifugationsüberstand wird auf die Säule gegeben, das Eluat im PP-Röhrchen gesammelt und erneut auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wird anschließend noch zweimal wiederholt. Dabei binden die Proteine an das Säulenmaterial. Zur Beseitigung von Zellbestandteilen wird nochmals mit Säulenpuffer gespült. Mit 0,3 M N-Acetyl-D-Glukosaminhaltigem (25 ml) Säulenpuffer wird der EGFR schließlich eluiert und in 5 Fraktionen zu je 4,5 ml aufgefangen. Nach Zugabe von je 500 µl 10 mM DTT-Lösung zu jeder EGFR-haltigen Fraktion werden die Fraktionen in je zehn Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Da die Weizenkeimlektinagarose mehrfach verwendet werden kann, jedoch sehr anfällig gegenüber Mikroben ist, wird über Nacht mit 1 M NaCl mit 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> gespült.

<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung:</b>	1 M	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
<b>DTT-Lösung:</b>	10 mM	Dithiothreitol
<b>PMSF-Stammlösung:</b>	100 mM	PMSF in Isopropanol
<b>KMP-Puffer Stammlösung:</b>	20 mM 1 mM 5 mM	PIPES MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O KCl
<b>KMP-Puffer:</b>	10 ml 0,2 mM	KMP-Puffer-Stammlösung PMSF
<b>KMP-T-Puffer:</b>	10 ml 100 µl 0,2 mM	KMP-Puffer-Stammlösung Triton <sup>®</sup> X-100 PMSF
<b>Säulenpuffer (pH 7,2):</b>	40 mM 500 mM 10 % (v/v) 0,05 % (v/v)	HEPES NaCl pH-Wert einstellen, dann erst Zugabe Glyzerol Triton <sup>®</sup> X-100
<b>N-Acetylglukosamin-haltiger Säulenpuffer (300 mmol):</b>	9,95 g 150 ml	N-Acetyl-D-Glukosamin Säulenpuffer
<b>NaCl-Lösung:</b>	1 M	NaCl
<b>NaN<sub>3</sub>-haltige NaCl-Lösung:</b>	0,02 % (w/v)	NaN <sub>3</sub> in NaCl-Lösung
<b>1 x PBS:</b>		Kapitel 6.3.2
<b>Trypsin/EDTA-Lösung:</b>	0,25 g 0,35 g	Trypsin EDTA Mit 1 x PBS auf 500 ml auffüllen

### 6.8.3 Beschichten von Mikrotiterplatten mit Substrat

#### Benötigte Reagenzien: Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung (Sigma Aldrich), Waschpuffer

Zehn 96-Loch-Immunoplatten (Greiner) mit hoher Proteinbindungskapazität werden über Nacht mit je 100 µl des Proteintyrosinkinase (PTK)-Substrates Poly-Glutaminsäure/Tyrosin (Poly Glu; Tyr 4:1) pro Vertiefung bei 35 °C im Trockenschrank inkubiert. Sobald die Platten getrocknet sind, werden sie dreimal mit 200 µl/Well Waschpuffer für je 5 min gewaschen, ausgeklopft und im Trockenschrank bei 35 °C erneut ge-

trocknet. Die beschichteten Platten werden in einem dunklen Raum/Karton in Plastiktüten gelagert werden.

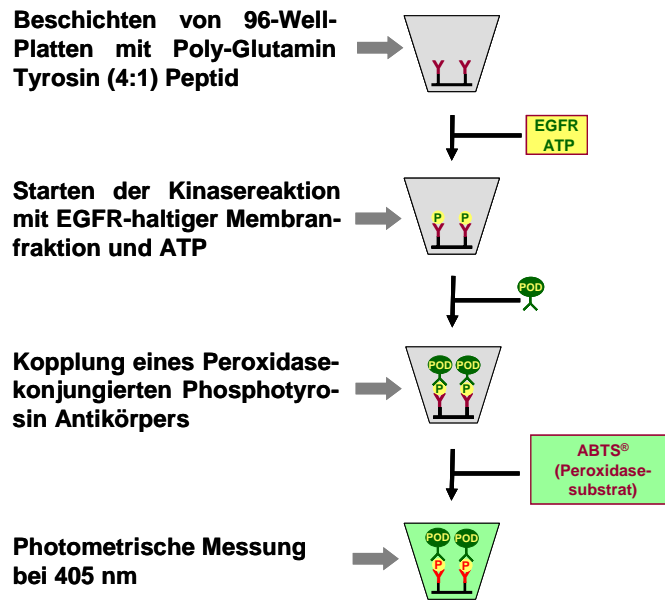
#### **6.8.4 Testung der einzelnen EGFR-Fraktionen auf ihre PTK-Aktivität**

**Benötigte Reagenzien:** ABTS<sup>®</sup>-Lösung, Antikörperlösung (Anti-Phosphotyrosinperoxidase (PY99, Santa Cruz)), Assaypuffer, PBS/0,1 % BSA, Tyrphostin AG1478, Waschpuffer

Zur Untersuchung der PTK-Aktivität des EGFR werden die ersten vier der aufgereinigten Fraktionen herangezogen. Ein Aliquot jeder dieser vier Fraktionen wird jeweils mit PBS/0,1 % BSA im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:6 und 1:8 auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. Die Methode erfolgt, ohne Mehrfachbestimmung, wie unter Kapitel 6.8.5 beschrieben. Die Fraktionen, die nach maximal einer Stunde bei 35°C bei 405 nm eine Extinktion von 0,8 - 1,2 aufweisen, können in der entsprechenden Verdünnung für den EGFR-ELISA verwendet werden.

#### **6.8.5 Aktivitätsuntersuchungen der EGFR-assozierten Proteintyrosinkinaseaktivität (ELISA)**

Der Einfluss von Testsubstanzen auf die PTK-Aktivität des EGFR wird mittels enzymvermittelter Immunoreaktion (ELISA: „enzyme linked immunosorbent assay“) bestimmt (Abbildung 76).



**Abbildung 76:** Testprinzip des EGFR-ELISA [modifiziert nach Meiers et al, 2001; Marko et al, 2004]

- Erwärmung einer Kupferplatte im Trockenschrank bei 35 °C zur späteren gleichmäßige Wärmeverteilung auf alle „Wells“ der 96-Lochplatte
- Die Randlöcher werden mit 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> befüllt, um bei den Inkubationen gleiche Bedingungen in den übrigen Vertiefungen zu erhalten (Abbildung 77).
- 10 µl der Testsubstanz in 10 %iger DMSO-Lösung in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> werden vorgelegt.
- Im Vergleich dazu werden zur Normalreaktion und zum Blindwert 10 %ige DMSO-Lösung in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vorgelegt (Abbildung 77).
- Als positive Hemmkontrolle wird Tyrphostin AG1478 (100 µM in 10 %iger DMSO-Lösung in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) mitgeführt (Abbildung 77).
- Aktive EGFR-haltige Fraktion wird auf Eis aufgetaut und nach Bedarf in 1x PBS (Kapitel 6.3.2) verdünnt. Pro Loch werden 40 µl der EGFR-Verdünnung zugegeben und 10 min bei RT mit den Testsubstanzen inkubiert.
- Zum Blindwert werden 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gegeben. In den anderen Vertiefungen (Normalreaktion, positive Hemmkontrolle und Testsubstanzen) wird die Tyrosinkinase-reaktion durch Zugabe von 50 µl, auf 37 °C erwärmten, Assaypuffer gestartet (30 min bei 35 °C im Trockenschrank).
- Die Proteintyrosinkinase-reaktion wird durch Absaugen der Lösungen und dreimaliges Waschen von je 5 min mit je 200 µl Waschpuffer gestoppt.

- Die Platten werden dann zum Trocknen gut ausgeklopft.
- Zu jedem Ansatz der trockenen Immunlochplatte werden je 75 µl frisch angesetzte Anti-Phosphotyrosinperoxidase-Lösung, Peroxidase gekoppeltes Antiphosphotyrosin IgG (1:2000) in PBS(1x)/1 % BSA, im Dunkeln pipettiert.
- Nach 1 h bei 35 °C wird die Antikörperlösung entfernt und wie oben beschrieben gewaschen.
- Durch Zugabe von 100 µl ABTS®-Lösung wird die Peroxidase-Reaktion im Dunkeln gestartet. Es kommt zur peroxidasevermittelten Farbreaktion (Grünfärbung). Nach maximal 1 h bei 35 °C wird die Farbreaktion photometrisch bei λ = 405 nm gegen λ = 490 nm vermessen. Die PTK-Aktivitätshemmung zeigt sich durch eine weniger intensive Grünfärbung (Abbildung 77).

Die Auswertung erfolgt als „Test over Control“ [T/C]-Wert in Bezug auf den als 100 % gesetzten Mittelwert der Normalreaktion (= Lösungsmittelkontrolle). Nachfolgend ist die Formel für den „Test over Control“ – Wert aufgeführt:

$$T / C[\%] = \frac{T - C_N}{C_B - C_N} \cdot 100\%$$

T/C: “Test over Control” – Wert  
 T: optische Dichte der Testsubstanz  
 C<sub>N</sub>: optische Dichte der Normalreaktion  
 C<sub>B</sub>: optische Dichte des Blindwerts

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau
B	Blau	B	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Blau
C	Blau	B	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Blau
D	Blau	N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Blau
E	Blau	N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Blau
F	Blau	P	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Blau
G	Blau	P	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Blau
H	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau

**Abbildung 77:** Pipettierschema für eine Mikrotiterplatte im EGFR-ELISA. Blau, H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; B, Basiswert; N, Normal, Lösungsmittelkontrolle; P, Positivkontrolle, Tyrphostin AG1478 [10 µM]; T Testsubstanz, (2-11 in steigender Konzentration).

<b>ABTS<sup>®</sup>-Lösung:</b> (lichtempfindlich)	1 x	ABTS <sup>®</sup> -Tablette in 5 ml 10x- Puffer lösen mit 45 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen
<b>Antikörperlösung:</b>	1 % (w/v) 1:2000	BSA Anti-Phosphotyrosin (PY99, Santa Cruz) in PBS (1 x)
<b>Assaypuffer (pH 7,2):</b>	50 mM 10 mM 2 mM 200 µM	HEPES MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O ATP in 5 ml-Röhrchen aliquotieren Lagerung -20 °C
<b>Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung :</b>	0,1 mg	Poly (Glu, Tyr) 4:1 in 1 ml PBS (1 x)
<b>Tyrphostin-Lösung:</b>	100 µM	Tyrphostin AG1478 in 10 %iger DMSO-Lösung in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> .
<b>Waschpuffer:</b>	0,1 % (v/v)	Tween-20 in PBS (1 x)
<b>PBS</b>		Kapitel 6.3.2

## 6.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse

**Benötigte Reagenzien:** Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung, Blockingreagenz, Blottingpuffer, LumiGlo<sup>®</sup>-Reagenz, Rotiphorese 30 (37,5 : 1), SDS-Laufpuffer, SeeBlue<sup>®</sup>-Plus2 Proteinmolekulargewichtsstandard, SDS-Lösung, SDS-Probenpuffer, n-Butanol, N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Tris/HCl (1,5 M), Tris/HCl (0,5 M), Waschpuffer

### 6.9.1 Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (diskSDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt mittels SDS-PAGE in einem Vertikalsystem (MiniProtean II der Firma BioRad). Dazu werden Glasplatten entsprechend der Anleitung im Gießstand fixiert und dienen danach als Wände in der Kathodenpufferkammer. Zur Trennung der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele mit unterschiedlichen Polyacrylamidanteilen verwendet (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Liste der zu charakterisierenden Proteine und der Polyacrylamidanteil der verwendeten Trenngele.

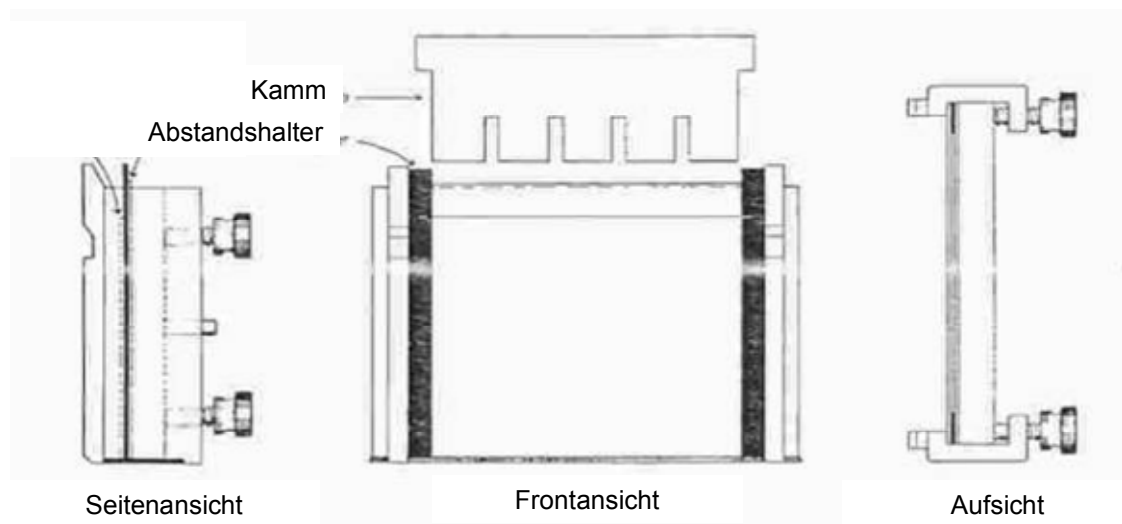
Zu charakterisierendes Protein	MG [kDA]	Polyacrylamidanteil des Trenngels [%]
EGFR und phospho-EGFR	175	7
ERK1/2 (p44/p42)	44/42	12
GSK3 $\beta$	46	12
$\beta$ -Catenin und phospho- $\beta$ -Catenin	92	10
PKC $\alpha$	80	10
PKC $\delta$	78/38	10
$\alpha$ -Tubulin	54	12

Die Pipettierschemata für Trenngele mit Polyacrylamidgelanteilen von 7 %, 10 % und 12 % sind in Tabelle 21 dargestellt. Die angegebenen Mengen reichen für ein Trenngel mit einer Breite von 8,3 cm, Höhe von 5 cm und Dicke von 0,1 cm.

**Tabelle 21:** Pipettierschemata für die verwendeten Trenngele (1x).

Komponenten	Polyacrylamidanteil im Trenngel		
	7 %ig	10 %ig	12 %ig
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	2,54 ml	2,05 ml	1,72 ml
Tris/HCl (1,5 M) pH 8,8	1,23 ml	1,23 ml	1,23 ml
Rotiphorese (37,5 : 1)-Lösung	1,15 ml	1,65 ml	1,97 ml
10 %ige SDS-Lösung	49,2 µl	49,2 µl	49,2 µl
APS-Lösung	24,6 µl	24,6 µl	24,6 µl
TEMED	2,46 µl	2,46 µl	2,46 µl

Das Trenngel wird bis auf eine Höhe von etwas 5 cm (~ 3,5 ml) zwischen die beiden Glasplatten pipettiert (Abbildung 78) und zum Ausschluss von Luftsauerstoff mit n-Butanol überschichtet.

**Abbildung 78:** Darstellung des verwendeten Vertikalsystems MiniProteanII der Firma BioRad

Nach vollständiger Polymerisierung des Gels wird das n-Butanol entfernt. Nach Spülung mit H<sub>2</sub>O und der Entfernung der Wasserreste mit einem Papiertuch folgt das Aufgießen des Sammelgels (Tabelle 22). Ein Kamm dient dabei zur Ausbildung der Probenaschen (Abbildung 78).



**Tabelle 22:** Pipettierschema eines Sammelgels.

Komponenten	Sammelgel 4 %ig
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1,2 ml
Tris/HCl (0,5 M) pH 6,8	500 µl
Rotiphorese (37,5 : 1)-Lösung	250 µl
10 %ige SDS-Lösung	20 µl
APS-Lösung	20 µl
TEMED	2 µl

Nach Polymerisierung des Sammelgels wird der Kamm vorsichtig entfernt, die Probenaschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gespült und das Wasser wieder aus den Taschen mittels Kanüle und Wasserstrahlpumpe entfernt. Die Probenaufarbeitung wird bei den jeweiligen Untersuchungen beschrieben. Die Proben werden mit 6x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt und nach kurzer Abkühlung in die Probenaschen pipettiert (40 µg Gesamtproteinmenge). Um einerseits das Molekulargewicht des zu charakterisierenden Proteins zu bestimmen und zusätzlich der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine zu folgen, wird ein Proteinmolekulargewichtsstandard (SeeBlue Plus2) mitgeführt. Die Elektrophorese wird nach dem Auffüllen der Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer (1x) gestartet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wird mit einer Spannung von U = 100 V durchgeführt, die jedoch nach dem Übertreten der Proteine ins Trenngel auf U = 130 V erhöht werden kann.

### 6.9.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran und Detektion mittels spezifischer Antikörper

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt mittels „semi-dry Blot“ in Anwesenheit von „Blotting-Puffer“. Die dafür benötigten Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran müssen zuvor in 1x-Blotting-Puffer equilibriert werden. Der Aufbau erfolgt so, dass auf der Anodenseite nach zwei Whatman-Papieren die Nitrozellulosemembran, das Gel und nach weiteren zwei Whatman-Papieren die Kathodenseite des „semi-dry“ Elektrobloetter aufgelegt wird. Beim Aufbau des „Sandwich“ aus den Whatman-Papieren, der Nitrozellulosemembran und des Gels ist darauf zu achten, dass sich keine

Luftblasen zwischen den Schichten bilden, da dadurch der Proteintransfer verhindert wird. Der Proteintransfer wird bei einer konstanten Stromstärke von  $I = 50 \text{ mA}$  pro Gel über 90 min durchgeführt.

Im Anschluss an den Proteintransfer wird die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in „Blockingreagenz“ geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken.

Das Protokoll der Antikörperinkubation wird im folgenden Abschnitt kurz erläutert.

- Inkubation mit Erstantikörperlösung: Nitrozellulosemembran mit Erstantikörper je nach Herstellerangaben in 1x TBS / 0,1 % Tween 20-Lösung mit entweder 5 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) oder 5 % (w/v) Milchpulver für 90 min bei RT oder über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf dem Überkopfschüttler inkubieren
- 3 x 5 min in Waschpuffer waschen
- Inkubation mit Zweitantikörperlösung: Nitrozellulosemembran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1:2000 v/v) in „Blockingreagenz“ für 60 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubieren
- 3 x 5 min in Waschpuffer waschen
- Einminütige Inkubation mit LumiGlo<sup>®</sup>-Lösung
- Detektion und Auswertung erfolgte mittels Lumi-Imager<sup>™</sup> mit der LumiAnalyst 3.0 Software zur Semiquantifizierung (Roche Diagnostics, Mannheim) bzw. mittels LAS3000 mit der Aida Image Analyser-Software Version 3.52 (Fuji/Raytest, Deutschland).
- Die semiquantitative Auswertung erfolgt in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle als T/C in [%]

<b>Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung:</b>	10 % (w/v)	APS in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
<b>Blockingreagenz:</b>	5 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Tween 20 in 1x TBS
<b>2x Blottingpuffer:</b>	78 mM	Glycin
	96 mM	Tris/HCl
	0,074 % (w/v)	SDS
	40 % (v/v)	Methanol
<b>LumiGlo<sup>®</sup>-Reagenz:</b>	9 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
	0,5 ml	Reagenz A (Luminol)
	0,5 ml	Reagenz B (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )

<b>10x SDS-Laufpuffer:</b>	2 M	Glycin
	250 mM	Tris/HCl pH 8,3
	1 % (w/v)	SDS
<b>SDS-Lösung:</b>	10 % (w/v)	SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
<b>6x SDS-Probenpuffer:</b>	50 ml	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
	40 ml	Glyzerol
	1,24 g	SDS
	0,16 g	Bromphenolblau
		Vor Gebrauch frisch hinzugeben:
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
<b>Tris/HCl (pH 8,8) für Trenngele:</b>	1,5 M	Tris/HCl
<b>Tris/HCl (pH 6,8) für Sammelgele:</b>	0,5 M	Tris/HCl
<b>20x TBS:</b>	2,6 M	NaCl
	0,4 M	Tris/HCl (pH 7,6)
<b>Waschpuffer:</b>	0,3 %	Tween <sup>®</sup> 20 in 1x TBS

## 6.10 Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des EGFR und den extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2)

**Benötigte Reagenzien:** monoklonaler Anti-EGFR (non-phospho-Tyr1173, Upstate) und Anti-phospho-EGFR (Tyr1173, clone 9H2, Upstate), polyklonaler Anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling), Anti-α-Tubulin (Santa Cruz), HRP-konjugierter Anti-mouse-IgG (Santa Cruz), HRP-konjugierter Anti-rabbit-IgG (Cell Signaling), Lyse-Puffer, RIPA-Puffer

Mittels Western Blot Analyse wird die Modulation der Autophosphorylierung des EGFR sowie der Phosphorylierungsstatus der extrazellulär regulierten Kinasen ERK1/2 - Elemente der dem EGFR nachgeschalteten Proteinkinasekaskade- untersucht. Als Beladungskontrolle wird bei allen folgenden Western Blot Analysen der Gehalt an α-Tubulin bestimmt.

### 6.10.1 Kultivierung der HT29-Zellen

Es werden  $7,5 \times 10^5$  HT29-Zellen in Petrischalen ( $d = 10 \text{ cm}$ ) ausgesät und mit 10 ml DMEM (10 % FKS, 1 % PS) bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 72 h wird das Kulturmedium gegen ein serumreduziertes Medium (1 % FKS) getauscht. Nach weiteren 24 h erfolgt die serumfreie Inkubation mit den Testsubstanzen.

### 6.10.2 Inkubation der HT29-Zellen mit den Testsubstanzen

Die Testsubstanzen werden immer direkt vor Versuchsbeginn in DMSO gelöst und entsprechend einer Endkonzentration von 1% DMSO in serumfreiem Medium verdünnt. Es werden bei jedem Experiment eine Lösungsmittelkontrolle und der spezifische EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 [ $1 \mu\text{M}$ ] als Positivkontrolle mitgeführt. Die Zellen werden in 6 ml Medium mit den Substanzen für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgt die spezifische Stimulierung des EGFR durch die Zugabe von EGF (Endkonzentration  $1 \text{ ng/ml}$ ) für 15 min (EGFR, ERK1/2) bzw. für 4,5 h (ERK1/2)

### 6.10.3 Gewinnung der Zellproteine

Alle folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt.

- Medium verwerfen und die HT29-Zellen 2 x mit je 3 ml eiskaltem 1x PBS (Kapitel 6.3) waschen
- Die HT29-Zellen werden mit je 200  $\mu\text{l}$  Puffer (Tabelle 23) abgeschabt und in einen eiskalten Handhomogenisator („tight Pistill“) überführt
- Durch 40 Hübe wird ein Zellhomogenat erstellt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt
- Es folgt eine zehnminütige Zentrifugation bei  $20.000 \text{ g}$  und  $4^\circ\text{C}$
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels der Methode nach Bradford (Kapitel 6.4) der Proteingehalt bestimmt
- Der Proteingehalt der Proben wird auf  $2 \text{ mg/ml}$  eingestellt
- Die Proben werden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, bei  $95^\circ\text{C}$  für 5 min denaturiert und sofort zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt.

**Tabelle 23:** Für die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des EGFR und von ERK1/2 verwendete Puffer zur Lyse der HT29-Zellen.

Phosphorylierungsstatus des EGFR	Phosphorylierungsstatus von ERK1/2
RIPA-Puffer (siehe unten)	Lyse-Puffer (Kapitel 6.12.6)

Die Auftrennung der zu charakterisierenden Proteine sowie deren Detektion erfolgt mittels Western Blot Analyse (Kapitel 6.9.). Die Erstantikörper werden in den beschriebenen Verdünnungen in 5 % Milchpulver (w/v) in 1x TBS (0,1 % Tween<sup>®</sup> 20) angesetzt (Tabelle 24) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Erstantikörperlösungen können mindestens zweimal verwendet werden. Die HRP-konjugierten Zweitantikörper, sowohl der „Anti-mouse“ IgG als auch der „Anti-rabbit“ IgG werden in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS (1x), 0,1 % (v/v) Tween 20 mit 5 % (w/v) Milchpulver verwendet.

**Tabelle 24:** Verdünnungsangaben der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Molekulargewicht [kDa]	Verdünnung
Anti-EGFR (non-phospho-Tyr1173, Upstate)	175	1 : 500
Anti-phospho-EGFR (Tyr1173, clone 9H2, Upstate)	175	1 : 500
Anti-Phospho-ERK1/2 (Cell Signaling)	44/42	1 : 1000
Anti- $\alpha$ -Tubulin (Santa Cruz)	54	1 : 5000

**RIPA-Puffer (pH 7,4):**

50 mM	Tris/HCl	
155 mM	NaCl	
1 mM	EDTA	
1 % (v/v)	Igepal	
1 mM	NaF	
	Vor Gebrauch frisch zugeben	
1 mM	PMSF	
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	(aktiviert, Kapitel
1 µg/ml	6.12.6)	
1 µg/ml	Leupetin	
	Pepstatin	

## 6.11 Bestimmung Proteinkinase C (PKC)-Aktivität

**Benötigte Reagenzien:** „Swelling Puffer“, glyzerolhaltiger „Swelling Puffer“, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP-Puffer, Phosphorsäure, PKC-Kit (RPN77, Amersham), Szintilationscocktail Rotiszint EcoPlus (Roth)

Die Erfassung der PKC-Aktivität erfolgt über die Messung der Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein PKC-spezifisches Substratpeptid (Kit RPN 77, Amersham Bioscience) unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP.

### 6.11.1 Herstellung des PKC-haltigen zytosolischen Überstandes

- 5 x 10<sup>6</sup> HT29-Zellen werden pro Petrischale (d = 13 cm) ausgestreut und für zwei Tage bis zur 80 – 90 %igen Konfluenz bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert.
- Die HT29-Zellen werden durch zweimaliges Waschen mit 5 ml eiskaltem 1x PBS vom Medium befreit.
- Abschaben der Zellen mit 300  $\mu$ l „Swelling-Puffer“ (Schritt wiederholen)
- Anschließend wird die Zellsuspension im Handhomogenisator („tight Pistill“) mit 40 Hübren homogenisiert
- Das Homogenat wird mit dem gleichen Volumen an glyzerolhaltigem „Swelling-Puffer“ versetzt
- Die Zellsuspension wird anschließend 3 min bei 1000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein UZ-Reaktionsgefäß (Beckman) überführt
- Zum Erhalt des zytosolischen Überstandes folgt eine Zentrifugation von 30 min und 100.000 g bei 4 °C
- Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Kapitel 6.4)

### 6.11.2 Durchführung des PKC-Aktivitätsassays

Die Messung der PKC-Aktivität erfolgt mit Hilfe des „PKC-enzyme assay kit“ (RPN 77, Amersham Bioscience).

Im Assay-Kit sind sechs Lösungen enthalten:

- Calciumpuffer (Reagenz 1)

- PKC-Aktivatoren (Reagenz 2)
- Substratpeptid (Reagenz 3)
- Stabilisator DTT (Reagenz 4)
- ATP-Lösung (Reagenz 5)
- Stopplösung (Reagenz 6)

Alle Arbeitsschritte bis zur Inkubation werden auf Eis durchgeführt, um die Aktivität der PKC zu sichern. Die Reagenzien 1 - 4 werden zu gleichen Anteilen miteinander gemischt (Reaktionsmischung).

#### **Pipettierschema für die Hintergrundkontrolle:**

- 25 µl Reaktionsmischung
- 25 µl „Swelling Puffer“
- 5 µl [ $\gamma^{32}$ -P]-ATP-Puffer (0,2 µCi pro Tube) in Reaktionsgefäßdeckel

#### **Pipettierschema für Testsubstanzen bzw. Lösungsmittelkontrolle:**

- 25 µl Reaktionsmischung
- 20 µl Zellysat
- 5 µl Substanz bzw. Lösungsmittel (1 % DMSO im Endansatz)
- 5 µl [ $\gamma^{32}$ -P]-ATP-Puffer (0,2 µCi pro Tube) in Reaktionsgefäßdeckel

#### **Durchführung**

- Die Proben kurz bei 20.000 g zentrifugieren und „vortexen“
- Proben für Kinasereaktion 15 min bei 37 °C im Schüttler inkubieren
- Zugabe von 10 µl Stopplösung und nochmals „vortexen“
- Die Probe anschließend mit Hilfe einer Pipette gut mischen und 35 µl pro Phosphozelluloseplättchen pipettieren
- Als Hinweis für die Wascheffizienz werden 5 µl des [ $\gamma^{32}$ -P]-ATP-Puffers direkt auf ein Phosphozelluloseplättchen pipettiert
- Anschließend die Phosphozelluloseplättchen gut trocknen lassen
- Die getrockneten Plättchen werden 3 x 5 min mit 0,75 %iger Phosphorsäure gewaschen und danach 5 min in Aceton p. A. geschwenkt

- Jedes Phosphozelluloseplättchen wird in ein „Maxivial“ (Zinnser Analytik) gegeben.
- Nach Zugabe von 8 ml Szintilationscocktail pro „Maxivial“ werden sie im Szintilationszähler vermessen (2 min pro Vial)
- Zur Kontrolle wird ein Leerwert mitgeführt, d. h. 5  $\mu\text{l}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP-Puffer in 8 ml Szintilationscocktail werden direkt vermessen

### Kalkulation der spezifischen Aktivität (R) von 1,2 mM (Kit RPN 77) Magnesium [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP

5  $\mu\text{l}$  von 1,2 mM Magnesium [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP beinhaltet  $6 \times 10^{-9}$  M ATP

$$R = \frac{[Mg[\gamma^{32}P]ATP]}{6} \text{ cpm / nmol}$$

### Kalkulation des transferierten Phosphatrestes (T) auf das Substratpeptid

35  $\mu\text{l}$  auf dem Phosphocelluloseplättchen und Gesamtvolumen 65  $\mu\text{l}$

$$T = \left( \text{cpm}_{\text{sample}} \cdot \frac{65}{35} \right) - \text{cpm}_{\text{blanks}}$$

### Kalkulation der pmol transferierten Phosphates (TP) pro Minute und mg Protein (P)

$$TP = \frac{T \cdot 1000}{I \cdot R \cdot P} \text{ pmol / min} \cdot \text{mg P}$$

I: Inkubationszeit (min) = 15 min

P: eingesetzte Proteinmenge



<b>„Swelling“ Puffer (pH 7,5):</b>	30 mM	Tris / HCl
	10 mM	KCl
	5 mM	MgAc <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
	5 mM	EGTA
		Direkt vor Gebrauch dazu geben
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,31 % (v/v) β-Mercapthoethanol</li> <li>• 0,5 % (v/v) Proteaseinhibitormix</li> </ul>
<b>Glyzerolhaltiger „Swelling“ Puffer:</b>	25 % (v/v)	Glyzerol in Swelling Puffer
<b>Proteaseinhibitormix:</b>	200 μM	Pepstatin und Leupeptin in
	100 mM	PMSF in Isopropanol
<b>[γ<sup>32</sup>P]-ATP-Puffer:</b>	40 μCi/ml	[γ <sup>32</sup> P]-ATP in ATP-Lösung (Reagenz 5, RPN77)
<b>Phosphorsäurelösung:</b>	0,75 %	Phosphorsäure in Leitungswasser

### 6.11.3 PKC-Aktivitätsbestimmung nach Inkubation von HT29-Zellen

Die HT29-Zellen werden wie unter Kapitel 6.7.1.1 beschrieben inkubiert. Die Lösungsmittelkonzentration (DMSO) beträgt 1 % im Endansatz. Am Ende der Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die zytosolische Fraktion der HT29-Zellen wird analog zu Kapitel 6.11.1 hergestellt. Bei der Messung der PKC-Aktivität (Kapitel 6.11.2) besteht der einzige Unterschied darin, dass das Substanzvolumen durch das entsprechende Volumen an Zelllysat ersetzt wird.

### 6.11.4 PKC-Aktivitätsbestimmung mit primären Kolonozyten

**Benötigte Reagenzien:** HBSS (Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>-frei, Invitrogen), Kollagenase (Roche), Proteinase K (Sigma Aldrich), „Swelling“-Puffer (Kapitel 6.11),

#### 6.11.4.1 Aufarbeitung des Biopsiematerials

Die primären Kolonozyten, die uns freundlicherweise von Prof. Stallmach zur Verfügung gestellt wurden, werden nach der Entnahme in HBSS-Lösung bei 4 °C aufbewahrt und spätestens 1 h nach Entnahme aufgearbeitet. Die Isolierung der Kolonozyten erfolgte modifiziert nach Pool-Zobel et al. [1999].

- Kolonbiopsieprobe mit einem Skalpell in einem Uhrglas unter sterilen Bedingungen zerkleinern
- Die zerkleinerte Biopsieprobe wird mit einer Enzymlösung aus Proteinase K (6 mg/ml HBSS) und Kollagenase (3 mg/ml HBSS) versetzt und in ein steriles 15 ml PP-Röhrchen überführt
- Skalpell und Uhrglas werden mit je 0,5 ml HBSS nachgespült und die Spüllösung wird ebenfalls in das PP-Röhrchen überführt
- Das Lösen der Zellen aus dem Zellverband erfolgt für 30 min bei 37 °C im Wasserbad
- Anschließend wird zur Zellsuspension 12 ml HBSS hinzugegeben und 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 2 ml DMEM mit 4,5 g/l Glukose, ohne Natriumpyruvat (Invitrogen) versetzt

Nach der Zellzahlbestimmung (Kapitel 6.3.3) werden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen zur PKC-Aktivitätsbestimmung eingesetzt

- Dafür wird das entsprechende Volumen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert
- Das Zellpellet wird in 2 ml 1x PBS resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert
- Die Lyse des Zellpellets erfolgt mit 200 µl „Swelling“-Puffer mit Hilfe eines Handhomogenisators („tight Pistill“, 40 Hübe).

- Die Zellsuspension wird in ein Ultrazentrifugationsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Glycerol versetzt
- Der zytosolische Überstand (Zentrifugation bei 30 min, 100.000 g und 4 °C) wird bis zum Kinase-Assay bei -80 °C gelagert (maximal 4 Wochen)

Nach der Proteinbestimmung (Kapitel 6.4) wird der PKC-Aktivitätsassay analog zu Kapitel 6.11.2 durchgeführt.

### 6.11.5 Untersuchungen zur Modulation der Expression der PKC-Isoformen PKC $\alpha$ und PKC $\delta$

**Benötigte Reagenzien:** „Anti-mouse“-PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  (Santa Cruz, Deutschland), „Anti-mouse“-IgG (HRP-gekoppelt, Santa Cruz, Deutschland), GF109203X Bisindoylmaleimid (Sigma-Aldrich), „Swelling“-Puffer, Reagenzien für SDS-PAGE und Western Blot Analyse (Kapitel 6.9)

Mittels Western Blot Analyse mit monoklonalen Antikörpern gegen PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  wurde der Gesamtproteingehalt von PKC $\alpha$  und PKC $\delta$  nach 24-stündiger serumfreier Substanzinkubation bestimmt. Als Positivkontrolle wurde der PKC-spezifische Inhibitor Bisindoylmaleimid GF109203X in einer Konzentration von 100 nM mitgeführt. Die Zellinkubation wurde wie in Kapitel 6.7.1.1 beschrieben durchgeführt.

### 6.11.6 Gewinnung der Zellproteine und Western Blot Analyse

Alle folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt.

- Medium verwerfen und die HT29-Zellen 2 x mit je 3 ml eiskaltem PBS (1x) waschen
- Die HT29-Zellen werden mit je 200  $\mu$ l „Swelling“-Puffer (Kapitel 6.11.2) abgeschabt und in einem eiskalten Handhomogenisator („tight Pistill“) überführt
- Durch 40 Hübe wird ein Zellhomogenat erstellt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt
- Es folgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels der Methode nach Bradford (Kapitel 6.4) dessen Proteingehalt bestimmt

- Der Proteingehalt der Proben wird anschließend auf 2 mg/ml eingestellt
- Die Proben werden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt
- Die Proben können bis zu drei Monate bei -20 °C gelagert werden

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (10 % Acrylamidanteil im Trenngel) der zu charakterisierenden Proteine erfolgt die Detektion mittels Western Blot Analyse (Kapitel 6.9.). Die Erstantikörper (Anti-PKC $\alpha$ -IgG (80 kDa) und Anti-PKC $\delta$ -IgG (78/38 kDa)) werden in einer Verdünnung von 1:500 in 1x TBS (0,1 % Tween<sup>®</sup> 20) mit 5 % Milchpulver (w/v) angesetzt. Die Nitrozellulosemembranen werden mit den entsprechenden Antikörperlösungen über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Erstantikörperlösungen können mehrmals verwendet werden. Der HRP-konjugierten Zweitantikörper („Anti-mouse“-IgG) wird in einer Verdünnung von 1:2000 in 1x TBS (0,1 % (v/v) Tween 20) mit 5 % (w/v) Milchpulver verwendet. Die Detektion und Auswertung erfolgt mittels LAS3000 mit der „Aida Image Analyser“-Software Version 3.52 (Fuji/Raytest).

## 6.12 Bestimmung der Aktivität von immunopräzipitierter GSK3 $\beta$

**Benötigte Reagenzien:** GSK3 $\beta$  „Anti-mouse“ IgG (BD Bioscience), Lyse-Puffer, Microcystin-Lösung, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP-Lösung, Peptide (Biosyntan), Proteinkinase Inhibitor (Alexis), Protein G-Sepharose (Sigma), Puffer A, Puffer A mit 0,5 M NaCl, Szintilationscocktail Rotiszint EcoPlus (Roth)

Die Erfassung der GSK3 $\beta$  -Aktivität erfolgt über die Messung der Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein spezifisches GSK3-Substratpeptid basierend auf der Phosphorylierungssequenz des Translationsfaktors eIF2B unter Verwendung von radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP nach einer modifizierten Methode von Welsh et al. [1997].

Das Substratpeptid wurde von der Firma Biosyntan (Berlin) synthetisiert und hat folgende Aminosäuresequenz: RRAAEELDSRAG(phospho)SPQL.

Das Substratpeptid enthält als Phosphorylierungsstelle für die GSK3 ein Serin (rot) und ein phosphoryliertes Serin in der „plus 4“ Position (blau). Das phospho-Serin vier Stellen vor dem Serin in der Aminosäuresequenz des Substratpeptides ist entscheidend für die Umsetzung durch die GSK3 [Roach, 1991; Wang et al, 1994].

Ein Peptid, in dem das phosphorylierte Serin durch ein Alanin (grün) ersetzt ist, kann somit nicht mehr von der GSK3 als Substrat phosphoryliert werden und dient im durchgeführten GSK3 $\beta$  -Aktivitätsassay als Kontrollpeptid für die spezifische Phosphorylierung des Substratpeptides durch GSK3 $\beta$  [Welsh et al, 1997].

Das Kontrollpeptid wurde ebenfalls von der Firma Biosyntan (Berlin) synthetisiert und hat folgende Aminosäuresequenz: RRAAEELDSRAGAPQL.

### 6.12.1 Zellkultivierung der HT29-Zellen

Es werden  $5 \times 10^6$  HT29-Zellen in Petrischalen (d = 14 cm) mit 20 ml Kulturmedium (Kapitel 6.3) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte für 48 h kultiviert.

### 6.12.2 Gewinnung der Zellproteine

Die Gewinnung der Zellproteine und die Immunopräzipitation der GSK3 $\beta$  werden nach einer modifizierten Methode von Cross [2001] durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis.

- Medium verwerfen und HT29-Zellen 2x mit eiskaltem PBS waschen
- Die HT29-Zellen mit 200  $\mu$ l Lysepuffer versetzen und mit Hilfe eines Zellschabers ablösen
- 1  $\mu$ l Microcystin direkt zur Zellsuspension in den Handhomogenisator („tight Pistill“) hinzupipettieren, mit 40 Hüben homogenisieren und das Zelllysate in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C für 10 min
- Den Überstand in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und den Proteingehalt mittels der Methode nach Bradford (Kapitel 6.4) bestimmen

### 6.12.3 Aktivierung der Protein G-Sepharose

Im folgenden GSK3 $\beta$ -Aktivitätsassay werden pro Probe 50  $\mu$ l Protein G-Sepharose benötigt. Für die Aktivierung der Protein G-Sepharose werden folgende Schritte durchgeführt.

1. Abzentrifugieren des Überstandes bei 1000 g und 4 °C für 1 min
2. 2x mit eiskaltem 1x PBS waschen
3. Zwischen den Waschungen die Protein G-Sepharose wie unter Punkt 1 beschrieben zentrifugieren
4. Protein G-Sepharose in doppeltem Volumen an 1x PBS aufnehmen

### 6.12.4 Kopplung des GSK3 $\beta$ -Antikörpers an die Protein G-Sepharose

- Der monoklonale GSK3 $\beta$  -Antikörper (BD Bioscience) wird im Verhältnis 1:20 zur Protein G-Sepharose in einem 2 ml Reaktionsgefäß zugegeben (2,5  $\mu$ l Antikörperlösung auf 50  $\mu$ l Protein G-Sepharose)

- Das Reaktionsgefäß eine Stunde bei 4 °C belassen und alle 5 min durch an das Reaktionsgefäß schnipsen, um die Lösungen gut zu vermischen (nicht „vortexen“)

### 6.12.5 Immunopräzipitation der GSK3 $\beta$

- Für eine Probe werden 50  $\mu$ l mit Antikörper gekoppelte Protein G-Sepharose mit 600  $\mu$ g Gesamtprotein in einem Eppendorfreaktionsgefäß versetzt
- Das Volumen im Reaktionsgefäß, falls notwendig, bis auf 1 ml mit eiskaltem 1x PBS erhöhen, um eine gute Durchmischung zu erreichen
- Proben über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubieren

Vor der Durchführung des Kinaseassays folgen noch einige Waschungen des Immunopräzipitats, um Protein- und Antikörperreste zu entfernen.

- Zentrifugation der Immunopräzipitate bei 1000 g und 4 °C für 3 min
- Überstand verwerfen
- Je 2x mit eiskaltem Puffer A (0,5 M NaCl) und anschließend 2x mit Puffer A (0,15 M NaCl) waschen (Immunopräzipitat immer gut resuspendieren)
- Zwischen den Waschschritten wird bei folgenden Bedingungen zentrifugiert: 1000 g, 4 °C und 1 min
- Immunopräzipitat in 30  $\mu$ l Puffer A aufnehmen und sofort zur Bestimmung der Kinaseaktivität einsetzen

### 6.12.6 Bestimmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität

Das Immunopräzipitat wird zu einem Volumen von je 15  $\mu$ l auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. In Tabelle 25 ist das Pipettierschema zur GSK3 $\beta$  -Aktivitätsbestimmung dargestellt.

**Tabelle 25:** Pipettierschema zum GSK3 $\beta$  -Aktivitätsassay

	Hintergrund	Normalreaktion	Proben
Puffer A	105 $\mu$ l	75 $\mu$ l	60 $\mu$ l
Proteinkinase Inhibitor-Lösung	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l
Immunopräzipitat	-	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l
Testsubstanz / DMSO [1 % im Endansatz]	-	-	15 $\mu$ l
Substratpeptid / Kontrollpeptid	-	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP-Lösung}^{\text{a)}}$	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

a) Für einen gleichzeitigen Start der Kinasereaktion, die  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP-Lösung}$  in den Deckel der Reaktionsgefäße pipettieren, kurz runterzentrifugieren und „vortexen“

**Durchführung:**

- Proben 15 min bei 37 °C im Schüttler inkubieren
- Zum Abstoppen der Kinasereaktion die Proben zurück ins Eis stellen
- 35  $\mu$ l der Probe auf ein Phosphozelluloseplättchen (P81) geben (3x)
- Phosphozelluloseplättchen 5 min trocknen lassen
- Danach die Plättchen 3x je 5 min mit 0,75 %iger Phosphorsäure und 1x mit Aceton p. A. waschen
- Nach dem Trocknen der Phosphozelluloseplättchen folgt das Überführen in Maxivials (Zinnser)
- Nach Zugabe von 8 ml Szintilationscocktail pro Maxivial werden sie im Szintilationszähler vermessen (2 min pro Vial)
- Zur Kontrolle wird ein Leerwert mitgeführt, d. h. 10  $\mu$ l  $[\text{}^{32}\text{-P}]\text{-ATP-Lösung}$  in 8 ml Szintilationscocktail werden direkt vermessen

**Kalkulation der spezifischen Aktivität (A) von 500  $\mu$ M Mg- $[\gamma\text{}^{32}\text{-P}]\text{-ATP-Lösung}$  (s. ATP-Puffer)**

10  $\mu$ l einer 500  $\mu$ M Mg- $[\gamma\text{}^{32}\text{-P}]\text{-ATP-Lösung}$  entspricht  $5 \times 10^{-9}$  ATP

$$A = \frac{[\text{Mg}[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}]}{5} \text{ cpm / nmol}$$



**Bestimmung der transferierten Phosphatreste (P)**

35  $\mu$ l eines Gesamtvolumens von 50  $\mu$ l werden auf ein Phosphozelluloseplättchen pipetiert

$$P = \left( cpm_{Probe} \cdot \frac{50}{35} \right) - cpm_{Leerwert}$$

**Berechnung des Umsatzes (U) pro Minute**

$$U = \frac{P \cdot 1000}{T \cdot A} \left[ \frac{pmol}{min} \right]$$

T = Zeit = 15 min

**Umrechnung auf den Proteingehalt (R)**

$$R = \frac{U}{x} \left[ \frac{pmol}{min \cdot mg} \right]$$

Gesamtproteinkalkulation pro Ansatz : x = Proteinmenge in mg

Die Berechnung wird sowohl für das Substratpeptid als auch für das Kontrollpeptide durchgeführt. Anschließend wird die Differenz zwischen der spezifischen Aktivität von Substratpeptid und Kontrollpeptid gebildet. Da sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte, dass sich die spezifische Aktivität der Proben mit Kontrollpeptids nicht signifikant von der spezifischen Aktivität des Hintergrundwertes (Tabelle 25) unterscheidet, wurde die Messungen mit dem Kontrollpeptid eingestellt und nur noch der Hintergrundwert mit in die Berechnung einbezogen. Die Modulation der GSK3 $\beta$  -Aktivität wird in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle [%] angegeben.

<b>Lyse-Puffer (pH 7,4):</b>	25 mM	Tris / HCl
	3 mM	EDTA
	3 mM	EGTA
	50 mM	NaF
	270 mM	Saccharose
	10 mM	Na- $\beta$ -Glyzerolphosphat
	5 mM	Na-Pyrophosphat
	0,5 % (v/v)	Triton <sup>®</sup> X-100
		Vor Gebrauch frisch dazu geben:
	0,1 % (v/v)	$\beta$ -Mercapthoethanol
	2 % (v/v)	Proteaseinhibitorcocktail (Roche)
	2 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
<b>Proteaseinhibitorcocktail (Roche):</b>	1	Tablette in 2 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen
<b>Na-Orthovanadat:</b>	200 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Um Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> zu depolymerisieren und dadurch größtmögliche Tyrosin-Phosphatase Inhibierung zu gewährleisten, wird das Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> wie folgt aktiviert: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Einstellung des pH-Wertes auf 10</li> <li>• Bei diesem pH-Wert zeigt die Lösung eine intensiv gelbe Farbe</li> <li>• Erhitzen der Lösung bis sie farblos wird</li> <li>• Abkühlen der Lösung</li> <li>• Falls pH Einstellung auf 10 zu keiner erneuten Verfärbung führt, wird die Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Lösung bei -20 °C gelagert</li> </ul>
<b>[<math>\gamma^{32}</math>P]-ATP-Lösung:</b>	20 $\mu$ Ci/ml	[ $\gamma^{32}$ -P]-ATP in „kaltem“ ATP
<b>Kaltes ATP:</b>	500 $\mu$ M	ATP
	75 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Phosphorsäurelösung:</b>	0,75 % (v/v)	Phosphorsäure in Leitungswasser
<b>Proteinkinase Inhibitor (PKI „tide“, Alexis):</b>	10 $\mu$ M	PKI in H <sub>2</sub> O <sub>bidet.</sub>
<b>Puffer A (pH 7,4):</b>	50 mM	Tris / HCl
	1 mM	EGTA
	150 mM	NaCl
	0,03 % (v/v)	Brij
		Vor Gebrauch frisch dazu geben
	0,1 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol

---

<b>Puffer A mit 0,5 M NaCl:</b>	0,5 M	NaCl in Puffer A
---------------------------------	-------	------------------

---

### 6.12.7 Bestimmung der GSK3 $\beta$ -Aktivität nach Zellinkubation von HT29-Zellen

Die Zellkultivierung und Substanzbehandlung der HT29-Zellen erfolgt analog zu Kapitel 6.7.1.1. Die Aufarbeitung und Immunopräzipitation wird, wie in Kapitel 6.12.5 beschrieben, durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht darin, dass pro Substanzkonzentration eine eigene Immunopräzipitation (500  $\mu$ g Gesamtprotein + 2,5  $\mu$ l GSK3 $\beta$ -Antikörper + 50  $\mu$ l aktivierte Protein G-Sepharose) durchgeführt wird. Die Probe wird ebenfalls in zwei Aliquots aufgeteilt. Die im Pipettierschema (Tabelle 25) enthaltene Substanzlösung wird durch das entsprechende Volumen Puffer A ersetzt und der Kinaseassay, wie in Kapitel 6.12.6 beschrieben, durchgeführt.

### 6.13 Untersuchungen des Proteingehaltes von GSK3 $\beta$ und $\beta$ -Catenin sowie des Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin in HT29-Zellen

**Benötigte Reagenzien:** Anti- $\alpha$ -Tubulin (Santa Cruz, Deutschland), Anti- $\beta$ -Catenin (Cell Signaling Technology, USA), Anti-phospho- $\beta$ -Catenin (Ser33/Ser37/Thr41; Cell Signaling Technology, USA), Anti-GSK3 $\beta$  (BD Transduction Laboratories, USA), „Anti-mouse“-IgG (HRP-gekoppelt, Santa Cruz, Deutschland), „Anti-rabbit“-IgG (HRP-gekoppelt, Cell Signaling Technology, USA) Lyse-Puffer, 1x PBS (Kapitel 6.3.1), Reagenzien für SDS-PAGE und Western Blot Analyse (Kapitel 6.9)

Der Einfluss von Apfelpolyphenolen auf den GSK3 $\beta$  -Proteingehalt sowie auf die  $\beta$ -Catenin-Homöostase wird mittels Western Blot Analyse bestimmt. Als Beladungskontrolle wird  $\alpha$ -Tubulin (54 kDa) mitgeführt. Die Zellinkubation wird, wie in Kapitel 6.7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis.

- Medium verwerfen und die HT29-Zellen 2 x mit je 3 ml eiskaltem PBS (1x) waschen
- Die HT29-Zellen werden mit je 200  $\mu$ l Lysepuffer (Kapitel 6.12.6) abgeschabt und in einen eiskalten Handhomogenisator („tight Pistill“) überführt

- Durch 40 Hübe wird ein Zellhomogenat erstellt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert
- Es folgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mittels der Methode nach Bradford (Kapitel 6.4) der Proteingehalt bestimmt und auf 2 mg/ml eingestellt
- Die Proben werden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und sofort zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt.
- 20  $\mu$ l (40  $\mu$ g Gesamtprotein) des Zelllysates werden mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamidanteil im Trenngel; Kapitel 6.9.1) getrennt
- Die Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und unspezifische Proteinbindungsstellen durch Inkubation in Milchpulverlösung abgedeckt (Kapitel 6.9.2)
- Die Western Blot Analyse wird mit einem monoklonalen Antikörper gegen humane GSK3 $\beta$  und polyklonalen Antikörpern gegen humanes  $\beta$ -Catenin sowie phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (Ser33/Ser37/Thr41) durchgeführt (Tabelle 26). Danach erfolgt die Inkubation mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern gegen „mouse“-IgG und „rabbit“-IgG (Tabelle 26). Alle Antikörper werden in 1x TBS (0,1 % (v/v) Tween<sup>®</sup> 20) mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt.
- Die Detektion und Auswertung erfolgte mittels Lumi-Imager<sup>™</sup> und der LumiAnalyst 3.0 Software (Kapitel 6.9.2)

**Tabelle 26:** Für den Versuch benötigte Antikörper und eingesetzte Verdünnungen

Antikörper	Molekulargewicht [kDA]	Verdünnung
Anti-GSK3 $\beta$ (BD Transduction Laboratories)	46	1:2000
Anti- $\beta$ -catenin (Cell Signaling Technology)	92	1:1000
Anti-p- $\beta$ -catenin (Cell Signaling Technology)	92	1:1000
HRP-gekoppelter „Anti-mouse“-IgG (Santa Cruz)		1:2000
HRP-gekoppelter „Anti-rabbit“-IgG (Cell Signaling Technology)		1:2000

## 6.14 Materialienverzeichnis

### Allgemeine Chemikalien:

ABTS <sup>®</sup> -Puffer	Boehringer Mannheim
Aceton p. A.	Fluka
N-Acetylglukosamin	Sigma Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Alexis <sup>®</sup> Biochemicals
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Brij <sup>®</sup> 35, 30 %ige Lösung	Calbiochem
Bromphenolblau	Sigma
BSA Albumin Fraktion V	Roth
n-Butanol	Roth
CHAPS	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth
DAPI/SR101	Partec
Dimethylsulfoxid (DMSO) für UV-Spektroskopie	Fluka
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (EtOH) p. A.	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich
Glyzerol	Merck
Glycin	Roth
HEPES	Roth

Isopropanol, p. A.	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ )	Riedel-deHaën
Magnesiumacetat ( $\text{MgAc}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Magnesiumchloridhexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich
Mercaptoethanol	Roth
Methanol (MeOH)	Merck
Milchpulver	Roth
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Riedel-deHaën
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Na- $\beta$ -Glyzerolphosphat	Sigma Aldrich
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Riedel-deHaën
Phosphorsäure	Roth
PIPES	Roth
Rotiphorese 30 (37,5:1), Acrylamid 30 % wässrige Lösung mit 0,8 % N, N'-Methylenbisacrylamid	Roth
Saccharose	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Sulforhodamin B	Sigma Aldrich
N,N, N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure	Riedel-deHaën
Tris	Roth

Tris-Base	Roth
Triton <sup>®</sup> X-100	Serva
Tween <sup>®</sup> 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma Aldrich
<b>Enzyme:</b>	
Kollagenase	Calbiochem
Proteinase K	Sigma Aldrich
<b>Inhibitoren:</b>	
Bisindoylmaleimid GF109203X	Sigma Aldrich
Caspase-3 Inhibitor (DEVD-CHO)	Biomol
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma Aldrich
Tyrphostin AG1478	Sigma Aldrich
<b>Kits:</b>	
Cell Death Detection ELISA <sup>Plus</sup>	Roche
PKC enzyme assay kit RPN 77	Amersham Bioscience
<b>Phosphatase-, Protease- und Proteinkinaseinhibitoren:</b>	
Leupeptin	Alexis <sup>®</sup> Biochemicals
Microcystin LR	Alexis <sup>®</sup> Biochemicals
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich
Pepstatin	Alexis <sup>®</sup> Biochemicals
PKI tide (Proteinkinaseninhibitoren)	Alexis <sup>®</sup> Biochemicals
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Alexis <sup>®</sup> Biochemicals
Proteaseinhibitor complete	Roche

**Proteinstandards, Chemolumineszenzdetektion und Antikörper:**

BSA Standardlösung 2mg/ml	Pierce
Anti-EGFR (non-phospho-Tyr1173, monoclonal)	Upstate
Anti-phospho-EGFR (Tyr1173, clone 9H2, monoklonal)	Upstate
Anti-Phospho-ERK1/2 (polyklonal)	Cell Signaling Technology
Anti- $\alpha$ -Tubulin (monoklonal)	Santa Cruz
Anti-GSK3 $\beta$ (monoklonal)	BD Transduction Laboratories
Anti- $\beta$ -catenin (polyklonal)	Cell Signaling Technology
Anti-p- $\beta$ -catenin (Ser33/37/Thr41, polyklonal)	Cell Signaling Technology
Anti-PKC $\alpha$ (monoklonal)	Santa Cruz
Anti-PKC $\delta$ (monoklonal)	Santa Cruz
Peroxidase-gekoppelter Anti-p-Tyrosin p-Tyr (PY99)	Santa Cruz
HRP-gekoppelter „Anti-mouse“-IgG	Santa Cruz
HRP-gekoppelter „Anti-rabbit“-IgG	Cell Signaling Technology
LumiGLO	Cell Signaling Technology
SeeBlue Plus2™ Pre-stained Standard	Invitrogen™ Life Technologies

**Radiochemikalien:**

[ $\gamma$ <sup>32</sup> P]-ATP (3000 $\mu$ Ci)	Hartmann Analytic GmbH
Rotiszint Ecoplus	Roth

**Substrate:**

Caspasesubstrat (DEVD-AFC)	Biomol
GSK3 $\beta$ -Substrat (RRAAEELDSRAGS(p)PQL)	Biosynton
Kontrollpeptid (RRAAEELDSRAGAPQL)	Biosynton



**sonstige Sonderchemikalien:**

Agarose Wheat Germ Lectin in 1M NaCl	Amersham Biosciences
7-Amino-4-trifluormethylcumarin	Sigma Aldrich
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, human, rekombinant)	Calbiochem
Nocodazol	Sigma Aldrich
Poly (Glu, Tyr)1:4 sodium salt	Sigma Aldrich
Protein-G-Sepharose 4 fast flow	Sigma

**Polyphenole:**

Catechin	Extrasynthese
Chlorogensäure	Extrasynthese
4-Cumaroylchinasäure	Universität Saarbrücken (Prof. Becker <i>em.</i> )
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	Sigma Aldrich
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure	Sigma Aldrich
(-)-Epicatechin	Forschungsanstalt Geisenheim (Prof. Dietrich)
(-)-Epicatechingallat	Extrasynthese
(-)-Epigallocatechin	Extrasynthese
(-)-Epigallocatechingallat	Nestlé (Geschenk)
Gallussäure	Sigma Aldrich
4-Hydroxybenzoesäure	Sigma Aldrich
Hyperosid	Extrasynthese
Isoquercitrin	Extrasynthese
Kaffeesäure	Forschungsanstalt Geisenheim (Prof. Dietrich)
Phloretin	Roth
Phloridzin	Roth

Phloroglucinol	Extrasynthese
Procyanidin B1	Extrasynthese
Procyanidin B2	Extrasynthese
Procyanidintrimer	Universität Saarbrücken (Prof. Becker <i>em.</i> )
Procyanidintetramer	Universität Saarbrücken (Prof. Becker <i>em.</i> )
Protocatechusäure	Sigma Aldrich
Quercetin	Sigma Aldrich
Quercitrin	Extrasynthese
Rutin	Forschungsanstalt Geisenheim (Prof. Dietrich)
Syringasäure	Sigma Aldrich
Tricin	Universität Leicester (Prof. Gescher)
Vanillinsäure	Sigma Aldrich
<b>Zellkultur:</b>	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM mit 4500 mg/L Glukose, ohne Natriumpyruvat)	Invitrogen™ Life Technologies
fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen™ Life Technologies /Gibco™
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ
Humane Vulvakarzinomzelllinie A431	DSMZ
L-Glutamin	Invitrogen™ Life Technologies
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin 10000 I. U./10000 µg/ml	Invitrogen™ Life Technologies /Gibco™
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich
Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/mg)	Serva

## 6.15 Geräte

<b>Autoklav:</b>	Systec 5075 EL Autoklav (Systec)
<b>Fraktionssammler:</b>	Pharmacia LKB FRAC 100
<b>Blotter:</b>	Semi-Phor <sup>TM</sup> (Hoefer Scientific Instruments) PerfectBlue "Semi-dry" Elektrobplotter (PeqLab)
<b>Brutschrank:</b>	WTB-Binder CO <sub>2</sub> -Brutschrank CB210 (Binder)
<b>Durchflusszytometrie:</b>	Particle Analyzer System 2 (Partec) Filtersatz: KG1, BG38, UG1, TK420, TK560, OG590, GG43 Flow Max Software (Partec)
<b>Geldokumentationsgeräte:</b>	Lumi-Imager <sup>TM</sup> mit Lumi-Imager Analyst 3.1 Software (Boehringer Mannheim) LAS-3000 Fuji mit AIDA-Software Version 3.52 (Raytest/Fuji)
<b>Gelelektrophorese:</b>	Spannungsgeräte POWER PAC 200 & 300 (Bio RAD) Mini Protean II-System (Bio-Rad) PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S (PeqLab)
<b>Handhomogenisator:</b>	Homogenisator „tight Pistill“ (Wheaton Glsahomogenisator)
<b>Kühl-/Gefrierschränke/-80 °C</b>	Liebherr Premium und Comfort (4 °C, -20 °C)
<b>Ultra-tiefkühlschränke:</b>	Biofreezer MDF-U50V (Sanyo) Biofreezer (New Brunswick)
<b>Magnetrührer:</b>	Heidolph MR 2002
<b>Mikrotiterplattenlesegerät:</b>	Modell 450 (Bio-Rad) Fluoroskan Ascent FL BIOTEK <sup>®</sup> Synergy <sup>TM</sup> HT

<b>Mikroskopie:</b>	Inversmikroskop Axiovert 25 (Zeiss) Fluoreszenzfiltereinsatz 365, FT 395, LP 420 (Farbgläser mit Breitbandcharakter, UV- Anregung 365/366 nm), Fluoreszenzfiltereinsatz BP 450-490, FT510, LP520 Objektive: Plan Neofluar 100x/1,3 oil und 63x/1,25 oil Okular: PL10x Durchlicht/Fluoreszenzmikroskop Axioskop (Zeiss)
<b>pH-Meter:</b>	pH-Meter 766 calimatic (Knick) Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120
<b>Pipetten, Pipettus:</b>	<b>Mehrkanalpipette,</b> Multipette Plus (Eppendorf) Eppendorf Research P 2,5 -P 5000 (Eppendorf) Pipettus Akku (Hirschmann Laborgeräte Mehrkanalpipette (Eppendorf)
<b>Pumpen:</b>	Vakuumsaugpumpe Laboport <sup>®</sup> (KNF Neuberger) Hitachi L-6210 Intelligent Pump (Merck)
<b>Schüttler:</b>	Überkopfschüttler Heto Lab Equipment Typ RK 10-VS GFL <sup>®</sup> 3015 Schüttler Genie (VWR) Schüttelplattform 4020 (Kottermann)
<b>Sterilbank:</b>	KR-130 BW (Kojair) LaminAir HLB 2448 GS (Heraeus)
<b>Szintilationszähler:</b>	Beckman LS 1701
<b>Thermomixer:</b>	Thermomixer 5436 (Eppendorf) Thermomixer Comfort (Eppendorf) Thermomixer (Eppendorf)
<b>Trockenschrank:</b>	Heraeus, Memmert
<b>Ultraschallbad und –Stab:</b>	Bandelin Sonorex RK 255, RK 100 Labsonic 20000 (B. Braun)
<b>Vortex:</b>	Vortex MS Minishaker IKA <sup>®</sup> (VWR)

<b>Waagen:</b>	Vortex Genie 2™ (Bender und Hobein AG) Analysenwaage CP64-0CE (Sartorius) Analysenwaage CP124-S Grobwaage 1574 MP8-2 (Sartorius)
<b>Wasserbad:</b>	SW-20C (Julabo) EC (Julabo)
<b>Zentrifugen:</b>	Zentrifuge 5804R (Eppendorf) Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf) Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf) Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf) Ultrazentrifuge Optima™ TL TLA-45 (Beckmann) Ultrazentrifuge Centrikon T-2055 (Kontron) Zentrifuge Mode J2-21 (Beckmann)

## 7 Literaturverzeichnis

### A

- Abe T. (1999)** Infantile leukemia and soybeans--a hypothesis. *Leukemia*. 13, 317-20
- Adebamowo CA, Cho E, Sampson L, Katan MB, Spiegelman D, Willett WC, Holmes MD. (2005)** Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. *Int J Cancer*. 114, 628-33
- Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. (2000)** Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol Carcinog*. 28, 129-38
- Agullo G, Gamet L, Besson C, Demigne C, Remesy C. (1994)** Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Lett*. 87, 55-63
- Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, Payraastre B. (1997)** Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol*. 53, 1649-57
- Aherne SA, O'Brien NM. (2002)** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18, 75-81
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H et al., (1987)** Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem*. 262, 5592-5
- Aligiannis N, Mitaku S, Mitrocotsa D, Leclerc S. (2001)** Flavonoids as cycline-dependent kinase inhibitors: inhibition of cdc 25 phosphatase activity by flavonoids belonging to the quercetin and kaempferol series. *Planta Med*. 67, 468-70
- Arbuzova A, Schmitz AA, Vergeres G. (2002)** Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J*. 362, 1-12
- Armstrong JL, Bonavaud SM, Toole BJ, Yeaman SJ. (2001)** Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J Biol Chem*. 276, 952-6
- Arts IC, Hollman PC, Bueno De Mesquita HB, Feskens EJ, Kromhout D. (2001)** Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int J Cancer*. 92, 298-302

**Ashworth** A, Nakielny S, Cohen P, Marshall C. (1992) The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase. *Oncogene*. 7, 2555-6

**Assert** R, Kotter R, Bisping G, Scheppach W, Stahlnecker E, Muller KM, Dusel G, Schatz H, Pfeiffer A. (1999) Anti-proliferative activity of protein kinase C in apical compartments of human colonic crypts: evidence for a less activated protein kinase C in small adenomas. *Int J Cancer*. 80, 47-53

**Attar** BM, Atten MJ, Holian O. (1996) MAPK activity is down-regulated in human colon adenocarcinoma: correlation with PKC activity. *Anticancer Res*. 16, 395-9

**Aura** AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimia R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K. (2002) Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem*. 50, 1725-30

**Austin** CA, Marsh KL. (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays*. 20, 215-26

**Awad** HM, Boersma MG, Boeren S, van der Woude H, van Zanden J, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IM. (2002) Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett*. 520, 30-4

**Azuma** K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem*. 45, 5496-500

## **B**

**Baba** S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. (2000) Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res*. 33, 635-41

**Barth** SW, Fahndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G. (2005) Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis*. 26, 1414-21

**Basu** A, Miura A. (2002) Differential regulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways by protein kinase C. *Int J Mol Med*. 10, 541-5

**Basu** A. (2003) Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Mol Med*. 7, 341-50

- Batzer**, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y. and Schlessinger, J. (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5192–5201
- Bazley** LA, Gullick WJ. (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer.* 12, S17-27
- Beaulieu** JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov R. (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 5099-104
- Beeram** M, Patnaik A, Rowinsky EK. (2003) Regulation of c-Raf-1: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol.* 1, 476-81
- Behrens** J, Lustig B. (2004) The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol.* 48, 477-87
- Behrens** J. (2000) Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann N Y Acad Sci.* 910, 21-33
- Belham** C, Wu S, Avruch J. (1999) Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol.* 9, R93-6
- Berger** SJ, Gupta S, Belfi CA, Gosky DM, Mukhtar H. (2001) Green tea constituent (–)-epigallocatechin-3-gallate inhibits topoisomerase I activity in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 288, 101-5
- Bhatia** N, Agarwal C, Agarwal R. (2001) Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr Cancer.* 39, 292-9
- Blaut** M, Schoefer L, Braune A. (2003) Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res.* 73, 79-87
- Boege** F, Straub T, Kehr A, Boesenberg C, Christiansen K, Andersen A, Jakob F, Kohrle J. (1996) Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem.* 271, 2262-70
- Boonstra** J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. (1995) The epidermal growth factor. *Cell Biol Int.* 19, 413-30
- Boulton** TG, Cobb MH. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul.* 357-71.
- Boyer** J, Liu RH. (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J.* 3:5



**Boyer J, Brown D, Liu RH. (2005)** In vitro digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutr J.* 11, 1.

**Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. (1991)** Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell.* 64, 573-84

**Bradford MM. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54

**Bradley SJ, Garfinkle G, Walker E, Salem R et al. (1986)** Increased expression of the epidermal growth factor receptor on human colon carcinoma cells. *Arch. Surg.* 121, 1242-7

**Brantjes H, Roose J, van De Wetering M, Clevers H. (2001)** All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors *Nucleic Acids Res.* 29, 1410-9

**Braune A, Engst W, Blaut M. (2005)** Degradation of neohesperidin dihydrochalcone by human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem.* 53, 1782-90

**Braune A, Gutschow M, Engst W, Blaut M. (2001)** Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol.* 67, 5558-67.

**Brodie C, Blumberg PM. (2003)** Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis.* 8, 19-27

**Bruce WR, Giacca A, Medline A. (2000)** Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9, 1271-9

**Buchner K. (2000)** The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. *J Cancer Res Clin Oncol.* 126, 1-11

**Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999)** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15, 269-90

## C

**Calliste CA, Le Bail JC, Trouillas P, Pouget C et al. (2001)** Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. *Anticancer Research.* 21, 3949-3956

**Caponigro F, French RC, Kaye SB. (1997)** Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anticancer Drugs.* 8, 26-33

- Carnesecchi S**, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gosse F, Raul F. (2002) Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett.* 175, 147-55
- Carpenter**, G., King, L. J. and Cohen, S. (1978) Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations *in vitro*. *Nature* (London) 276, 409–410
- Casagrande F**, Darbon JM. (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol.* 61, 1205-15
- Cassidy A.** (2003) Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *Int J Vitam Nutr Res.* 73, 120-6
- Cerda SR**, Bissonnette M, Scaglione-Sewell B, Lyons MR, Khare S, Mustafi R, Brasitus TA. (2001) PKC-delta inhibits anchorage-dependent and -independent growth, enhances differentiation, and increases apoptosis in CaCo-2 cells. *Gastroenterology.* 120, 1700-12
- Cesaro P**, Raiteri E, Demoz M, Castino R, Baccino FM, Bonelli G, Isidoro C. (2001) Expression of protein kinase C beta1 confers resistance to TNFalpha- and paclitaxel-induced apoptosis in HT-29 colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 93, 179-84
- Chan WH**, Yu JS, Yang SD. (2000) Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem J.* 351, 221-32
- Chen YC**, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. (1999) Inhibition of TPA-induced protein kinase C and transcription activator protein-1 binding activities by theaflavin-3,3'-digallate from black tea in NIH3T3 cells. *J Agric Food Chem.* 47, 1416-21
- Chen RH**, Ding WV, McCormick F. (2000) Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 275, 17894-9
- Chen C**, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. (2003) Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 24, 1369-78
- Chen YC**, Shen SC, Chow JM, Ko CH, Tseng SW. (2004) Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol.* 25, 661-70
- Chinnici F**, Gaiani A, Natali N, Riponi C, Galassi S. (2004) Improved HPLC determination of phenolic compounds in cv. golden delicious apples using a monolithic column. *J Agric Food Chem.* 52, 3-7

- Choi JA**, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. (2001) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol.* 19, 837-44
- Chtarbova S**, Müller O. (2003) Eine Frage zu Krebs? Die Antworten weiß nur der Wnt Signalweg. *Biospektrum*, 12, 701-704
- Chung JY**, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS. (2001) Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J.* 15, 2022-4
- Clark JA**, Black AR, Leontieva OV, Frey MR, Pysz MA, Kunneva L, Woloszynska-Read A, Roy D, Black JD. (2004) Involvement of the ERK signaling cascade in protein kinase C-mediated cell cycle arrest in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 279, 9233-47
- Cobb**, MH, Goldsmith, E. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 14843-14846
- Cohen GM.** (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326, :1-16
- Cohen P**, Frame S. (2001) The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 769–776
- Cory S**, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2, 647-56
- Cos P**, Hermans N, Calomme M, Maes L, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D (2003) Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. *J Pharm Pharmacol.* 55, 1291-7
- Couteau D**, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, Faulds CB. (2001) Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol.* 90, 873-81
- Crespy V**, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. (2001) Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J Nutr.* 131, 3227-30
- Crompton M.** (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341, 233-49
- Cross AJ**, Sinha R. (2004) Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen.* 44, 44-55
- Cross D.** (2001) Assays for glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Methods Mol Biol.* 124,147-59
- Cryns V**, Yuan J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* 12, 1551-70

**Cunningham D**, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 351, 337-45

## D

**Da Silva J**, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Erdtmann B. (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol.* 40, 941-7

**Dashwood WM**, Carter O, Al-Fageeh M, Li Q, Dashwood RH. (2005) Lysosomal trafficking of beta-catenin induced by the tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Mutat Res.* 591, 161-72

**Dashwood WM**, Orner GA, Dashwood RH. (2002) Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 584-8

**Daub H**, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 16, 7032-44

**Davidson LA**, Brown RE, Chang WC, Morris JS, Wang N, Carroll RJ, Turner ND, Lupton JR, Chapkin RS. (2000) Morphodensitometric analysis of protein kinase C beta(II) expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis.* 21, 1513-9

**Dawson JP**, Berger MB, Lin CC, Schlessinger J, Lemmon MA, Ferguson KM. (2005) Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol.* 25, 7734-42

**Day AJ**, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med.* 29, 1234-43

**Day AJ**, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res.* 35, 941-52

**Debatin KM.** (2004) Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 53, 153-9

- Dekker** LV, Parker PJ. (1994) Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* Feb;19(2):73-7
- Del Pozo-Insfran** D, Percival SS, Talcott ST. (2006) Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. *J Agric Food Chem.* 54, 1222-9
- Dell'Agli** M, Galli GV, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E (2005) In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J Agric Food Chem.* 53:1960-5
- Dempsey** EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279, 429-38
- Depeint** F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT. (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc.* 61, 97-103.
- Deprez** S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. (2001) Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal.* 3, 957-67
- Dhillon** AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W. (2002) Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol.* 22, 3237-46
- Ding** VW, Chen RH, McCormick F. (2000) Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem.* 275, 32475-81
- Djahansouzi** S, Hanstein B, Bender H, Dall G. (2004) Wachstumsfördernde. Signalübertragungswege. Rezeptorblockaden als Therapieprinzip. *Gynäkologie*, 37, 215-220
- Doble** BW, Woodgett JR.(2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 116, 1175-86
- Doi** S, Goldstein D, Hug H, Weinstein IB. (1994) Expression of multiple isoforms of protein kinase C in normal human colon mucosa and colon tumors and decreased levels of protein kinase C beta and eta mRNAs in the tumors. *Mol Carcinog.* 11, 197-203
- DuPont** MS, Bennett RN, Mellon FA, Williamson G. (2002) Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *J Nutr.* 132, 172-5
- Duraj** J, Zazrivcova K, Bodo J, Sulikova M, Sedlak J. (2005) Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma.* 52, 273-9

**Dutil** EM, Newton AC. (2000) Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J Biol Chem.* 275, 10697-701

## E

**Eberhardt** MV, Lee CY, Liu RH. (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 405, 903-4.

**Embi** N, Rylatt DB, Cohen P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 107, 519-27

**Endo** K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, Datta R. (2000) Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J Biol Chem.* 275, 18476-81

**English** DR, MacInnis RJ, Hodge AM, Hopper JL, Haydon AM, Giles GG. (2004) Red meat, chicken, and fish consumption and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13, 1509-14

**Escarpa** A, Gonzalez MC. (1998) High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A.* 823, 331-7

## F

**Fähndrich** C. (2005) Wirkung von Apfelsaft auf die Kolonkarzinogenese im Tierexperiment und deren Modulation durch Wachstumsfaktoren, Dissertation, Hannover, Tierärztliche Hochschule

**Fan** YX, Wong L, Johnson GR. (2005) EGFR kinase possesses a broad specificity for ErbB phosphorylation sites and ligand increases turnover number without affecting substrate binding affinity. *Biochem J.* [Epub ahead of print ]

**Fearnhead** NS, Britton MP, Bodmer WF. (2001) The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 10, 721-33

**Fearon** ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61, 759-67

- Ferguson** PJ, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ. (2004) A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J Nutr.* 134, 1529-35
- Ferri** KF, Kroemer G. (2000) Control of apoptotic DNA degradation. *Nat Cell Biol.* 2, 63-4
- Ferriola** PC, Cody V, Middleton E Jr (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 38, 1617-24.
- Feskanich** D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, Colditz GA. (2000) Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst.* 92, 1812-23
- Fiol** CJ, Williams JS, Chou CH, Wang QM, Roach PJ, Andrisani OM. (1994) A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem.* 269, 32187-93
- Fleischhut** J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr.* 45, 7-18 Epub 2005 Apr 18
- Fodde**, R. (2002) The APC gene in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer.* 38, 867–871.
- Frame** S, Cohen P, Biondi RM. (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell.* 7, 1321-7
- Fraser** E, Young N, Dajani R, Franca-Koh J, Ryves J, Williams RS, Yeo M, Webster MT, Richardson C, Smalley MJ, Pearl LH, Harwood A, Dale TC. (2002) Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.* 277, 2176-85
- Frattini** M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA. (2004) Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 10, 4015-21
- Fritz** J, Kern M, Pahlke G, Vatter S, Marko D. (2006) Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 390-395
- Fujii** T, Garcia-Bermejo ML, Bernabo JL, Caamano J, Ohba M, Kuroki T, Li L, Yuspa SH, Kazanietz MG. (2000) Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. *J Biol Chem.* 275, 7574-82

**Fumarola C**, Guidotti GG. (2004) Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*. 9, 77-82

## G

**Gamet-Payrastre L**, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastre B. (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol*. 32, 279-86

**Gao K**, Xu A, Krul C, Venema K, Liu Y, Niu Y, Lu J, Bensoussan L, Seeram NP, Heber D, Henning SM. (2006) Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J Nutr*. 136, 52-7

**Garrett TP**, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*. 110, 763-73

**Gazit A**, Osherov N, Posner I, Yaish P et al. (1991) Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substitutedbenzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J. Med. Chem*. 34, 1896-907

**Gazit A**, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. (1989) Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem*. 32, 2344-52

**Gee JM**, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr*. 130, 2765-71

**GEKID**, Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends (2006)

**Giard DJ**, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 51, 1417-23

**Gokmen-Polar Y**, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP. (2001) Elevated protein kinase C betaII is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 61, 1375-81

**Gonthier MP**, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. (2003) Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med*. 35, 837-44



- Gonthier** MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, Scalbert A. (2003) Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr.* 133, 1853-9
- Goode** N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. (1992) Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.* 267, 16878-16882
- Gosse** F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, Raul F. (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 26, 1291-5
- Gould** TD, Manji HK. (2002) The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist.* 8, 497-511
- Graefe** EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol.* 41, 492-9
- Greenwald** P, Milner JA, Clifford CK. (2000) Creating a new paradigm in nutrition research within the National Cancer Institute. *J Nutr.* 130, 3103-5
- Gu** L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. (2003) Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem.* 51, 7513-21
- Guillem** JG, Hsieh LL, O'Toole KM, Forde KA, LoGerfo P, Weinstein IB. (1988) Changes in expression of oncogenes and endogenous retroviral-like sequences during colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 48, 3964-71
- Gullick** WJ. (2001) The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer.* 8, 75-82
- Gupta** K, Panda D. (2002) Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry.* 41, 13029-38
- Gutcher** I, Webb PR, Anderson NG. (2003) The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci.* 60, 1061-70
- Guyot** S, Marnet N, Sanoner P, Drilleau JF. (2003) Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J Agric Food Chem.* 51, 6240-7

## H

**Habermeyer M, Fritz J, Barthelmes HU, Christensen MO, Larsen MK, Boege F, Marko D. (2005)** Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem Res Toxicol.* 18, 1395-404

**Hagemann C, Rapp UR. (1999)** Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res.* 253, 34-46

**Hagiwara A, Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Shirai T, Ito N. (1991)** Forestomach and kidney carcinogenicity of caffeic acid in F344 rats and C57BL/6N x C3H/HeN F1 mice. *Cancer Res.* 51, 5655-60

**Hagiwara M, Inoue S, Tanaka T, Nunoki K et al. (1998)** Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem. Pharmacol.* 37, 2987-92

**Half E, Broaddus R, Danenberg KD, Danenberg PV, Ayers GD, Sinicrope FA. (2004)** HER-2 receptor expression, localization, and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer.* 108, 540-8

**Harborne JB, Williams CA. (2001)** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.* 18, 310-33

**Harborne JB. (1986)** Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res.* 213, 15-24

Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol.* 8, 573-81

**Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC. (2001)** Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci.* 21, 2247-55

**Hecht A, Litterst CM, Huber O, Kemler R. (1999)** Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem.* 274, 18017-25

**Hecker D. (2005)** Einfluss von Apfelsaftinhaltsstoffen auf die Zellzyklusverteilung, Forschungsarbeit, TU Kaiserslautern

**Hengartner MO. (2000)** The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407, 770-6

- Hengst**, Ludger (2003) Regulation der Zellproliferation, [www.mpg.de/bilderBerichte\\_Dokumente/dokumentation/jahrbuch/2003/biochemie/forschungsSchwerpunkt2/pdf.pdf](http://www.mpg.de/bilderBerichte_Dokumente/dokumentation/jahrbuch/2003/biochemie/forschungsSchwerpunkt2/pdf.pdf)
- Henson** GL, Niemeyer L, Ansong G, Forkner R, Makkar HP, Hagerman AE. (2004) A modified method for determining protein binding capacity of plant polyphenolics using radiolabelled protein. *Phytochem Anal.* 15, 159-63
- Herrmann** K. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 28, 315-47
- Hertog** MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 342, 1007-11
- Herzog** A, Kuntz S, Daniel H, Wenzel U. (2004) Identification of biomarkers for the initiation of apoptosis in human preneoplastic colonocytes by proteome analysis. *Int J Cancer.* 109, 220-9
- Hilger** RA, Scheulen ME, Strumberg D. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie.* 25, 511-8
- Ho** PK, Hawkins CJ. (2005) Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 272, 5436-53
- Hoessel** R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L. (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol.* 1, 60-7
- Hollman** PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res.* 31, 569-73
- Hollman** PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 62, 1276-82
- Hollman** PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 418, 152-6
- Holt** RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. (2002) Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr.* 76, 798-804

**Hou DX. (2003)** Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med.* 3, 149-59

**Houlston RS (2001)** What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 54, 206-14

**Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, Speizer FE, Giovannucci E. (1999)** Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 91, 542–547

**Hudson EA, Dinh PA, Kokubun T, Simmonds MS, Gescher A. (2000)** Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 1163-70

**Hug H. (2000)** Apoptose: Die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit* 30, 128 - 135

**Hughes K, Ramakrishna S, Benjamin WB, Woodgett JR. (1992)** Identification of multifunctional ATP-citrate lyase kinase as the alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3. *Biochem J.* 288, 309-14

**Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre JV. (2003)** Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 278, 29317-26

**Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. (2005)** Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer.* 113, 660-9

**Hyun JW, Chung HS. (2004)** Cyanidin and Malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. *J Agric Food Chem.* 52, 2213-7

## I/J

**Jacobs EJ, Connell CJ, Chao A, McCullough ML, Rodriguez C, Thun MJ, Calle EE. (2003)** Multivitamin use and colorectal cancer incidence in a US cohort: does timing matter? *Am J Epidemiol.* 158, 621-8

**Jo JY, Gonzalez de Mejia E, Lila MA. (2006)** Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II by interactions of grape cell culture polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*  
Published on web 02/16/2006

**Jones** DJ, Lamb JH, Verschoyle RD, Howells LM, Butterworth M, Lim CK, Ferry D, Farmer PB, Gescher AJ. (2004) Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity. *Br J Cancer*. 91, 1213-9

**Joneson** T, Fulton JA, Volle DJ, Chaika OV, Bar-Sagi D, Lewis RE (1998) Kinase suppressor of Ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated Ras, and Ras effectors. *J Biol Chem*. 273, 7743-8

**Jope** RS. (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci*. 24, 441-3

**Jungck** M. (2000) [Hereditary carcinoma: pathogenesis and diagnosis] *Zentralbl Chir*. 125, 8-11

**Justesen** U, Knuthsen P, Leth T. (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 799, 101-10

## K

**Kahkonen** MP, Heinonen M. (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem*. 51, 628-33

**Kahkonen** MP, Hopia AI, Heinonen M. (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 49, 4076-82

**Kahkonen** MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 47, 3954-62

**Kahle** K, Kraus M, Scheppach W, Richling E. (2005) Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Mol Nutr Food Res*. 49, 1143-50

**Kaldas** MI, Walle UK, van der Woude H, McMillan JM, Walle T. (2005) Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *J Agric Food Chem*. 53, 4194-7

**Kampa** M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, **Kouimtoglou** E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. (2004) Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*. 6, 63-74

- Kanduc** D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol.* 21, 165-70
- Kang** TB, Liang NC. (1997) Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 54, 1013-8
- Karnes** WE Jr, Weller SG, Adjei PN, Kottke TJ et al. (1998) Inhibition of epidermal growth factor receptor kinase induces protease-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Gastroenterology.* 114, 930-9
- Kawamori** T, Tanaka T, Kojima T, Suzui M, Ohnishi M, Mori H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn J Cancer Res.* 85, 686-91
- Keppler** K, Humpf HU. (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem.* 13, 5195-205
- Kern** M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D. (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res.* 49, 317-28
- Kim** HS, Lee JW, Soung YH, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Jeong SW, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. (2003) Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 125, 708-15
- Kim** WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, Park JH (2005) Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr Biochem.* 16:155-62.
- Kinzler**, KW. and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170
- Kishida** M, Hino Si, Michiue T, Yamamoto H, Kishida S, Fukui A, Asashima M, Kikuchi A. (2001) Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon *J Biol Chem.* ;276, 33147-55
- Knekt** P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 312, 478-81
- Knekt** P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellovaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol.* 146, 223-30

- Knekt P**, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 76, 560-8
- Kobori M**, Iwashita K, Shinmoto H, Tsushida T. (1999) Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63, 719-25
- Koivunen J**, Aaltonen V, Peltonen J. (2006) Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters.* 235, 1-10
- Kolch W**, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 364, 249-52
- Kolligs FT**, Bommer G, Goke B. (2002) Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion.* 66, 131-44
- Koriyama H**, Kouchi Z, Umeda T, Saido TC, Momoi T, Ishiura S, Suzuki K. (1999) Proteolytic activation of protein kinase C delta and epsilon by caspase-3 in U937 cells during chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Cell Signal.* 11, 831-8
- Kosuge S**, Sawano Y, Ohtsuki K. (2003) A novel CK2-mediated activation of type II cAMP-dependent protein kinase through specific phosphorylation of its regulatory subunit (RIIalpha) in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 310, 163-8
- Kozikowski AP**, Tuckmantel W, Bottcher G, Romanczyk LJ Jr. (2003) Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4.(1) Synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4beta,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. *J Org Chem.* 68, 1641-58
- Kraus G.** (2003) Biochemistry of signal transduction and regulation. 3<sup>rd</sup> Edition, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Krystof V**, Lenobel R, Havlicek L, Kuzma M, Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg Med Chem Lett.* 12, 3283-6
- Kuhnle G**, Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, Hahn U. (2000) Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 277, 507-12
- Kuo SM.** (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 110, 41-8

**Kuppusamy** UR, Das NP (1992) Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1307-1315

**Kuranami** M, Powell CT, Hug H, Zeng Z, Cohen AM, Guillem JG. (1995) Differential expression of protein kinase C isoforms in human colorectal cancers. *J Surg Res.* 58, :233-9

## L

**Lakenbrink** C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. (2000) Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem.* 48, 2848-52

**Lapidot** T, Walker MD, Kanner J. (2002) Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem.* 50, 3156-60

**Larsson** SC, Giovannucci E, Wolk A. (2005) Diabetes and colorectal cancer incidence in the cohort of Swedish men. *Diabetes Care.* 28,1805-7

**Layfield** LJ, Bernard PS, Goldstein NS. (2003) Color multiplex polymerase chain reaction for quantitative analysis of epidermal growth factor receptor genes in colorectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 83, 227-31

**Lazze** MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, Stivala LA, Bianchi L. (2004) Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis.* 25, 1427-33

**Le Good** JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281, 2042-5

**Le Marchand** L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92, 154-60

**Leclerc** S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer L. (2001) Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol Chem.* 276, 251-60

**Lee** KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 51, 6516-20.



- Lee** LT, Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Nair MP, Kanadaswam C, Lee MT. (2002) Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.* 22, 1615-27
- Lee** SF, Lin JK. (1997) Inhibitory effects of phytopolyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells. *Nutr Cancer.* 28, 177-83
- Lemmon** MA, Ladbury JE, Mandiyan V, Zhou M, Schlessinger J. (1994) Independent binding of peptide ligands to the SH2 and SH3 domains of Grb2. *J Biol Chem.* 269, 31653-8
- Lepourcelet** M, Shivdasani RA. (2002) Characterization of a novel mammalian Groucho isoform and its role in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 277, 47732-40
- Leverrier** S, Vallentin A, Joubert D. (2002) Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis. *Biochem J.* 368, 905-13
- Levites** Y, Amit T, Youdim MB, Mandel S. (2002) Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J. Biol. Chem.* 277, 30574-80
- Levy** MF, Pocsidio J, Guillem JG, Forde K, LoGerfo P, Weinstein IB. (1993) Decreased levels of protein kinase C enzyme activity and protein kinase C mRNA in primary colon tumors. *Dis Colon Rectum.* 36, 913-21
- Lewis** AE, Susarla R, Wong BC, Langman MJ, Eggo MC. (2005) Protein kinase C delta is not activated by caspase-3 and its inhibition is sufficient to induce apoptosis in the colon cancer line, COLO 205. *Cell Signal.* 17, 253-62
- Liang** YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. (1999) Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem.* 75, 1-12
- Limburg** PJ, Anderson KE, Johnson TW, Jacobs DR Jr, Lazovich D, Hong CP, Nicodemus KK, Folsom AR. (2005) Diabetes mellitus and subsite-specific colorectal cancer risks in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14, 133-137
- Lin** JK. (2002) Cancer chemoprevention by tea polyphenols through modulating signal transduction pathways. *Arch. Pharm. Res.* 25, 561-571
- Lin** YT, Hsiu SL, Hou YC, Chen HY, Chao PD. (2003) Degradation of flavonoid aglycones by rabbit, rat and human fecal flora. *Biol Pharm Bull.* 26, 747-51

**Lin, X., O'Mahony, A., Mu, Y., Geleziunas, R., and Greene, W.C. (2000)** Protein kinase C-theta participates in NF-kappaB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IkappaB kinase beta. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2933-2940

**Linassier C, Pierre M, Le Pecq JB, Pierre J. (1990)** Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. *Biochem Pharmacol.* 39, 187-9

**Lindl T. (2001)** Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählter Methoden und Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag

**Liu RH, Sun J. (2003)** Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *J Agric Food Chem.* 51, 1718-23

**Long LH, Clement MV, Halliwell B. (2000)** Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun.* 273, 50-3

**Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA. (1997)** Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol Cell Biol.* 17, 3418

**Lustig B, Behrens J. (2003)** The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol.* 129, 199-221

**Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. (2004)** Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 350, 2129-39

## M

**Magnelli L, Chiarugi V. (1997)** Regulation of p53 by protein kinase C during multi-stage carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 123, 365-9

**Mamot C, Drummond DC, Greiser U, Hong K, Kirpotin DB, Marks JD, Park JW. (2003)** Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 63, 3154-61

**Mamot C, Rochlitz CF. (2005)** Iressa, Tarceva und Erbitux-Medikamente einer neuen Generation. *Schweiz Med. Forum.* 5, 475-479

- Manach C**, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, Regerat F, Remesy C. (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr.* 125, 1911-22
- Manach C**, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79, 727-47
- Manach C**, Texier O, Morand C, Crespy V, Regerat F, Demigne C, Remesy C. (1999) Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med.* 27, 1259-66
- Mandil R**, Ashkenazi E, Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Rosenthal G, Umansky F, Lorenzo PS, Blumberg PM, Brodie C. (2001) Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.* 61, 4612-9
- Marko D**, Pahlke G, Merz KH, Eisenbrand G (2000) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases: potential targets for anticancer therapy. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 944-948
- Marko D**, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G. (2004) The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol Nutr Food Res.* 48, 318-25
- Mason CS**, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 18, 2137-48
- Masuda M**, Suzui M, Weinstein IB. (2001) Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 7, 4220-9
- Matsukawa Y**, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. (2003) Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.* 53, 1328-31
- McGhie TK**, Hunt M, Barnett LE. (2005) Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *J Agric Food Chem.* 53, 3065-70
- McManus EJ**, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR. (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J.* 24, 1571-83

- Meiers S**, Kemeny M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D. (2001) The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem.* 49, 958-62
- Mellor H**, Parker PJ. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 332, 281-92
- Mennen LI**, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr.* 81, 326-329
- Merz KH**, Schwahn S, Hippe F, Muhlbeier S, Jakobs S, Eisenbrand G. (2004) Novel indirubin derivatives, promising anti-tumor agents inhibiting cyclin-dependent kinases. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 42, 656-8
- Miyake Y**, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinoshita N, Osawa T. (2000) Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *J Agric Food Chem.* 48, 3217-24
- Mochly-Rosen D.** (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268, 247-251.
- Moon JH**, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. (2001) Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med.* 30, 1274-85
- Moon SK**, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, Madamanchi NR, Kim CH. (2003) Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun.* 301, 1069-78
- Moorghen M**, Ince P, Finney KJ, Watson AJ, Harris AL. (1990) Epidermal growth factor receptors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 10, 605-11
- Morand C**, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol.* 275, 212-9
- Moridani MY**, Scobie H, Jamshidzadeh A, Salehi P, O'Brien PJ. (2001) Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab Dispos.* 29, 1432-9
- Moriki T**, Maruyama H, Maruyama IN. (2001) Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol.* 311, 1011-26
- Morin PJ**, Vogelstein B, Kinzler KW. (1996) Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 7950-7954.

**Morre DJ, Bridge A, Wu LY, Morre DM. (2000)** Preferential inhibition by (-)-epigallocatechin-3-gallate of the cell surface NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Biochem Pharmacol.* 60, 937-46

**Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC. (2002)** Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem.* 81, 1073-83

**Murray NR, Davidson LA, Chapkin RS, Clay Gustafson W, Schattenberg DG, Fields AP. (1999)** Overexpression of protein kinase C betaII induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *J Cell Biol.* 145, 699-711

## N

**Nakamura Y, Torikai K, Ohto Y, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. (2000)** A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis.* 21, 1899-907

**Natella F, Belevi F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C. (2002)** Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J Agric Food Chem.* 50, 7720-5

**Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J. (2003)** Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med.* 34, 840-9

**Newton AC. (1995)** Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270, 28495-8

**Newton AC. (2003)** The ins and outs of protein kinase C. *Methods Mol Biol.* 233, 3-7

**Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT et al. (2004)** The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 25, 647-59

**Nguyen A, Chen P, Cai H. (2004)** Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Lett.* 57, 307-13

**Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. (2005)** Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer.* 114, 513-21

**Nikaido** T, Ohmoto T, Kinoshita T, Sankawa U, Delle Monache F, Botta B, Tomimori T, Miyaichi Y, Shirataki Y, Yokoe I et al. (1989) Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. III. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37, 1392-1395

**Nioche** P, Liu WQ, Broutin I, Charbonnier F, Latreille MT, Vidal M, Roques B, Garbay C, Ducruix A. (2002) Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor. *J Mol Biol.* 315, 1167-77

**Nomoto** H, Iigo M, Hamada H, Kojima S, Tsuda H. (2004) Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutr Cancer.* 49, 81-8

**Nomura** M, Kaji A, He Z, Ma WY, Miyamoto K, Yang CS, Dong Z. (2001) Inhibitory mechanisms of tea polyphenols on the ultraviolet B-activated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 276, 46624-31

**Norat** T, Bingham S, Ferrari P, et al. (2005) Meat, Fish, and Colorectal Cancer Risk: *The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition J Natl Cancer Inst.* 97, 906 - 916

**Novak** A, Dedhar S. (1999) Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci.* 56, 523-37

**Nussher** A. (2005) Modulation von Signalkettenelementen der mitogen aktivierbaren Proteinkinase-Kaskade durch ausgewählte Flavonoide sowie deren postulierte Abbauprodukte, Diplomarbeit, TU Kaiserslautern

## O

**Ogiso** H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* 110, 775-87

**Ohno** T, Inoue M, Ogihara Y. (2001) Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P-815. *Anticancer Res.* 21, 3875-80

**Olayioye** MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159-67

**O'Leary** KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res.* 551, 245-54

**Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. (2003)** Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr.* 133, 1806-14

**Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. (2001)** Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* 131, 66-71

**Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. (2000)** Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr.* 130, 1200-3

**Ong CS, Tran E, Nguyen TT, Ong CK, Lee SK, Lee JJ, Ng CP, Leong C, Huynh H. (2004)** Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep.* 11, 727-33

**Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. (1999)** E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci.* 112, 1237-45

**Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. (2002)** Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1602, 73-87

**Osherov N, Gazit A, Gilon C, Levitzki A. (1993)** Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrosinostins. *J Biol Chem.* 268, 11134-42

**Osherov N, Levitzki A. (1994)** Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem.* 225, 1047-53

**Ougolkov A, Zhang B, Yamashita K, Bilim V, Mai M, Fuchs SY, Minamoto T. (2004)** Associations among beta-TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, beta-catenin, and NF-kappaB in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 96, 1161-70

**Oving IM, Clevers HC. (2002)** Molecular causes of colon cancer. *Eur J Clin Invest.* 32, 448-57

## **P**

**Paglioni G, Caceres A. (2001)** The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development. *Eur J Biochem.* 268, 1528-33

**Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. (2005)** Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 328, 227-34

- Park HY, Wu H, Killoran CE, Gilchrest BA. (2004)** The receptor for activated C-kinase-I (RACK-I) anchors activated PKC-beta on melanosomes. *J Cell Sci.* 117, 3659-68
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005)** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55, 74-108
- Parra JL, Buxade M, Proud CG. (2005)** Features of the catalytic domains and C termini of the MAPK signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine their differing activities and regulatory properties. *J Biol Chem.* 280, 37623-33
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001)** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22, 153-83
- Peters HD. (2003)** Neue Substanzen und neue Wirkprinzipien in der Onkologie. *Der Onkologe*, 9, 1058-1087
- Pettersson F, Couture MC, Hanna N, Miller WH. (2004)** Enhanced retinoid-induced apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells by PKC inhibitors involves activation of ERK. *Oncogene.* 23, 7053-66
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. (1999)** Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci.* 20, 171-8
- Pietta PG. (2000)** Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63, 1035-42
- Plo I, Hernandez H, Kohlhagen G, Lautier D, Pommier Y, Laurent G. (2002)** Overexpression of the atypical protein kinase C zeta reduces topoisomerase II catalytic activity, cleavable complexes formation, and drug-induced cytotoxicity in monocytic U937 leukemia cells. *J Biol Chem.* 277, 31407-15
- Polakis P. (2000)** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837-51
- Pool-Zobel BL, van Loo J, Rowland I, Roberfroid MB. (2002)** Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr.* 87, 273-81
- Pool-Zobel BL. (2005)** Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr.* 93, S73-90.
- Potter JD. (1999)** Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 91, 916-32



## Q/R

- Quadrilatero** J, Hoffman-Goetz L. (2003) Physical activity and colon cancer. A systematic review of potential mechanisms. *J Sports Med Phys Fitness*. 43, 121-38
- Quest** AF, Bardes ES, Bell RM. (1994) A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. High affinity binding to a glutathione-S-transferase/Cys2 fusion protein. *J Biol Chem*. 269, 2953-60
- Rafter** J, Govers M, Martel P, Pannemans D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Rowland I, Tuijtelaars S, van Loo J. (2004) PASSCLAIM--diet-related cancer. *Eur J Nutr*. 43, II47-II84
- Ramos** S, Alia M, Bravo L, Goya L. (2005) Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem*. 53, 1271-80
- Ranelletti** FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Rumi C, Piantelli M. (1992) Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer*. 50, 486-92
- Rechner** AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med*. 33, 220-35
- Rechner** AR, Pannala AS, Rice-Evans CA. (2001) Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free Radic Res*. 35, 195-202
- Reyland** ME, Anderson SM, Matassa AA, Barzen KA, Quissell DO. (1999) Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells. *J Biol Chem*. 274, 19115-23
- Richter** M, Ebermann R, Marian B. (1999) Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. *Nutr. Cancer*. 34, 88-99
- Rios** LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr*. 76, 1106-10
- Robbins** DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, Cobb MH. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem*. 268, 5097-106
- Robinson** DR, Wu YM, Lin SF. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 19, 5548-57

**Ron**, D. and Kazanietz, M. G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13, 1658 -1676

**Roura** E, Andres-Lacueva C, Jauregui O, Badia E, Estruch R, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventos RM. (2005) Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans. *J Agric Food Chem.* 53, 6190-4

**Royette** CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. (2004) n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr.* 23, 139-51

**Russo** M, Palumbo R, Mupo A, Tosto M, Iacomino G, Scognamiglio A, Tedesco I, Galano G, Russo GL. (2005) Flavonoid quercetin sensitizes a CD95-resistant cell line to apoptosis by activating protein kinase Calpha. *Oncogene.* 22, 3330-42

**Ruvolo** PP, Deng X, Carr BK, May WS. (1998) A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem.* 273, 25436-42

**Ryves** WJ, Harwood AJ. (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 280, 720-5

## S

**Sachse** C, Smith G, Wilkie MJ, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop DT, Wolf CR. (2002) Colorectal Cancer Study Group. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 23, 1839-49

**Sah** JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. (2004) Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J Biol Chem.* 279, 12755-62

**Sakanoue** Y, Hatada T, Kusunoki M, Yanagi H, Yamamura T, Utsunomiya J. (1991) Protein kinase C activity as marker for colorectal cancer. *Int J Cancer.* 48, 803-6

**Sakihama** Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 177, 67-80

**Salucci** M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R, Vannini V. (2002) Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *Br J Cancer.* 86:1645-51

- Sampson L**, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. (2002) Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* 102, 1414-20
- Sano A**, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M. (2003) Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67, 1140-3
- Sarni-Manchado P**, Cheynier V, Moutounet M. (1999) Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J Agric Food Chem.* 47, 42-7
- Scalbert A**, Deprez S, Mila I, Albrecht AM, Huneau JF, Rabot S. (2000) Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors.* 13, 115-20
- Scalbert A**, Mila I, Expert D, Marmolle F, Albrecht AM, Hurrell R, Huneau JF, Tome D. (1999) Polyphenols, metal ion complexation and biological consequences. *Basic Life Sci.* 66, 545-54
- Scalbert A**, Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 130, 2073S-85S
- Schaefer S**, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C. (2006) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 50, 24-33
- Schieber A**, Keller P, Carle R. (2001) Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 910, 265-73
- Schoefer L**, Mohan R, Schwiertz A, Braune A, Blaut M. (2003) Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl Environ Microbiol.* 69, 5849-54
- Schoen RE**, Tangen CM, Kuller LH, Burke GL, Cushman M, Tracy RP, Dobs A, Savage PJ. (1999) Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1147-1154
- Schulze-Osthoff K**, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 254, 439-59
- Seeram NP**, Bourquin LD, Nair MG. (2001) Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agric Food Chem.* 49, 4924-9.
- Seeram NP**, Zhang Y, Nair MG. (2003) Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr. Cancer.* 46, 101-6
- Seki T**, Matsubayashi H, Amano T, Shirai Y, Saito N, Sakai N. (2005) Phosphorylation of PKC activation loop plays an important role in receptor-mediated translocation of PKC. *Genes Cells.* 10, 225-39

- Sesso** HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. (2003) Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr.* 77, 1400-8
- Shapiro** PS, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froelich-Ammon SJ, Garcia M, Osheroff N, Ahn NG. (1999) Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 19, 3551-60
- Shaw** M, Cohen P. (1999) Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 461, 120-4
- Shen** SC, Chen YC, Hsu FL, Lee WR. (2003) Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. *J Cell Biochem.* 89, 1044-55
- Sherr** CJ. (1996) Cancer cell cycles. *Science.* 274, 1672-7
- Shibusawa** Y, Yanagida A, Ito A, Ichihashi K, Shindo H, Ito Y. (2001) High-speed counter-current chromatography of apple procyanidins. *J Chromatogr A.* 886, 65-73.
- Shih** PH, Yeh CT, Yen GC. (2005) Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol.* 43, 1557-66
- Shoji** T, Masumoto S, Moriichi N, Akiyama H, Kanda T, Ohtake Y, Goda Y. (2006) Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 54, 884-92
- Silver** SJ, Chen F, Doyon L, Zink AW, Rebay I. (2004) New class of Son-of-sevenless (Sos) alleles highlights the complexities of Sos function. *Genesis.* 39, 263-72
- Sinha** R, Peters U, Cross AJ, Kulldorff M, Weissfeld JL, Pinsky PF, Rothman N, Hayes RB. (2005) Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res.* 65, 8034-41
- Skehan** P, Storeng R, Scudiero D, Monks . et al. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-12
- Sodhi** A, Sethi G. (2005) Role of protein kinase Cdelta in UV-B-induced apoptosis of macrophages in vitro. *Cell Signal.* 17, 377-83
- Soh** JW, Weinstein IB. (2003) Roles of specific isoforms of protein kinase C in the transcriptional control of cyclin D1 and related genes. *J Biol Chem.* 278, 34709-16

- Soh, JW.**, Lee, EH., Prywes, R., Weinstein, IB. (1999) Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1313–1324
- Sondermann, H.**; Soisson, S.; Boykevisch, S.; Yang, S.; Bar-Sagi, D.; Kuriyan, J. (2004) Structural Analysis of Autoinhibition in the Ras Activator Son of Sevenless. *Cell.* 119, 393-405
- Spencer JP**, Kuhnle GG, Williams RJ, Rice-Evans C. (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J.* 372, 173-81
- Spencer JP**, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. (2001) Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid Redox Signal.* 3, 1023-39
- Statistisches Bundesamt**, (2003), <http://www.destatis.de>
- Stern DF.** (2003) ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res.* 284, 89-98
- Stone WL**, Krishnan K, Campbell SE, Qui M, Whaley SG, Yang H. (2004) Tocopherols and the treatment of colon cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1031, 223-33
- Strate LL**, Syngal S. (2005) Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control.* 16, 201-13
- Strick R**, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. (2000) Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 4790-5
- Suarez B**, Palacios N, Fraga N, Rodriguez R. (2005) Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection. *J Chromatogr A.* 1066, 105-10
- Sutton RB**, Sprang SR. (1998) Structure of the protein kinase C beta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca<sup>2+</sup>. *Structure.* 6, 1395-405
- Szewczuk LM**, Penning TM. (2004) Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure-activity relationship study. *J Nat Prod.* 67, 1777-82.

## T

**Tacconi S**, Perri R, Balestrieri E, Grelli S, Bernardini S, Annichiarico R, Mastino A, Caltagirone C, Macchi B. (2004) Increased caspase activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 190, 254-62

**Talanian RV**, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem*. 272, 9677-82

**Tamai K**, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*. 407, 530-5

**Tamai K**, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. (2004) A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*. 13, 149-56

**Tan X**, Hu D, Li S, Han Y, Zhang Y, Zhou D. (2000) Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells. *Cancer Lett*. 158, 1-6

**Tan X**, Hu D, Li S, Han Y, Zhang Y, Zhou D. (2004) Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells. *Cancer Lett*. 158, 1-6

**Tawa P**, Hell K, Giroux A, Grimm E, Han Y, Nicholson DW, Xanthoudakis S. (2004) Catalytic activity of caspase-3 is required for its degradation: stabilization of the active complex by synthetic inhibitors. *Cell Death Differ*. 11, 439-47

**Thiel G**, Rössler O. (2005) Rezeptor-Tyrosinkinase und intrazelluläre Signalkaskaden: Signaltransduktion. *Biol. Unserer Zeit*, 5, 312-319

**Thielen C**, Wil, F, Zacharias J, Dietrich H, Jacob H. (2004): Verteilung von Polyphenolen im Apfel und Vergleich der Frucht mit Apfelsaft. *Deutsch. Lebensm. Rundsch*. 100, 389-398.

**Tomas-Barberan FA**, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. (2001) HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J Agric Food Chem*. 49, 4748-60

**Toullec D**, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*. 266, 15771-81

**Tsao R**, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S. (2005) Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J Agric Food Chem*. 53, 4989-95

**Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. (2003)** Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem.* 51, 6347-53

**Tuhackova Z, Sloncova E, Hlavacek J, Sovova V, Velek, J. (1999)** Activity of glycogen synthase kinase-3beta is down-regulated during transient differentiation of human colon cancer HT-29 cells. *Oncol Rep.* 6, 827-32

**Tyagi A, Agarwal R, Agarwal C. (2003)** Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis. *Oncogene.* 22, 1302-16

## U/V

**Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. (1996)** Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem.* 271, 23512-9

**Uesato S, Kitagawa Y, Kamishimoto M, Kumagai A, et al. (2002)** Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett.* 17, 41-4

**Vacaresse N, Vieira O, Robbesyn F, Jurgens G, Salvayre R, Negre-Salvayre A. (2001)** Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *Br J Pharmacol.* 132, 1777-88

**Valet G. (2003)** Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents.* 17, 213-22

**Van Acker SA, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJ. (1998)** Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 56, 935-43

**Van Amelsvoort JM, Van Hof KH, Mathot JN, Mulder TP, Wiersma A, Tijburg LB. (2001)** Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica.* 31, 891-901

**Van Cruchten S, Van Den Broeck W. (2002)** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 31, 214-23

**Van der Sluis AA, Dekker M, Skrede G, Jongen WM. (2002)** Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *J Agric Food Chem.* 50, 7211-9

- Van der Sluis AA**, Dekker M, Skrede G, Jongen WM. (2004) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 2. Effect of novel production methods. *J Agric Food Chem.* 52, 2840-8
- Van Erk MJ**, Roepman P, van der Lende TR, Stierum RH, Aarts JM, van Bladeren PJ, van Ommen B. (2005) Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *Eur J Nutr.* 44, 143-56
- Van Rossum GS**, Klooster R, van den Bosch H, Verkleij AJ, Boonstra J. (2001) Phosphorylation of p42/44(MAPK) by various signal transduction pathways activates cytosolic phospholipase A(2) to variable degrees. *J Biol Chem.* 276, 28976-83
- Varadkar P**, Dubey P, Krishna M, Verma N. (2001) Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics. *J Radiol Prot.* 21, 361-70
- Varesco L.** (2004) Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. *Tech Coloproctol.* 8, 305-8
- Vasen HF.** (2005) Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer.* 4, 219-25
- Vayalil PK**, Mittal A, Katiyar SK. (2004) Proanthocyanidins from grape seeds inhibit expression of matrix metalloproteinases in human prostate carcinoma cells, which is associated with the inhibition of activation of MAPK and NF kappa B. *Carcinogenesis.* 25, 987-95
- Veeriah S**, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL. (2005) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog.* 45, 164-174 [Epub ahead of print]
- Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie**, <http://www.fruchtsaft.net>
- Verstovsek G**, Byrd A, Frey MR, Petrelli NJ, Black JD. (1998) Colonocyte differentiation is associated with increased expression and altered distribution of protein kinase C isozymes. *Gastroenterology.* 115, 75-85
- Vinson JA**, Liang X, Proch J, Hontz BA, Dancel J, Sandone N. (2002) Polyphenol antioxidants in citrus juices: in vitro and in vivo studies relevant to heart disease. *Adv Exp Med Biol.* 505, 113-22
- Vinson JA**, Proch J, Bose P. (2001) Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods Enzymol.* 335, 103-14



**Von Kleist S**, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J. (1975) Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst.* 55, 555-60

## W

**Walgren RA**, Karnaky KJ Jr, Lindenmayer GE, Walle T. (2000) Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 294, 830-6

**Walle T**, Otake Y, Walle UK, Wilson FA. (2000) Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J Nutr.* 130, 2658-61

**Wang CZ**, Fishbein A, Aung HH, Mehendale SR, Chang WT, Xie JT, Li J, Yuan CS. (2005) Polyphenol contents in grape-seed extracts correlate with antipica effects in Cisplatin-treated rats. *J Altern Complement* 11, 1059-65

**Wang W**, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. (2000) Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog.* 28, 102-10

**Wang Y**, Prywes R. (2000) Activation of the c-fos enhancer by the erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and p62TCF sites. *Oncogene.* 19, 1379-85

**Watzl B**, Rechkemmer G. (2001) Flavonoide. *Ernährungs-Umschau*, 12, 499-503

**Watzl B**, Rechkemmer G. (2001) Phenolcarbonsäuren. *Ernährungs-Umschau*, 10, 413-418

**Watzl B**, Briviba K, Rechkemmer G. (2002) Anthocyane, *Ernährungs-Umschau*, 49, 148-150

**Webb MR**, Ebeler SE. (2004) Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. *Biochem J.* 384, 527-41

**Weisel T**, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Kulling S, Rüfer C, Johannes Ch, Janzowski Ch (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidativ DNA damage an increases glutathion level in healthy probands. *Biotechnol J.* 1, 388-397

**Wells A.** (1999) EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 31, 637-43

- Welsh** GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT, Proud CG. (1998) Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett.* 421, 125-30
- Welsh** GI, Patel JC, Proud CG. (1997) Peptide substrates suitable for assaying glycogen synthase kinase-3 in crude cell extracts. *Anal Biochem.* 244, 16-21.
- Welsh** GI, Proud CG. (1993) Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J.* 294, 625-9
- Wenzel** U, Herzog A, Kuntz S, Daniel H. (2004) Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics.* 4, 2160-74
- Will** F, Bauckhage K, Dietrich H: (2000) Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. *Eur Food Res Technol.* 211, 291-297
- Willett** WC. (1995) Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect.* 103, 165-70
- Williams** RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 36, 838-49
- Witte** JS, Longnecker MP, Bird CL, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. (1996) Relation of vegetable, fruit, and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *Am J Epidemiol.* 144, 1015-25
- Wolfe** K, Wu X, Liu RH. (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.* 51, 609-14
- Wolfram** S, Block M, Ader P. (2002) Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr.* 132, 630-5
- World Cancer Research Fund** (1997) American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. *Washington: American Institute for Cancer Research*

**X/Y/Z**

**Xia X**, Lin JT, Kinne RK. (2003) Binding of phlorizin to the isolated C-terminal extramembranous loop of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter assessed by intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry*. 42, 6115-20

**Yanez J**, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-Garcia O, Canteras M, Teruel JA. (2004) Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr Cancer*. 49, 191-9

**Yang EB**, Guo YJ, Zhang K, Chen YZ, Mack P. (2001) Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochim Biophys Acta*. 1550, 144-52

**Yang EB**, Zhang K, Cheng LY, Mack P. (1998) Butein, a specific protein tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 435-8

**Yang JH**, Hsia TC, Kuo HM, Chao PD, Chou CC, Wei YH, Chung JG. (2006) Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metab Dispos*. 34, 296-304

**Yarden Y**, Sliwkowski MX. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2, 127-37

**Yeh CT**, Huang SM, Yen GC. (2005) Induction of phenolsulfotransferase expression by phenolic acids in human hepatoma HepG2 cells. *J Agric Food Chem*. 53, 4766-73

**Yeh CT**, Yen GC. (2003) Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 51, 1474-9

**Yoshida M**, Yamamoto M, Nikaido T. (1992) Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res*. 52, 6676-81

**Yoshioka K**, Kataoka T, Hayashi T, Hasegawa M, Ishi Y, Hibasami H. (2000) Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncol Rep*. 7:1221-3.

**Yoshizumi M**, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, Terao J, Tamaki T. (2002) Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 293, 1458-65

**Zapor L**. (2004) Toxicity of some phenolic derivatives--in vitro studies. *Int J Occup Saf Ergon*. 10, 319-31

**Zhang** F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS. (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem.* 278, 33067-77

**Zhang** L, Shimizu S, Tsujimoto Y. (2005) Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an antitumor drug D609. *Oncogene.* 24, 2954-62

**Zhang** M, Zhang JP, Ji HT, Wang JS, Qian DH. (2000) Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* 2, 253-6

**Zheng** Q, Hirose Y, Yoshimi N, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Sakata K, Matsumoto Y, Sayama Y, Mori H. (2002) Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 128, 539-46

## **8 Anhangsverzeichnis**

<b>8.1</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>I</b>
<b>8.2</b>	<b>Dank</b>	<b>IV</b>
<b>8.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>VI</b>

## 8.1 Publikationsliste

### Veröffentlichungen

- **Kern, M.**; Tjaden, Z.; Ngiewih, Y.; Puppel, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Pahlke, G.; Marko, D. (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res*, Apr; 49(4):317-28.
- Fritz, J., **Kern, M.**, Pahlke, G., Vatter, S. and Marko, D. (2006) Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin *Mol Nutr Food Res*, 50, 390-395
- **Kern, M.**, Nussler, A., Tjaden, Z., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G. and Marko, D. Impact of flavonoid degradation products on cellular signaling cascades involving in the growth of human colon carcinoma cells, *Mol. Nutr. Food Res.* (submitted)
- **Kern, M.**, Pahlke, P., Ngiewih, Y. and Marko, D. Modulation of key elements of the Wnt pathway by apple polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7041-7046.
- Pahlke, P., Ngiewih, Y., **Kern, M.**, Jakobs, S., Marko, D. and Eisenbrand, G. Impact of quercetin and EGCG on key elements of the Wnt pathway in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7075-7082.

### Posterbeiträge

- GDCh-Jahrestagung Chemie 2003 in München, 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag 7.10.-10.10.2003, **M. Kern**, G. Pahlke N. Puppel, F. Will<sup>#</sup>, H. Dietrich<sup>#</sup>, H. Becker und D. Marko, Modulation der Protein Kinase C in humanen Kolontumorzellen durch Lebensmittelinhaltsstoffe
- 1st International Conference on Polyphenols and Health, 18. - 21. November 2003, Vichy (Frankreich), **M. Kern**, G. Pahlke, N. Puppel, F. Will<sup>#</sup>, H. Dietrich<sup>#</sup>, H. Becker\* und D. Marko, Modulation of protein kinase C (PKC) activity in human colon cells by polyphenol-rich apple juice extract

- 12<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, 25 – 28.08.04, Helsinki (Finland)  
**Melanie Kern**, Zeina Tjaden, Yufanyi Ngiewih, Nicole Puppel, Frank Will, Helmut Dietrich, Gudrun Pahlke and Doris Marko, Apple polyphenols as inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR)
  
- GDCh-Jahrestagung Chemie 2004 in Bonn, 33 deutscher Lebensmittelchemikertag  
13.9.-15.09.2004, **Melanie Kern**, Zeina Tjaden, Yufanyi Ngiewih, Nicole Puppel,  
Frank Will, Helmut Dietrich, Gudrun Pahlke and Doris Marko, Hemmstoffe des epi-  
dermalen Wachstumsfaktorrezeptors in Apfelsaftextrakt.
  
- 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII in Hamburg, 19.-  
23.09.2005
  - Vatter, S., **Kern, M.**, Habermeyer, M., Holbach, P., Nussler, A., Fritz, J.,  
Schlichter, A, Jakobs, S., Puppel, N., Pahlke, G. and Marko, D. Multiple  
cellular effects of the red wine constituent malvidin
  
  - **Kern, M.**, Nussler, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G. and Marko, D. The  
degradation of flavonoids is associated with a loss of biological activity
  
  - Ngiewih, Y., **Kern, M.**, Schreiner, V., Jakobs, S., Pahlke, G., Marko, D. and  
Eisenbrand, G. Quercetin as a modulator of the Wnt-signalling in human colon  
cells (proceedings)
  
- 25th Anniversary Chair of Food Chemistry, in Würzburg 14th October 2005
  - **Kern, M.**, Vatter, S., Habermeyer, M., Fritz, J., Jakobs, S., Puppel, N., Pahlke,  
G. and Marko, D. Biological activity of malvidin, a red wine constituent
  
  - **Melanie Kern**, Zeina Tjaden, Gudrun Pahlke, Doris Marko, Apple  
constituents and the control of tumour cell growth

- LChG: Regionalverband Südwest: Jahrestagung in Karlsruhe 06.-07.03.06
  - Fridrich, D., **Kern, M.** und Marko, D. Procyanidine als Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR)
  - Ngiewih, Y., **Kern, M.**, Pahlke, G., Jakobs, S., Marko, D. and Eisenbrand, G. Modulation von Elementen des Wnt-Signalweges durch Lebensmittelinhaltsstoffe

### Diskussionsbeiträge

- LChG: Regionalverband Südwest: Jahrestagung in Frankfurt 07.-08.03.05, **Kern, M.**, Tjaden, Z., Pahlke, G., Ngiewih, Y, Will, F., Dietrich, H. und Marko, D., Hemmung des Wachstums humaner Kolonkarzinomzellen durch polyphenolreichen Apfelsaftextrakt
- 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII in Hamburg, 19.-23.09.2005, **Kern, M.**, Pahlke, G. und Marko, D. Prävention von Kolonkarzinomen durch Apfelinhaltsstoffe. *Lebensmittelchemie*. 2006, Vol 60:9
- LChG: Regionalverband Südwest: Jahrestagung in Karlsruhe 06.-07.03.06; **Kern, M.**, Pahlke, G. und Marko, D. Modulation von Signalelementen des Wnt-Signalweges durch Apfelpolyphenole



## 8.2 Dank

Mein erster Dank gilt Doris. Danke, dass Du mich auf dem manchmal steinigen Weg bis zum erfolgreichen Abschluss der Promotion begleitet hast. Gerne werde ich mich auch an die „private“ Doris und an viele lustige und arbeitsklimafördernde Stunden erinnern.

Nochmals danken möchte ich Hr. Prof. Eisenbrand für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Besonderen Dank gilt meinen „Korrekturleserinnen“: Dr. Monika Kemény, Dr. Sandra Vatter, Dr. Gudrun Pahlke, Jessica Fritz und Diana Fridrich.

Danke schön, Hr. Prof. Dietrich (Geisenheim), Dr. F. Will (Geisenheim), Hr. Prof. Becker *em.* (Saarbrücken) und Dr. H. Zeßner (Saarbrücken, jetzt Sanofi-Aventis, Frankfurt) für die Bereitstellung der Testsubstanzen. Hr. Prof. Stallmach (Homburg/Saar, jetzt Jena) für die Bereitstellung des Biopsiematerials.

Einen herzlichen Dank widme ich meiner Diplomandin Anja Nussler, meinen Forschungspraktikantinnen Anja Nussler und Dorothe Hecker für ihre tolle Arbeiten sowie unserer ehemaligen Technikerin Zeina Tjaden, die, trotz ihrer Vorliebe für warme Tage, unzählige Stunden im Kühlraum für die Entstehung der EGFR-Daten dieser Arbeit verbringen musste.

Danke an alle nach Karlsruhe gezogenen und natürlich auch allen Neuen im AK Marko; Jessica Fritz, Diana Fridrich, Nicole Puppel, Matthias Roth, Markus Fehr, Ute Böttler, Nicole Teller, Sarah Elschenbroich und Dr. Gudrun Pahlke, das Arbeiten mit Euch macht wirklich Spaß.

Vielen herzlichen Dank an die Leute vom Gebäude 56, Dr. Michael Habermeyer, Dr. Sandra Jakobs, Dr. Monika Kemény und Dr. Sandra Vatter, die Zeit mit Euch war spitze. Seid stolz, da ohne Euch, solch eine Arbeit nicht entstanden wäre.

Auch ein Dankeschön an die Mannschaft aus Karlsruhe, die uns so nett aufgenommen hat: „Leute ihr seid Klasse!“

Danken möchte ich den ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern vom Arbeitskreis von Prof. Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Sandra Schäfer, für die unzähligen gemeinsamen Stunden während des gesamten Studiums.

Meinen allerliebsten Freuden, Sandra, Jessi, Michael und Petra möchte für einfach alles danken.

Dank an alle von „Rince tir na N’Og“, vor allem Mary, Sandra, Stephi und Vilma, für den tollen Ausgleich neben dem Promotionsstress. Besonderer Dank auch an Henny: „Schade, dass Du nicht mehr dabei bist!“

Meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat und ohne deren Unterstützung ich nie soweit gekommen wäre.

Zum Abschluss: Danke Tom und „Ich liebe Dich.“

### 8.3 Lebenslauf

#### **Persönliche Daten:**

Name: Melanie Kern

Wohnort: Kurt Schumacher Str. 26 A  
67663 Kaiserslautern

Geburtsdatum: 05.11.1976

Geburtsort: Bad Dürkheim

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

#### **Schulbildung:**

09/1983-07/1987 Albertine-Scherer-Schule, Grundschule, Birkenheide

09/1987-07/1992 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Bad Dürkheim

09/1992-06/1997 Trifels-Gymnasium, Annweiler

21.06.1997 Allgemeine Hochschulreife

#### **Studium:**

10/1997-03/2002 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern

14.10.1999 Staatliche Zwischenprüfung

01/2001-04/2001 Forschungspraktikum in der Fachrichtung Biochemie der Universität Murcia/Spanien

- 13.09.2001 Erste Staatsprüfung
- 10/2001-03/2002 Diplomarbeit an der Universität Kaiserslautern im Fachbereich Chemie in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie mit dem Thema „Untersuchungen zur PDE1- und PDE4-Expression in ZNS Tumorzellen“
- 30.03.2002 Abschluss des Studiengangs Diplom Lebensmittelchemie und erste Staatsprüfung
- 01/2003-03/2005 Promotionsarbeit im Arbeitskreis von Frau PD Dr. D. Marko an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Molekulare Ernährungsforschung
- 04/2005-03/2006 Fortsetzung der Promotionsarbeit im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. D. Marko am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie an der Universität Karlsruhe (TH)

**Aktivitäten an der Hochschule:**

- 04/2000-10/2000 Studentische Hilfskraft bei der Hochschulverwaltung, Abteilung PR und Marketing, Betreuung des Universitätsstandes auf der Landesgartenschau in Kaiserslautern
- 11/2001-12/2001 Arbeit als studentische Hilfskraft im Fortgeschrittenenpraktikum Lebensmittelchemie
- 05/2002-12/2002 Arbeit als Hilfswissenschaftler im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie: „Einfluss von Indirubinen auf die GSK3 $\beta$ -Aktivität und auf das Wachstum von humanen embryonalen Nierenzellen.“
- 2003/2005 Mitarbeiterin bei der Neuauflage des Römpp-Chemielexikons (Thieme Verlag): Toxikologische Bewertung einzelner Lexikoneinträge.