

Einfluss von Polyphenolen auf Schlüsselemente wachstumsassoziierter Signalkaskaden in humanen Kolonkarzinomzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Diana Fridrich

aus Bottrop in Westfalen

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referentin: Prof. Dr. Doris Marko
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler
Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2008

Für die kleine Mia

Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens
endet nicht mit einem Schlusspunkt,
sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse

1	Einleitung	6
2	Stand der Forschung	7
2.1	Kanzerogenese	7
2.2	Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	8
2.2.1	Struktur des EGFR	8
2.2.2	Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung	10
2.2.3	Nachgeschaltete Signalwege	13
2.2.4	Endozytose	15
2.2.5	Überexpression des EGFR in Karzinomen	16
2.2.6	Hemmstoffe des EGFR	16
2.3	DNA-Methylierung	18
2.3.1	DNA-Methyltransferasen (DNMT)	19
2.3.2	Mechanismus der DNA-Methylierung durch Methyltransferasen	20
2.3.3	Genregulation	22
2.3.4	Hypermethylierung	23
2.3.5	Hypomethylierung	23
2.3.6	Inhibitoren der DNA-Methylierung	24
2.3.7	Das Tumorsuppressorgen p16 ^{INK4a}	25
2.4	Polyphenole	28
2.4.1	Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate	28
2.4.2	Flavonoide	33
2.5	Flavonoidabbau durch die mikrobielle Darmflora	48
2.6	Bildung von Wasserstoffperoxid unter Zellkulturbedingungen	51
3	Problemstellung	53
4	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Ellagannine	55
4.1.1	Modulation der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen durch Ellagannine	55
4.1.2	Diskussion Ellagannine	61
4.2	Procyanidine	63
4.2.1	Einfluss von Procyanidinen auf die Aktivität des isolierten EGFR.....	64
4.2.2	Modulation der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen durch Procyanidine	66
4.2.3	Diskussion Procyanidine	67
4.3	Zelluläre Wirkmechanismen von Apfelextrakten <i>in vitro</i>	70
4.3.1	Bildung von Wasserstoffperoxid durch Apfelextrakte unter Zellkulturbedingungen.....	70
4.3.2	Hemmung des Zellwachstums (SRB-Test) durch Apfelextrakte.....	72
4.3.3	Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die Aktivität des isolierten EGFR.....	76
4.3.4	Modulation der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen durch Apfelextrakte	78
4.3.5	Einfluss von Quercetinglykosiden auf die EGFR-Aktivität im zellfreien und zellulären Testsystem..	85
4.3.6	Diskussion Apfelextrakte	87
4.4	Aktivitätsgeleitete Fraktionierung des AE04	91
4.5	Modulation der DNA-Methylierung durch Apfeltresterextrakt	98
4.5.1	Methylierungsspezifische PCR und Transkriptionsanalyse des p16 ^{INK4a} -Gens	98
4.5.2	Diskussion p16 ^{INK4a} -Gen	102
4.6	Flavonoidabbauprodukte durch die mikrobielle Darmflora	105
4.6.1	Hemmung des Zellwachstums (SRB-Test)	105
4.6.2	Diskussion	110
4.7	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse	113
5	Zusammenfassung	123
6	Methoden	126

6.1	Apfelextrakte	126
6.1.1	Apfelsaftextrakt AE02	126
6.1.2	Apfeltrestereextrakt AE03B	128
6.1.3	Apfelsaftextrakt AE04	128
6.1.4	Fraktionierung des AE04	128
6.1.5	Apfelsaftextrakt AE05	133
6.1.6	Sortenreine Apfelsaftextrakte	133
6.2	Zellkultur	135
6.2.1	Zelllinien	135
6.2.2	Kultivierung von Monolayern	135
6.3	Proteinbestimmung nach Bradford	139
6.4	Bestimmung der Proteintyrosinkinase(PTK)-Aktivität des EGFR	140
6.4.1	Kultivierung der Zellen	140
6.4.2	Isolierung des EGFR	140
6.4.3	Aufreinigung des EGFR	141
6.4.4	Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Substrat	142
6.4.5	Bestimmung der PTK-Aktivität der EGFR-Fraktionen	143
6.4.6	Aktivitätsuntersuchungen der EGFR-assoziierten PTK-Aktivität (EGFR-ELISA)	143
6.5	Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Zellkulturmedium	146
6.5.1	Kultivierung der Zellen	146
6.5.2	Durchführung	146
6.6	Untersuchung der Wachstumshemmung (SRB-Test)	147
6.6.1	Kultivierung der Zellen	147
6.6.2	Durchführung	147
6.7	Untersuchung des EGFR-Phosphorylierungsstatus /-Gesamtproteingehaltes	148
6.7.1	Kultivierung und Inkubation der Zellen	148
6.7.2	Gewinnung der Zellproteine	148
6.7.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse	149
6.7.4	Proteintransfer und Antikörperdetektion	152
6.8	Untersuchung des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a}	154
6.8.1	Kultivierung und Inkubation der Zellen	154
6.8.2	Isolierung der genomischen DNA und der zellulären Gesamt-RNA	154
6.8.3	Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus	156
6.8.4	Transkriptionsanalyse des Tumorsuppressorgens p16 ^{INK4a}	162
6.9	Reagenzien und Chemikalien	166
6.10	Eingesetzte Substanzen und Inhibitoren	168
6.11	PCR-Bedarf	168
6.12	Antikörper	169
6.13	Geräte	169
7	Literaturverzeichnis	171
8	Anhang	186

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A431-Zellen	humane Vulvakarzinomzelllinie
ADP	Adenosindiphosphat
AE02, AE04, AE05	polyphenolreiche Apfelsaftextrakte
AE03B	polyphenolreicher Apfeltresterextrakt
AhR	Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor
AK	Antikörper
APE	Apfelextrakt aus Annurca Äpfeln
ARF	alternative reading frame (alternatives Leseraster)
AS	Aminosäure
ASC	Ascorbinsäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
5-Aza-CdR	5-Aza-2'-deoxycytidin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
^m C	methyliertes Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cbl	Drosophila und C. elegans Ortholog
CDK	cyclinabhängige Kinase
c-myc	Onkogen
CKI	cyclinabhängiger Kinaseinhibitor
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CR	Cystein-reiches Motiv
CRE	cAMP-responsives Element
CRE	cAMP-responsives Element bindendes Protein
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMH	Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EC	(-)-Epicatechin
E. coli	Escherischa coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E2F	Transkriptionsfaktor
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	Ethylenglykolessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Elk-1	Transkriptionsfaktor „Ets-like kinase“
eps8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinasen

Abkürzungsverzeichnis

FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
GIT	Gastrointestinaltrakt
Glu	Glutaminsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Adapterprotein (growth factor receptor-bound protein 2)
GTP	Guanosintriphosphat
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like factor
HDAC	Histondeacetylase
HPA	3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure
HT29-Zellen	humane Kolonkarzinomzelllinie
IC ₅₀ -Wert	Konzentration eines Hemmstoffes, der die Enzymaktivität bzw. das Zellwachstum um 50 % reduziert
IGF1R	insulinähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPH	Lactat-Phloridzin-Hydrolase
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	mitogenaktivierte Proteinkinasekinase
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne
MeCP2	Methyl-CpG-bindendes Protein
MEK1/2	MAPK/ERK-Kinasen
MEM	Minimum Essential Medium
MSP	methylierungsspezifische PCR
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
OG	Oligomerisierungsgrad
p16 ^{INK4a}	Inhibitor der cyclinabhängigen Kinase CDK4/6
PA2	Procyanidintetramer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB1-4	Procyanidindimere
PBS	phosphate buffered saline
PC1	Procyanidintrimer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	cAMP-hydrolysierende Phosphodiesterasen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PS	Penicillin/Streptomycin
PTB	Phosphotyrosinbindung
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
Q-3-gal	Quercetin-3-galaktosid, Hyperosid
Q-3-glc	Quercetin-3-glukosid, Isoquercitrin

Abkürzungsverzeichnis

Q-3-rha	Quercetin-3-rhamnosid, Quercitrin
Q-3-rut	Quercetin-3-rutinosid, Rutin
Raf	Serin-/Threoninkinase
Ras	Onkogen, GTP-abhängiges Schalterelement
Rb	Retinoblastomprotein
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SGLT	natriumabhängiger Glukosetransporter
SH1	Src-homologe Domäne 1 (Tyrosinkinasedomäne)
SH2	Src-homologe Domäne 2 (Tyrosinkinasedomäne)
Shp1	Proteintyrosinphosphatase
SOS	son of sevenless
SRB-Test	Sulforhodamin B Test
Sre	Serumresponsives Element
Src	Protein des humanen Homologs des Rous-Sarcoma-Virusonkogens
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
TGF- α	„transforming growth factor α “
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
VDF	Verband deutscher Fruchtsaftindustrie
VEGFR	vaskulär endotheler Wachstumsfaktorrezeptor
wnt	wingless Int1
X	beliebige Aminosäure

1 Einleitung

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Tumorentstehung wesentlich durch ungünstige Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten beeinflusst wird [Harvard Reports on Cancer Prevention, 1996]. In den westlichen Industrieländern sind etwa 1/3 aller Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückzuführen. Dabei stellt der kolorektale Tumor die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen und Männern dar. Im Besonderen scheinen bei kolorektalen Tumoren ernährungsbedingte Faktoren neben genetischer Disposition und Umwelteinflüssen von Relevanz zu sein. In weiten Teilen der Bevölkerung hat in den letzten Jahren das Gesundheitsbewusstsein stark zugenommen, so dass der Prävention von Tumorerkrankungen ein immer größerer Stellenwert zukommt. Demzufolge sind Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe mit chemopräventivem Potential von großem Interesse für die Entwicklung neuer Produkte auf dem Markt.

Grundsätzlich werden mit dem Verzehr pflanzlicher Lebensmittel und daraus hergestellter Produkte - wie z. B. Fruchtsäften – gesundheitlich positive Effekte verbunden. Der deutsche Durchschnittsverbraucher trinkt im Jahr ungefähr 40 Liter Fruchtsaft, wovon 12 Liter allein durch Apfelsaft konsumiert werden. Im Jahr 2005 wurden ca. 1,33 Mio. Tonnen Äpfel geerntet und 405 Mio. Liter Apfelsaft produziert [VDF, 2006]. Somit stellen Äpfel und daraus hergestellte Produkte einen bedeutenden Wirtschaftsfaktor dar. Bereits seit geraumer Zeit rücken Apfelpolyphenole hinsichtlich ihres gesundheitsfördernden Potentials in den Fokus der chemopräventiven Forschung. Hierbei sind die zellulären Wirkungen bislang aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Während der Tumorbildung kommt es häufig zu Veränderungen von Schlüsselementen zellulärer Signaltransduktionskaskaden. Einen dieser Signalwege stellt die mitogenaktivierte Proteinkinasekaskade dar, zu dessen Beginn der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) steht, der über nachgeschaltete Signalkettenelemente zur Regulation von Zellwachstum und Differenzierung führt. Weiterhin kommt es im Rahmen der Kanzerogenese häufig zu Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters proliferationsassoziiierter Gene. Die Hypermethylierung der Promotorregion des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} korreliert mit einem Verlust der Genexpression und der Tumorsuppressorfunktion.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Beeinflussung der EGFR-Aktivität durch Polyphenole unterschiedlicher Substanzklassen in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29. Ferner wurde überprüft, inwieweit eine Hemmung der EGFR-Aktivität durch Polyphenole auch zu einer nachgeschalteten Unterdrückung des Zellwachstums führt. In einer weiteren Fragestellung wurde der Einfluss von Apfelpolyphenolen auf den DNA-Methylierungsstatus und die Gentranskription des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} untersucht.

2 Stand der Forschung

2.1 Kanzerogenese

Eine fett- und kalorienreiche Ernährung verbunden mit einer geringen Aufnahme von Gemüse, Obst und Ballaststoffen wird als sogenannte „Westliche Ernährung“ bezeichnet. Assoziiert werden mit dieser Ernährungsweise zunehmend Fettleibigkeit, Diabetes, Bluthochdruck und kardiovaskuläre Erkrankungen. Weiterhin korrelieren diese Lebensgewohnheiten mit einem ansteigenden Risiko an einem kolorektalen Tumor zu erkranken. Obwohl der kolorektale Tumor mit einer hohen Sterblichkeit einhergeht, stellt er einen präventiv vermeidbaren Tumor dar [Takahashi et al., 2007].

Die Entstehung maligner Tumore wird als Mehrstufenprozess beschrieben (Abb. 1), wobei zahlreiche unabhängige genetische Veränderungen zur Ausbildung eines transformierten Phänotyps beitragen. Ein Kernmerkmal der Zellen während dieses Prozesses ist die zunehmende genetische Instabilität, gekennzeichnet durch somatische Mutationen der DNA und Brüche bzw. Verluste von Chromosomen. Weiterhin wird vermutet, dass sich eine erhöhte genetische Instabilität und die maligne Transformation wechselseitig begünstigen. Das wichtigste Charakteristikum von Tumorzellen ist jedoch ihr unkontrolliertes Wachstum und ihr fehlender programmierter Zelltod, die sogenannte Apoptose.

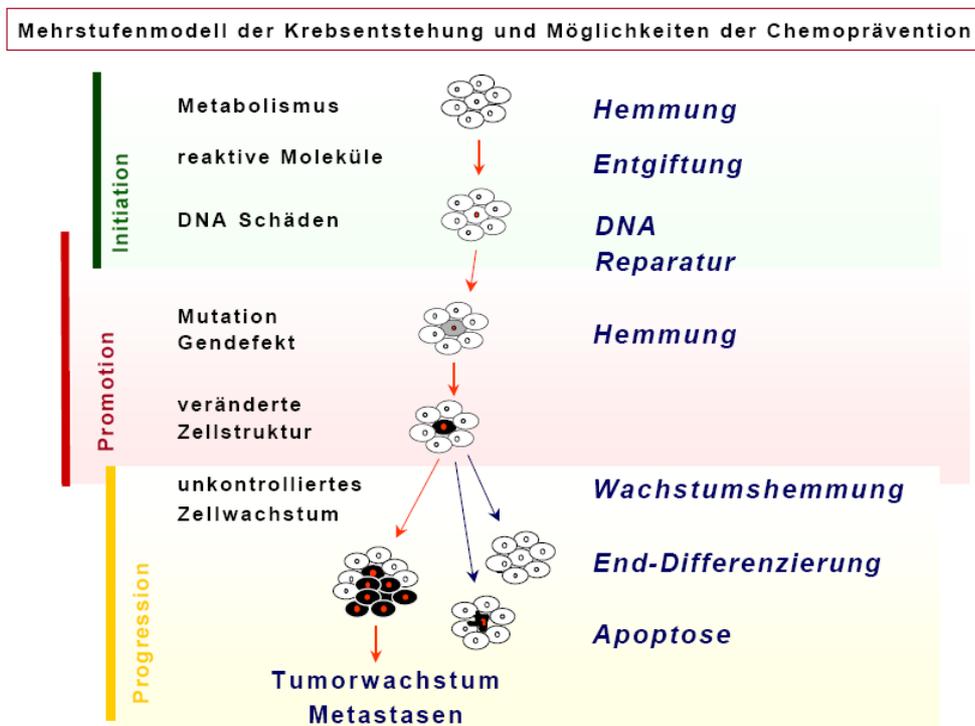


Abb. 1 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese [Gerhäuser, 2001]

Durch Veränderungen der DNA, die sich als Mutationen manifestieren (Initiation), durch Selektion und Vermehrung der mutierten Zellen (Promotion) sowie weiteren Mutationsereignissen (Progression) kommt es letztendlich zur Tumorbildung. Zelluläre Zielgene krebsauslösender Mutationen sind dabei vor allem Onkogene und Tumorsuppressorgene.

Nicht entartete Zellen werden durch die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen maligne. Das Genmuster der beteiligten Gene variiert dabei deutlich in den maligne entarteten Karzinomen. Onkogene können durch Mutationen wie z. B. in der Ras-Genfamilie konstitutiv aktiviert werden oder durch eine Genamplifikation (z. B. MYC, ein Transkriptionsfaktor) überexprimiert vorliegen und führen zur Stimulation der Zellproliferation. Tumorsuppressorgene können u. a. durch Genmutation in einem Allel inaktiviert werden, die während einer späteren Zellreplikation zum Verlust des intakten Allels führt [Baylin et al., 1998; Myohanen et al., 1998]. Somit kommt es letztendlich zum Verlust der Expression und zur Aufhebung der Tumorsuppressorfunktion [Esteller et al., 2002]. Tumorsuppressorgene sind häufig an DNA-Reparaturmechanismen und apoptoseinduzierenden Prozessen beteiligt, so dass durch ihren Ausfall die Tumorentwicklung begünstigt wird. Des Weiteren kommt es im Rahmen der Kanzerogenese auch zu einer aberranten Signalweiterleitung, die die Kommunikation innerhalb der Zelle und zwischen den Zellen erheblich beeinträchtigt.

2.2 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

2.2.1 Struktur des EGFR

Eine grundlegende Voraussetzung für alle biologischen Systeme ist die Fähigkeit der Signalübertragung extrazellulärer Stimuli in den intrazellulären Bereich. Im Besonderen vermitteln Oberflächenrezeptoren die Transduktion von extrazellulären Signalen und regulieren die Aktivität nachgeschalteter Signalkaskaden. Eine Gruppe von Oberflächenrezeptoren stellen die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) dar, die als „single-pass“ Transmembranproteine an diversen Zellprozessen wie Apoptose, Migration, Proliferation, Adhäsion und Differenzierung beteiligt sind [Yarden und Sliwkowski, 2001]. Als Transmembranproteine besitzen RTK eine extrazelluläre, ligandenbindende Domäne, eine Transmembranregion und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, deren Tyrosinkinaseaktivität den Transfer einer γ -Phosphatgruppe von ATP auf Tyrosinreste innerhalb der intrazellulären Domäne katalysiert [Jorisson et al., 2003]. Durch Ligandenbindung kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung von Rezeptoren, zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten und zur Aktivierung von nachgeschalteten Signalelementen [Iwamoto und Mekada, 2006]. Zu den ersten entdeckten und meist untersuchten RTK zählt der epidermale Wachstums-

faktorrezeptor (EGFR), dessen Untersuchung grundlegend zum Verständnis des Mechanismus und der Funktion von RTK beitrug [Carpenter et al., 1978].

Der EGFR gehört zur ErbB-Familie der RTK, die sich aus vier biologisch funktionell unterschiedlichen, aber strukturell ähnlichen Rezeptoren zusammensetzt: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4. Das humane EGFR-Gen ist auf Chromosom 7p11-13 lokalisiert und umfasst nahezu 200 kb der genomischen DNA [Wells, 1999]. Das Gen besteht aus 28 Exons und kodiert ein 170 kDa großes Glykoprotein, das sich aus einer extrazellulären Bindungsdomäne (Exon 1-16) und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne mit zytoplasmatischem Schweif zusammensetzt (Exon 18-28) [Salomon, 2004]. Diese beiden Domänen sind wiederum durch eine Transmembranregion (Exon 17) voneinander getrennt [Bazely und Gullick, 2005; Jorisson et al., 2003]. Die Struktur des aus insgesamt 1186 Aminosäuren (AS) aufgebauten Rezeptors ist in Abb. 2 schematisch dargestellt [Bazely und Gullick, 2005; Wells, 1999].

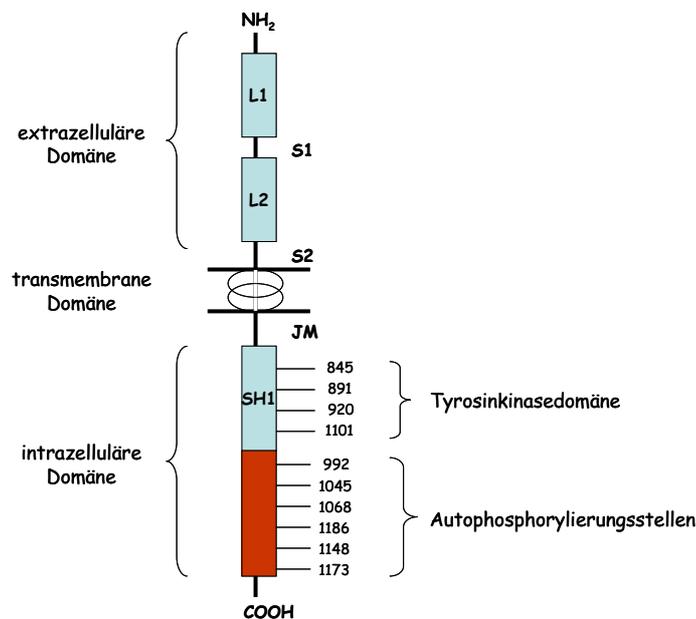


Abb. 2 Schematische Struktur des EGFR [modifiziert nach Bazely und Gullick, 2005; Wells, 1999] JM, Juxtamembranregion; L1, L2, Ligandenbindungsdomäne; S1, S2, cysteinreiche Domänen

Der glykosylierte, extrazelluläre Anteil des EGFR ist 622 AS groß und besteht aus vier Subdomänen, zwei ligandenbindenden (L1 und L2) und zwei weitestgehend homologen, cysteinreichen (S1 und S2) Subdomänen (Abb. 2) [Bazely und Gullick, 2005; Jorisson et al., 2003]. Innerhalb der S1 Domäne kommt es im Rahmen der Hetero- oder Homodimerisierung zum Kontakt der Rezeptoren [Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002]. Zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Domäne erstreckt sich die 22 AS große α -helikale, transmembrane Region. Die zytoplasmatische, intrazelluläre Domäne besteht aus 542 AS und kann wiederum in drei Regionen unterteilt werden (Abb. 2):

- die juxtamembrane Region (JM), die zahlreiche regulatorische Funktionen ausübt wie Rezeptorregulation und ligandenabhängige Internalisierung [Kil und Carlin, 2000]
- die Tyrosinkinasedomäne (SH1, src homolog 1), die den Transfer von γ -Phosphatgruppen katalysiert [Jorisson et al., 2003]
- die carboxyterminale regulatorische Domäne, die sechs spezifische Tyrosin enthaltende AS-Sequenzen aufweist, die nach Autophosphorylierung Bindungsstellen für Adapterproteine bereitstellen [Iwamoto und Mekada, 2006; Wells 1999]

Innerhalb der Familie der ErbB-Rezeptoren ist die Sequenz des EGFR im Vergleich zum ErbB2-Rezeptor zu 64 % und zum ErbB3-Rezeptor zu 53 % identisch [Jorisson et al, 2003]. Dabei scheint sich eine besonders starke Homologie in der Tyrosinkinasedomäne (59-81 %) widerzuspiegeln, während sich homologe Strukturen in der C-terminalen Domäne nur zu 12-30 % nachweisen lassen. Diese Heterogenität ist auf die Autophosphorylierungsstellen zurückzuführen, die für jedes Rezeptormitglied der ErbB-Familie spezifisch sind [Jorisson et al., 2003].

2.2.2 Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung

Die Signalweiterleitung durch den EGFR wird sowohl durch die Bindung spezifischer Liganden als auch durch die Rezeptordimerisierung reguliert [Yarden und Sliwkoski, 2001]. Bislang sind 12 spezifische Liganden, die alle eine dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnliche Sequenz von 45 bis 55 AS tragen, identifiziert worden [Nautiyal et al., 2006; Dawson et al., 2005]. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich sechs Cysteinreste, die drei intramolekulare Disulfidbrückenbindungen ausbilden [Yarden und Sliwkowski, 2001]. Abhängig von der Bindungsspezifität durch diese Region können die Liganden in drei Gruppen eingeteilt werden:

- EGF, Ampiregulin und TGF- α (transformierender Wachstumsfaktor α), die spezifisch an den EGFR binden
- Betacellulin, HB-EGF (heparinbindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor) und Epiregulin, die spezifisch für den EGFR und den ErbB4-Rezeptor sind
- Neureguline/Hereguline, die entweder an den ErbB3- und den ErbB4-Rezeptor oder nur an den ErbB4-Rezeptor binden können

Für den ErbB2-Rezeptor konnten bisher keine nativen Liganden identifiziert werden, so dass vermutet wird, dass dieser bevorzugt als Dimerisierungspartner für die Bildung von Heterodimeren agiert [Tzahar et al., 1996]. Durch Wechselwirkung zweier Rezeptoren kommt es zur Dimerisierung, dabei erfolgt der Kontakt über die Dimerisierungsschleife der cysteinreichen Domäne II (S1) [Dawson et al., 2005]. In Abwesenheit von Liganden liegen die Rezeptoren in ihrer monomeren, inaktiven Form vor. Die Dimerisierungsschleife befindet sich in diesem autoin-

hibierten Zustand in einer intramolekularen Tasche, die durch Interaktion mit der Domäne IV entsteht (Abb. 3A) [Dawson et al., 2005].

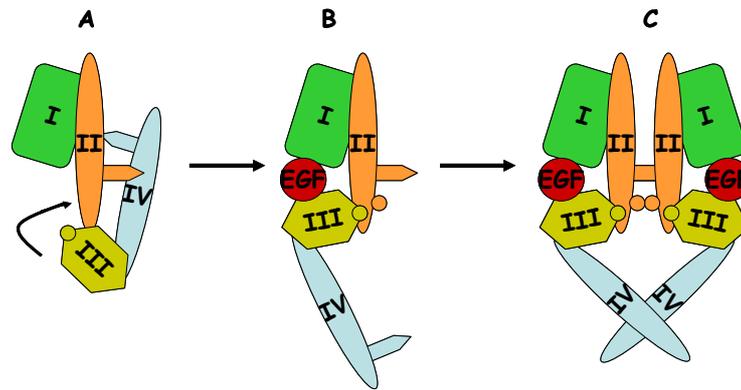


Abb. 3 Konformationsänderung der extrazellulären Domäne [Dawson et al., 2005] A) monomerer, autoinhibierter Zustand des Rezeptors; B) ligandengebundener Rezeptorkomplex; C) Rezeptordimerisierung; I und III, Ligandenbindungsdomänen; II und IV, cysteinreiche Domänen.

Kommt es zur Bindung eines spezifischen Ligandens (z. B. EGF) in die aus Domäne I (L1) und III (L2) gebildete Ligandenbindungstasche führt dies zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die Drehung von Domäne III an die Rückseite von Domäne II bewirkt weiterhin eine Stabilisierung des C-Terminus von Domäne II, wodurch die Dimerisierungsschleife freigelegt wird (Abb. 3B) [Dawson et al., 2005; Jorisson et al., 2003]. Zur Rezeptordimerisierung mit einem weiteren ligandengebundenen Rezeptorkomplex kommt es durch Interaktion der Dimerisierungsschleife auf der Rückseite von Domäne II des einen Rezeptors mit einer Tasche am Fuß der Dimerisierungsschleife des zweiten Rezeptors (Abb. 3C; Abb. 4) [Jorisson et al., 2003; Ogiso et al., 2002]. Weiterhin tragen van der Waals Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen entscheidend zur Rezeptordimerisierung bei [Bazley und Gullick, 2005]. Durch die Rezeptordimerisierung ist neben einer größeren Stabilität auch eine bessere Ligandenbindungsaffinität im Vergleich zu Rezeptormonomeren gewährleistet [Zhou et al., 1993; Ben-Levy et al., 1992].

Generell treten Heterodimere bevorzugt auf und erzeugen potentere Signale als Homodimere und diejenigen Heterodimere, die den ErbB2-Rezeptor als Dimerisierungspartner enthalten, zeigen eine höhere Ligandenbindungsaffinität und eine effizientere Signalweiterleitung im Vergleich zu Homo- und Heterodimeren ohne den ErbB2-Rezeptor [Yarden und Slikowski, 2001; Karunagaran et al., 1996]. Obwohl für den ErbB2-Rezeptor bisher keine nativen Liganden identifiziert werden konnten [Tzahar et al., 1996], ist der Rezeptor auch ohne Bindung eines Liganden in der Lage, mit den anderen ErbB-Rezeptoren Heterodimere auszubilden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die extrazelluläre Domäne eine Konformation besitzt, in der die Dimerisierungsschleife permanent exponiert zu sein scheint [Olayioye et al., 2000]. Der EGFR dimerisiert bevorzugt mit

dem ErbB2- und dem ErbB3-Rezeptor [Citri und Yarden, 2006]. Während jedoch das Heterodimer EGFR-ErbB2 durch EGF Bindung generiert wird [Pinkas-Kramarski et al., 1996], bildet sich das EGFR-ErbB3-Heterodimer in Gegenwart der Neureguline aus [Pinkas-Kramarski et al., 1998; Burden und Yarden, 1997; Tzahar et al., 1996].

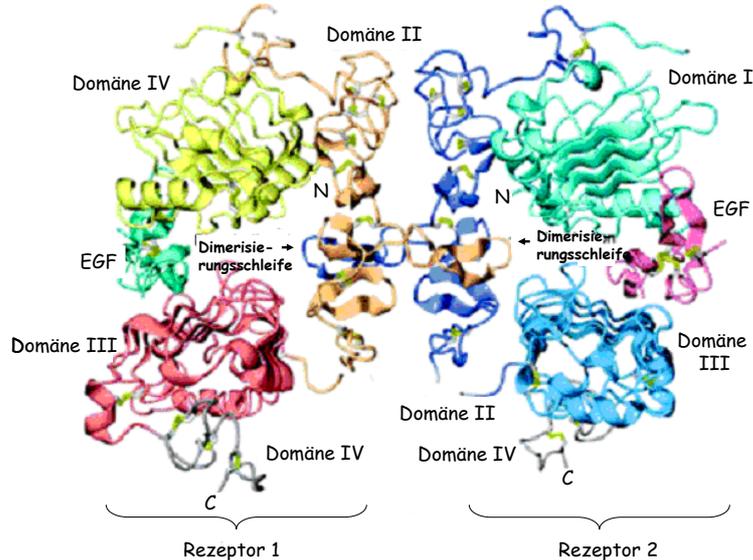


Abb. 4 Kristallstrukturanalyse eines EGFR Homodimers im Komplex mit zwei EGF-Liganden [Ogiso et al., 2002]. I und II, Ligandenbindungsdomäne; II und IV, cysteinreiche Domänen; N, N-terminales Ende; C, C-terminales Ende

Die Dimerisierung des EGFR bewirkt eine Autophosphorylierung von 3-6 spezifischen Tyrosinresten (Tyr992, Tyr1045, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148, Tyr1173) innerhalb der Aktivierungsschleife der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne des Dimerisierungspartners [Yarden und Slikowski, 2001]. Da es sich um eine bidirektionale, reziproke Phosphorylierung handelt, bietet es sich an statt von einer Autophosphorylierung von einer Transphosphorylierung zu sprechen. Die Transphosphorylierung der regulatorischen Tyrosinreste bewirkt wiederum eine Konformationsänderung der katalytischen Region der Tyrosinkinasedomäne [Jorisson et al., Cadena et al., 1994], wodurch Substratmoleküle (wie ATP) einen direkten Zugang zum aktiven Zentrum der PTK erhalten und die intrinsische PTK-Aktivität erhöht wird [Burgess et al., 2003; Schlessinger 2002]. Dies vermittelt einen Anstieg des enzymatischen Transfers von γ -Phosphatgruppen des ATP auf Hydroxygruppen der Tyrosinreste und leitet die nachgeschaltete MAPK-Kaskade ein. Erste Kristallstrukturuntersuchungen der Tyrosinkinasedomäne des EGFR weisen jedoch darauf hin, dass die katalytische Aktivität der PTK im Vergleich zu anderen RTK unabhängig von einer ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung zu sein scheint, da keine Konformationsänderung der katalytischen Domäne eintritt [Stamos et al., 2002]. Lee et al. (2006) vermuten, dass die Transphosphorylierung der C-terminalen Domäne nur eine Art Modulation der PTK-Aktivität darstellt, wobei der molekulare Mechanismus bisher noch unklar ist [Lee und Koland, 2005].

Die phosphorylierten Tyrosinreste der intrazellulären Domänen der Rezeptoren stellen wiederum spezifische Bindungsstellen für signalübertragende Proteine dar, die die Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zytoplasma und in den Zellkern vermitteln [Bazely und Gullick, 2005].

Dazu interagieren sogenannte Adapterproteine über phosphotyrosinbindende Domänen mit den phosphotyrosinhaltigen Motiven der Rezeptoren. Abhängig von der AS-Sequenz, die sich dem phosphorylierten Tyrosinrest anschließt, werden die Adapterproteine über eine SH2- oder eine PTB (phosphotyrosinbindende)-Domäne gebunden [Jorisson et al., 2003].

Die größere Gruppe der phosphotyrosinbindenden Domänen stellt die SH2-Struktur - Src homologe Domäne 2 - dar. Die zytosolische Tyrosinkinase Src ist das Protein des humanen Homologs des Rous-Sarcoma-Virusonkogens und phosphoryliert innerhalb der Tyrosinkinasedomäne des EGFR die Tyrosinreste Tyr891, Tyr 920, Tyr845 und Tyr1101 [Jorisson et al., 2003]. Bei SH2-Domänen ist die C-terminale Sequenz direkt nach dem Phosphotyrosinrest entscheidend für die Erkennung. Bevorzugte Sequenzen sind pTyr-Glu-X(Glu)-Ile. Zu den Adapterproteinen, die eine SH2-Domäne enthalten, gehört Grb2 (growth factor receptor bound protein, wachstumsfaktorgebundenes Protein), das mit dem aktivierten EGFR interagieren kann [Bazely und Gullick, 2005]. PTB-Domänen stellen eine weitere Gruppe phosphotyrosinbindender Domänen dar. PTB-Domänen kommen hauptsächlich in Adapterproteinen wie Shc („src homology/collagen“) und IRS-1 (Insulinrezeptorsubstrat 1) vor und binden an Phosphotyrosine innerhalb einer Sequenz von Asn-Pro-X-pTyr [Bazely und Gullick, 2005].

2.2.3 Nachgeschaltete Signalwege

Nach Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne können mehrere Signalwege angeschaltet werden, wobei die Signaltransduktion sehr komplex ist und es zu sogenannten Crosstalks mit Signalwegen anderer Rezeptoren kommen kann. Zu den durch die ErbB-Rezeptoren aktivierten Signalwegen zählen die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Kaskade und die Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) (Abb. 5). Diese nachgeschalteten Signalwege regulieren die Zellproliferation, die Zellmigration, das Zellüberleben sowie die Tumorangiogenese. Als nukleäre Reaktion auf diese Signale kommt es zur Expression von spezifischen Zielgenen, die wiederum mit einer großen Vielfalt von zellulären Reaktionen einhergehen [Prenzel et al., 2001]. Innerhalb der ErbB-Rezeptoren wird das potenteste EGF-induzierte Signal über das Homodimer EGFR-EGFR oder über das Heterodimer EGFR-ErbB2-Rezeptor entlang der MAPK-Kaskade vermittelt [Bazely und Gullick, 2005; Yarden und Slikowski, 2001].

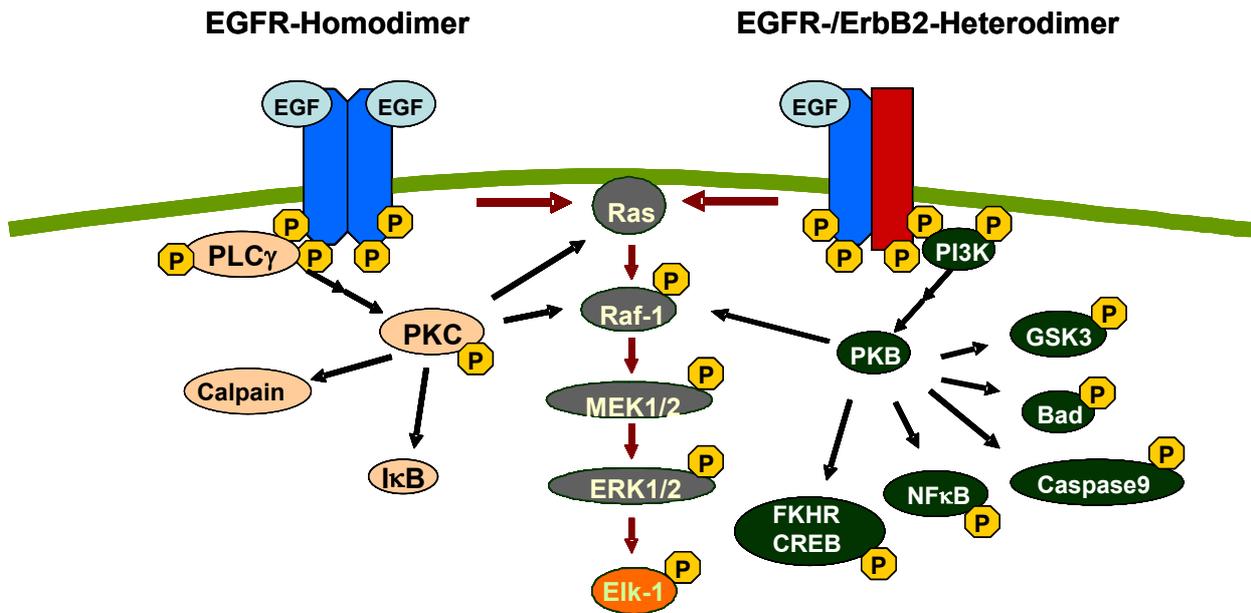


Abb. 5 ErbB-Rezeptor vermittelte Signalwege bzw. Crosstalks der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade: Calpain: calciumabhängige Kinase; EGF, Epidermaler Wachstumsfaktor; Elk-1, Transkriptionsfaktor („Ets like“ Kinase); ERK1/2, extrazellulär regulierte Kinasen; IκB, Transkriptionsfaktorinhibitor; MEK1/2, MAPK-Kinase; PI3K, Phosphoinositol-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PLCγ, Phospholipase Cγ; PTK, Proteintyrosinkinase; Raf-1, Serin-/Threoninkinase; Ras, GTP bindendes Protein

Die MAPK-Kaskade kann dabei grundsätzlich in zwei Module unterteilt werden. Die durch Wachstumsfaktoren (mitogen) aktivierte Kaskade und die durch Stress, Zytokine oder Zell-Zell-Interaktionen aktivierte Kaskade. Da im Rahmen dieser Arbeit eine Aktivierung des EGFR durch den Wachstumsfaktor EGF erfolgt und ausschließlich Signalelemente der Wachstumsfaktoraktivierten Proteinkinasekaskade diskutiert werden, wird auf die durch Stress induzierte Kaskade nicht weiter eingegangen.

Die MAPK-Signaltransduktion besteht aus einer Kaskade von Proteinphosphorylierungen, die drei entscheidende Kinasen einschließt: Raf, MEK1/2, und ERK1/2 (Abb. 6). Die Bindung des Adapterproteins Grb2 an phosphorylierte Tyrosinreste (EGFR: Tyr 1068/ Tyr1086; ErbB2-Rezeptor: Tyr 1139) des aktivierten Rezeptors erfolgt über eine SH2 (Src-Homologie)-Domäne [Olayioe et al., 2000; Bazley und Gullick, 2005]. Grb2 vermittelt dabei die Translation des GDP/GTP-Austauschfaktors Sos (son of sevenless), der GDP gegen GTP austauscht [Hilger et al., 2002]. Dabei überführt Sos das GTP bindende Protein Ras in seine aktive Form. Das G-Protein gekoppelte Ras, das in der Plasmamembran verankert ist, bindet anschließend mit hoher Affinität die Serin-/Threoninkinase Raf und bewirkt ihre Translokation zur Zellmembran, wo Raf über eine Proteinkinase aktiviert wird [Moodie und Wolfmann, 1994]. Bislang sind die drei Isoformen Raf-1, A-Raf und B-Raf bekannt [Hagemann und Rapp, 1999; Morrison und Cutler, 1997].

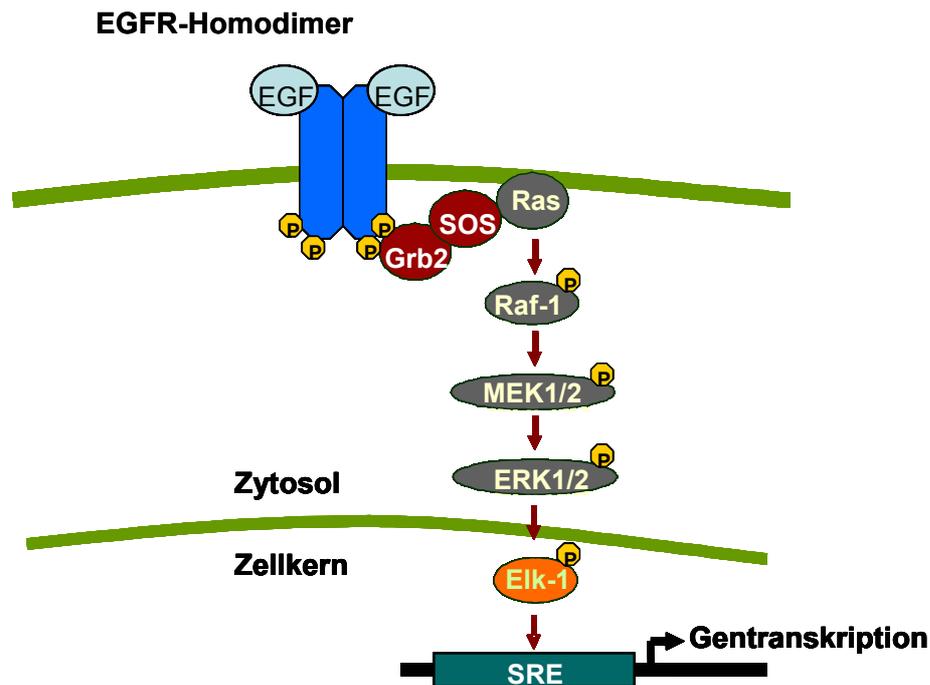


Abb. 6 Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade: EGF, Epidermaler Wachstumsfaktor; Elk1, Transkriptionsfaktor (Ets-like Kinase); ERK1/2, extrazellulär regulierte Kinasen; Grb2, growth factor receptor bound protein 2; MEK1/2, MAPK-Kinasen; Raf-1, Serin-/Threoninkinase; Ras, GTP bindendes Protein; SOS, son of sevenless; SRE, Serumresponsives Element

Aktiviertes Raf leitet nachfolgend durch Phosphorylierung die MAPK-Kaskade ein. Dabei phosphoryliert und aktiviert Raf die MAPK-Kinasen (MEK1/2) über zwei Serinreste [Schaeffer und Weber, 1999]. Die aktiven MEK1/2 sind wiederum in der Lage, die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung über ein Thr-Glu-Tyr-Motiv in der Aktivierungsschleife zu stimulieren [Schaeffer und Weber, 1999]. Durch Phosphorylierung von ERK1/2 erfolgt die Translokation in den Zellkern, wo u. a. der Transkriptionsfaktor Elk1 (ets-like kinase) als nukleäres Substrat von ERK1/2 phosphoryliert wird. Elk1 bindet nach Phosphorylierung an die Promotorregion seiner Zielgene und leitet die Transkription von Onkogenen wie c-fos und c-myc ein [Davis, 1995].

2.2.4 Endozytose

Die Signalweiterleitung durch RTK wird in nicht-entarteten Zellen durch Endozytose des Rezeptorligandenkomplexes terminiert [Nautiyal et al., 2006]. Die Bindung von Liganden an den EGFR und seine nachfolgende Dimerisierung induziert die Rezeptorinternalisierung in die Endosomen, d. h. es erfolgt eine Translokation des EGFR von der Zelloberfläche ins Zellinnere. Dieser Internalisierung folgt ein kinaseunabhängiges Recycling des Rezeptors zurück an die Zelloberfläche [Wang et al., 2005; Opresko et al., 1995]. In den Endosomen können autophosphorylierte

Rezeptoren aber auch Cbl, eine E3 Ubiquitinligase, in einer kinaseabhängigen Reaktion binden. Die Bindung von Cbl an die phosphorylierte Bindungsstelle Tyr1045 führt zu einer Anlagerung von Adapterproteinen, die ein mit Ubiquitin interagierendes Motiv (UIM) enthalten, was die Ubiquitinierung des Rezeptors bewirkt. Dies trägt zur Internalisierung des Rezeptors in die Lysosomen bei, in denen es zum Abbau kommt. Deubiquitinierende Enzyme (DUB) können diesen Prozess aufheben und den EGFR in den Recyclingkreislauf überführen [Bazley und Gullick, 2005; Yarden und Sliwkowski, 2001].

2.2.5 Überexpression des EGFR in Karzinomen

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) war der erste Oberflächenrezeptor, der direkt mit der Bildung von Tumoren in Verbindung gebracht wurde. So kommt es beispielsweise in Brust-, Lungen-, Kolorektal- und Hirntumoren zu einer Überexpression des EGFR und einer konstitutiven Signalweiterleitung [Colin et al., 2007; Mendelsohn und Baselga, 2003; Herbst, 2002; Nicholson et al., 2001] in der Größenordnung um Faktor 100-1000 [Mamot und Rochlitz, 2005]. Auch scheint eine erhöhte Rezeptordichte mit einer gesteigerten Ligandenbildung einherzugehen, so dass es zu einer autokrinen Stimulation kommen kann [Yarden und Sliwkowski, 2001; Solomon et al., 1995]. Weiterhin wurde beobachtet werden, dass eine EGFR Überexpression mit einer schlechteren Prognose und klinischen Therapierbarkeit korreliert [Mendelsohn, 2002]. Häufig kommt es in humanen Tumoren auch zu Mutationen des EGFR [Citri und Yarden, 2006; Boerner et al., 2003]. Dabei stellt der EGFRvIII die häufigste mutierte Form des EGFR dar, dessen ligandenbindende Region innerhalb der extrazellulären Domäne insoweit defekt ist, dass es zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors kommt [Huang et al., 1997; Ekstrand et al., 1992].

2.2.6 Hemmstoffe des EGFR

Der EGFR, der ein einfach zu erreichendes Oberflächenantigen darstellt und in zahlreichen Tumorarten überexprimiert wird, wurde bereits in den 80er Jahren als Target für die Antitumortherapie entdeckt [Yarden und Sliwkowski, 2001]. Dabei soll die Aktivierung des Rezeptors und damit auch die nachfolgende Signaltransduktionskaskade unterdrückt werden, was ferner zur Hemmung der Zellproliferation und zur Induktion von Apoptose führt. Aktuell können die Strategien zur Beeinflussung des EGFR in der Tumorthherapie in vier Kategorien zusammengefasst werden [Bublil und Yarden, 2007]:

- monoklonale Antikörper
- Tyrosinkinaseinhibitoren
- Inhibierung des EGFR durch Antisense-Oligonukleotide
- antikörperbasierte Immunokonjugate wie z. B. Immunotoxine

Bisher haben aber lediglich die monoklonalen Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren die klinische Phase III Studien erreicht bzw. sind für Indikationen in verschiedenen Ländern zugelassen worden [Mamot und Rochlitz, 2005].

Die monoklonalen Antikörper sind spezifische, gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtete Agenzien, die die Bindung von nativen Liganden verhindern. Zu den klinisch zugelassenen monoklonalen Antikörpern zählt beispielsweise das Medikament Cetuximab (ErbixTM) [Mamot und Rochlitz, 2005; Arteaga, 2003; Mendelsohn und Baselga, 2003]. Als Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) gegen den EGFR werden Quinazolinderivate eingesetzt, die mit ATP um die intrazellulären ATP-Bindungsstellen innerhalb der Tyrosinkinasedomäne des EGFR konkurrieren und durch ihre kompetitive Bindung eine Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden verhindern z. B. Gefitinib (IressaTM) oder Erlotinib (TarcevaTM) [Nautiyal et al., 2006; Frey, 2003]. Ein potentes Quinazolinderivat stellt Tyrphostin AG1478 ((4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin) dar (Abb. 7) [Osherov and Levitsky, 1994; Osherov et al., 1993; Gazit et al., 1991; Gazit et al., 1989].

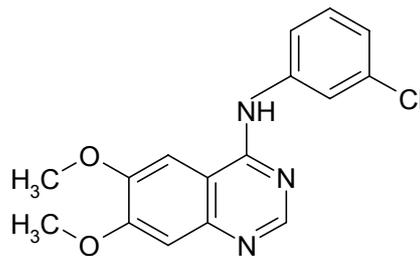


Abb. 7 Struktur des EGFR spezifischen Hemmstoffs Tyrphostin AG1478

Als spezifischer EGFR-Inhibitor hemmt Tyrphostin AG1478 die Proteinkinaseaktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation mit einem IC₅₀-Wert von $2,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ [Kern et al., 2005; Meiers et al., 2001], während der Phosphorylierungsstatus des EGFR in intakten HT29-Zellen durch eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ zu ca. 80-90 % unterdrückt wird [Fridrich et al., 2007a; Fridrich et al., 2007b]. Im Sulforhodamin B (SRB)-Test erfolgt eine Hemmung des Wachstums von HT29-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2008a]. Der wachstumshemmende Effekt ist vermutlich auf die Unterdrückung der nachgeschalteten mitogenaktivierten Proteinkinasekaskade zurückzuführen, zu dessen Beginn der EGFR steht [Osherov et al., 1993].

2.3 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung stellt eine häufige biochemische Modifikation der DNA dar, die das Erbgut epigenetisch (epi: griech. „auf“, „über“) beeinflusst. Die epigenetische Information befindet sich dabei auf der durch die DNA Basenabfolge (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) kodierten Erbinformation. Im Wesentlichen beruht die Epigenetik auf der Erkenntnis, dass es im Erbgut vererbte Modifikationen gibt, die nicht auf Abweichungen in der DNA-Sequenz zurückzuführen sind, sondern auf Veränderungen in der Genregulation und der Genexpression beruhen [Bock et al., 2006]. Es gibt verschiedene Formen der DNA-Methylierung, die sich darin unterscheiden, welche Base methyliert und an welcher Position der Base der Methylrest gebunden wird. So kommen Methylierungen des Stickstoffatoms in N4'-Methylcytosin und N6'-Methyladenin und des Kohlenstoffatoms in C5'-Methylcytosin (Abb. 8) vor [Vanyushin et al., 2005; Kapoor et al., 2005].

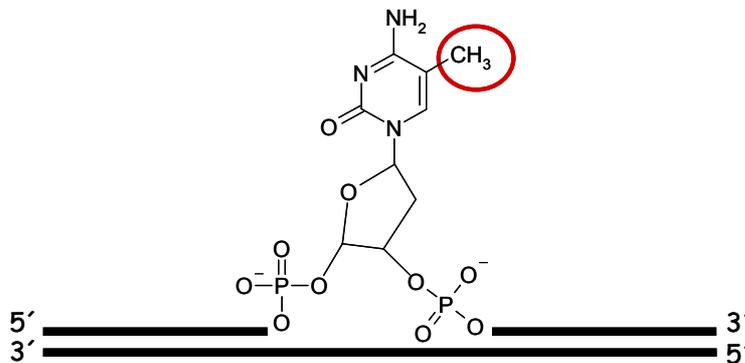


Abb. 8 Struktur des C5'-Methylcytosins der DNA

Eine der wichtigsten epigenetischen DNA-Modifikationen im Säugertiergenom ist die Cytosinmethylierung, die große Auswirkungen auf die Gentranskription, die Zelldifferenzierung, die Chromatinstruktur, die Inaktivierung des X-Chromosoms, das genomische „Imprinting“ und die embryonale Entwicklung hat [Jeltsch, 2002; Jones and Laird, 1999; Baylin et al., 1998; Cross and Bird, 1995]. Generell liegen Zellen und Organen spezifische Methylierungsmuster zu Grunde, die auch für bestimmte Krankheiten typisch sein können [Strathdee und Brown, 2002; Robertson und Wolffe, 2000]. In Tumorzellen ist die Methylierung häufig dahingehend gestört, dass DNA-Sequenzen methyliert werden, die unter nicht-entarteten Bedingungen hätten unmethyliert bleiben sollen, so dass von einer aberranten Hypermethylierung gesprochen wird. Dadurch können bestimmte Gene nicht mehr abgelesen werden, was zu einer fehlerhaften Entwicklung dieser Zellen führt. Im Besonderen werden aberrante Hypermethylierungen in Promoterregionen von Tumorsuppressorgenen mit einem Verlust der Genexpression und der Aufhebung der Tumorsuppressorfunktion in Verbindung gebracht [Bock et al., 2006; Esteller et al., 2002; Costello et

al., 2000; Baylin et al., 1998]. In der Onkogenese kann es aber auch zu einer Verminderung der DNA-Methylierung, der sogenannten Hypomethylierung kommen. Hierbei kann sowohl eine genomweite als auch eine spezifische Hypomethylierung auftreten [Das und Singal, 2004].

Die DNA-Methylierung ist eine kovalente chemische Modifikation der DNA, bei der es zu einer Übertragung einer Methylgruppe auf das C5' des Cytosinrings der DNA kommt. Die meisten Cytosinmethylierungen erfolgen in der Sequenz von CpG-Dinukleotiden (Verknüpfung von Cytosin „C“ und Guanidin „G“ über eine Phosphodiesterasebindung), die mit einer Häufigkeit von 5-10 % im humanen Genom auftreten [Ramsahoye et al., 2000; Antequera und Bird, 1993]. Grundsätzlich liegt das humane Genom nicht gleichmäßig methyliert vor, sondern enthält Regionen von unmethylierten DNA-Sequenzen, die wiederum von methylierten Regionen in Form von CpG-Dinukleotiden durchzogen sind [Bird, 1986]. Diese kleinen genomischen Regionen werden auch als CpG-Inseln bezeichnet und entsprechen einer Größe von 0,5 bis 5 kb. Sie treten durchschnittlich alle 100 kb auf und sind GC-reich (60-70 %) [Das und Singal, 2004]. Die ungefähr 45000 CpG-Inseln des humanen Genoms sind gewöhnlich in der Promoterregion der Gene lokalisiert und liegen mit Ausnahme des inaktiven X Chromosoms im weiblichen Säuger genom unmethyliert vor [Plass et al., 1997; Antequera und Bird, 1993].

2.3.1 DNA-Methyltransferasen (DNMT)

Die DNA-Methylierung erfolgt durch die Gruppe der DNA-Methyltransferasen (DNMT), von denen bislang mehrere Isoenzymfamilien identifiziert wurden [Robertson, 2002]. Jedoch scheinen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B den größten Einfluss auf die DNA-Methylierung zu nehmen [Das und Singal, 2004]. Die Methylierung der DNA durch Methyltransferasen kann *de novo* erfolgen, wenn beide Stränge der DNA unmethyliert vorliegen oder der Erhaltung des Methylierungsmusters nach der DNA-Replikation dienen (Abb. 9) [Das und Singal, 2004; Robertson, 2000].

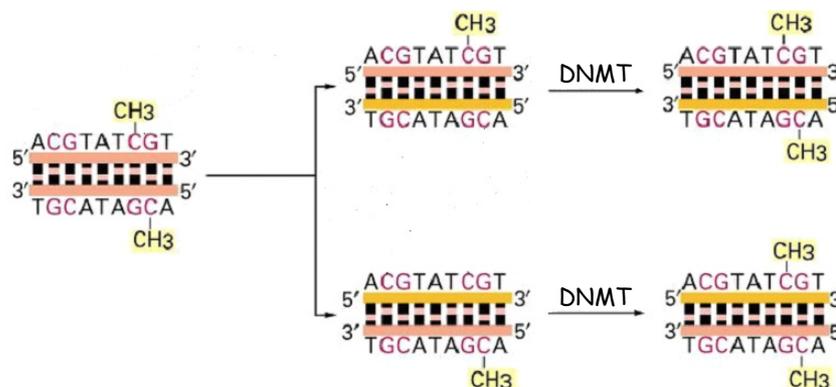


Abb. 9 Erhaltung des Methylierungsmusters nach DNA-Replikation durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) [Finnogan et al., 1998]

Grundsätzlich scheinen einzelne Methyltransferasen in der Lage zu sein, sowohl *de novo* als auch vervollständigende Methylierungen durchzuführen, zeigen aber Präferenzen [Hermann et al., 2004; Costello und Plass, 2001]. Im Vergleich zu unmethylierten Sequenzen besitzt die DNMT1 eine 10-40x höhere Affinität gegenüber hemimethylierten DNA-Sequenzen [Pradhan et al., 1999], während DNMT3A und DNMT3B besonders potente *de novo* Methyltransferasen darstellen [Okano et al., 1998]. Die C-terminale Region der DNMT enthält die katalytische Domäne, die sich aus homologen Motiven zusammensetzt (Abb. 10) [Hermann et al., 2004; Robertson, 2000]. Hierbei fungieren Motiv I und X als Bindungsstellen für S-Adenosylmethionin, Motiv IV und VI katalysieren den Transfer der Methylgruppe und Motiv IX dient der DNA-Bindung (Abb. 10) [Robertson, 2001]. Die regulatorische Domäne befindet sich am N-Terminus und enthält Regionen mit z. T. noch unbekannten Funktionen. Strukturelle Unterschiede in der regulatorischen Domäne führen zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten.

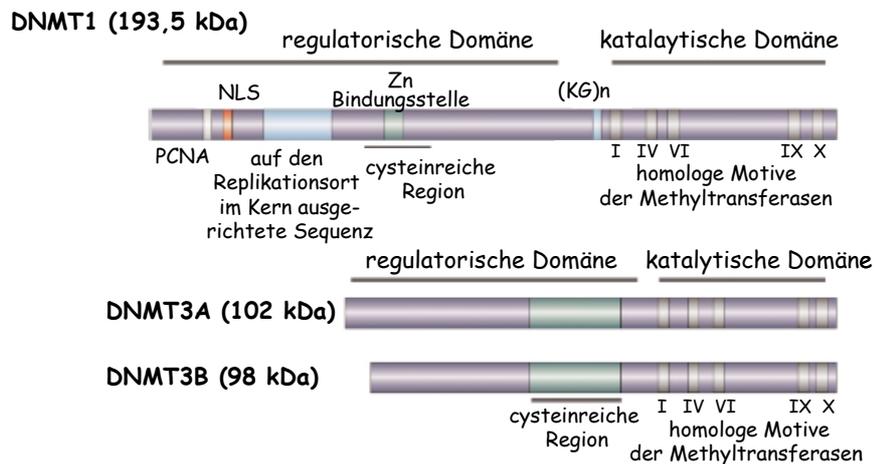


Abb. 10 Schematischer Aufbau der katalytisch aktiven DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B [Robertson, 2001; Robertson, 2000]. (KG)_n, Lysin-Glycin-Wiederholungsregion; NLS, kernlokalisierendes Signal; PCNA, zellproliferierendes Kernantigen

2.3.2 Mechanismus der DNA-Methylierung durch Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung ist eine enzyminduzierte chemische Modifikation der DNA-Struktur. Als Cofaktor aller DNA-Methyltransferasen (DNMT) fungiert S-Adenosylmethionin (SAM), das die zu übertragende Methylgruppe bereitstellt und anschließend in S-Adenosylhomocystein (SAH) übergeht [Wajed et al., 2001]. Die Methylgruppe des SAM ist an ein Sulfoniumion gebunden, was thermodynamisch ungünstig ist und das Molekül für Nukleophile (Sauerstoff-, Stickstoffatome, Carbanionen) angreifbar macht [Herman et al., 2004].

Durch Anlagerung der Methyltransferase werden zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen des C/G-Paares gebrochen, so dass Cytosin aus der DNA-Doppelhelix in die katalytische Tasche des

Enzyms klappen kann. Dieser Schritt dient der Aktivierung der DNMT. Nachfolgend kommt es durch einem nukleophilen Angriff der Cysteinthiolgruppe der DNMT (Bindungsstelle IV) am C6'-Atom des Cytosins zur Bildung einer kovalenten Bindung (Abb. 11).

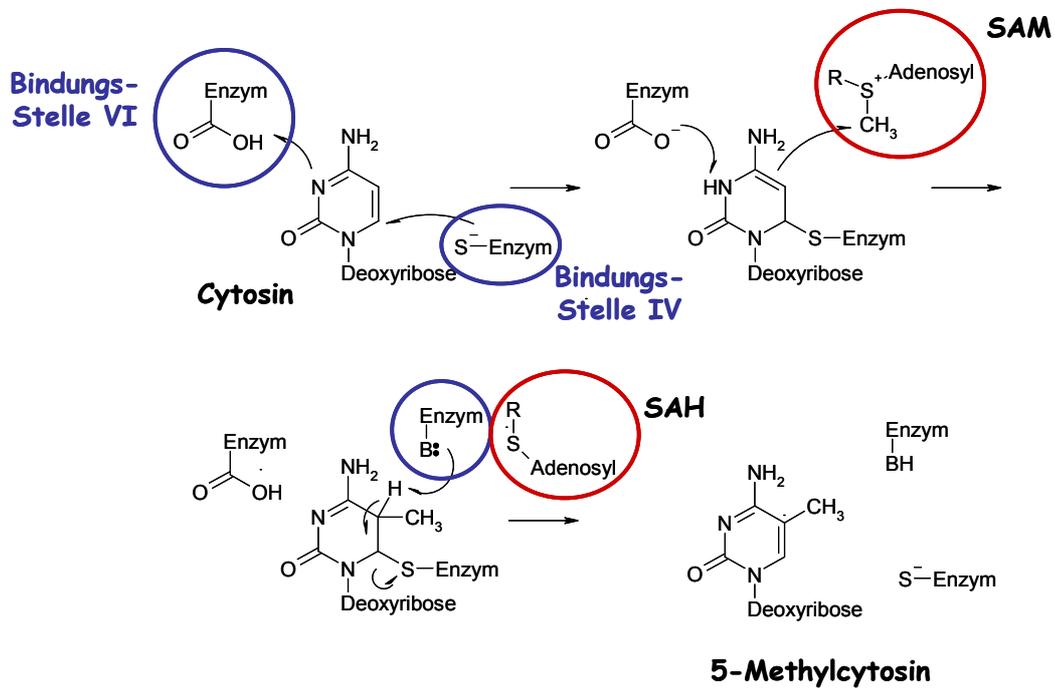


Abb. 11 Postulierter Mechanismus der DNA-Methylierung durch Methyltransferasen [Herman et al., 2004]. SAM, S-Adosylmethionin; SAH, S-Adosylhomocystein

Gleichzeitig wird die N3-Position des Cytosins durch Glutaminsäure der DNMT (Bindungsstelle VI) protoniert und trägt zur Stabilisierung des DNA-Proteinkomplexes bei. Dies führt wiederum zum elektrophilen Angriff der Methylgruppe von SAM an das C5' des Cytosins. Durch Eliminierung des Protons an C5' und Auflösung des kovalenten Intermediats entsteht das 5-Methylcytosin (Abb. 11) [Herman et al., 2004]. Der Mechanismus der Methylgruppenübertragung von SAM auf das C5'-Atom des Cytosin scheint für die bisher bekannten DNMT identisch zu sein. Auch die Homologie in der katalytischen Domäne der Enzyme spricht für einen einheitlichen Mechanismus (Abb. 11) [Herman et al., 2004].

Für den Mechanismus der Demethylierung wird sowohl eine passive als auch eine aktive Form der Methylierungsreduktion postuliert [Herman et al., 2004]. Im Rahmen der passiven Demethylierung kommt es während der DNA-Replikation zu einer Deaktivierung der Methyltransferaseaktivität. Bei der aktiven Demethylierung – unabhängig von der DNA-Replikation – erfolgt ein Austausch von 5-Methylcytosin gegen Cytosin. Hierbei wird Methylcytosin durch 5-Methylcytosin-DNA-Glykosylase vom Phosphodiesterückgrat der DNA abgespalten und in der anschließenden DNA-Reparatur durch Cytosin ersetzt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abspal-

tung der Methylgruppe durch Hydrolyse. Beispielsweise ist 5-Methylcytosin-Demethylase in der Lage, 5-Methylcytosin zu Cytosin und Methanol zu hydrolysieren.

2.3.3 Genregulation

Die Hypermethylierung von Promotorregionen tumorassoziierter Gen wird mit dem Verlust von Genexpression und Genfunktion in Zusammenhang gebracht. Obwohl der Mechanismus, der zur Inaktivierung der Gentranskription führt, noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wird vermutet, dass spezifische Proteine an methylierte DNA-Sequenzen binden und so die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren verhindern. Dazu befähigte Proteine, wie MeCP2 (Methyl-CpG bindendes Protein 2), enthalten eine methyl-CpG-bindende Domäne (MBD), die methylierte CpG-Dinukleotide erkennt und spezifisch an diese bindet [Wakefield et al., 1999] sowie eine Transkriptionsrepressordomäne (TRD), die mit regulatorischen Proteinen interagiert (Abb. 12) [Wajed et al., 2001; Robertson und Wolffe, 2000]. Im Besonderen bildet die TRD mit Korepressionsmolekülen (z. B. mSin3A) und Histondeacetylasen einen Komplex, der an die methylierte DNA bindet und den DNA-Strang umwickelnde Histone deacetyliert. Dies führt zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur und macht die DNA schwer zugänglich, was sich letztlich in einer Hemmung der Transkription äußert (Abb. 12) [Das und Signal, 2004; Wajed et al., 2001].

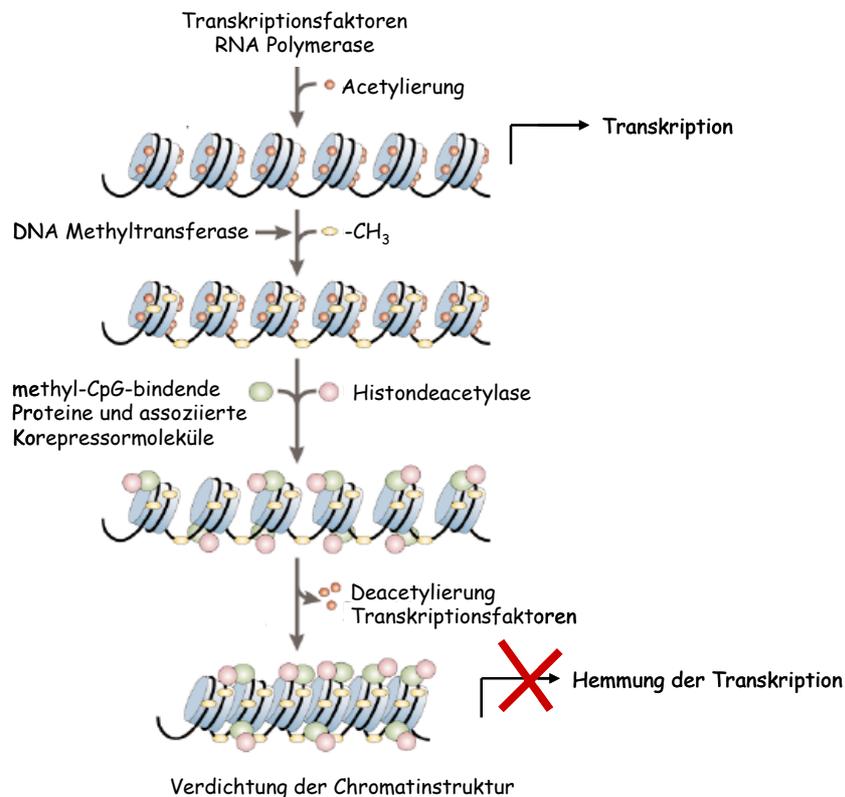


Abb. 12 Hemmung der Transkription durch Verdichtung der Chromatinstruktur [Robertson und Wolffe, 2000]

2.3.4 Hypermethylierung

Die Hypermethylierung der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen, von Genen der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle trägt zu einem Spektrum an genomischen Abnormalitäten bei, die in humanen Tumorzellen nachzuweisen sind [Costello et al., 2000; Baylin et al., 1998; Jones et al., 1997]. Beispielsweise

- im Serum von kolorektalen Krebspatienten [Nakayama et al., 2002]
- im Serum von Patienten mit Speiseröhrensarkom [Hibi et al., 2001]
- bei akuter lymphatischer Leukämie [Roman-Gomez et al., 2004]
- im Sputum von Lungenkrebspatienten, wobei das humane Sputum bereits einen sensitiven Marker für Lungenkrebs darstellt, bevor dieser pathologisch diagnostiziert werden kann [Palmisano et al., 2000]
- in humanen Gallenblasentumoren (auch bei chronischer Cholezystitis ohne Tumorbildung, was möglicherweise auf die Entwicklung eines Gallenblasentumors schließen lässt) [Takahashi et al., 2004]
- in hepatozellulären Karzinomen (auch bei chronischen Lebererkrankungen ohne Tumorbildung, was möglicherweise auf ein erhöhtes Risiko für ein Leberkarzinom hindeutet) [Lee et al., 2003]

Somit können aberrante Methylierungsmuster auch als molekulare Marker zur Früherkennung von Tumoren herangezogen werden. Bisher ist allerdings wenig bekannt über die zeitliche Steuerung von aberranten Hypermethylierungen während der Tumorgenese. Es wird angenommen, dass eine DNA-Modifikation relativ früh in diesem Prozess auftritt [Baylin et al., 1998]. Erste Untersuchungen von Kolontumoren zeigten, dass einige Hypermethylierungsmuster in Promotorregionen die Retention von Vorgängen, die in der gesunden Darmmukosa als Alterserscheinung auftreten, widerspiegeln [Ahuja et al., 1998; Issa et al., 1994]. Somit finden sowohl altersrelevante als auch tumorspezifische Hypermethylierung in den Promoterregionen statt.

2.3.5 Hypomethylierung

Eine genomische Hypomethylierung wird häufig in repetitiven Sequenzen von Retroelementen („springende“ Elemente im Genom, die meist an charakterischen Stellen im DNA-Strang kodiert mit einem intern liegenden, und damit mitwandernden Promotor vorliegen) und endogenen Retroviren beobachtet und wird mit der Induktion von chromosomaler Instabilität assoziiert [Chen et al., 1998]. In nicht-entarteten Zellen liegen diese Sequenzen methyliert vor, wodurch eine Transkription unterdrückt wird. Zu retrotransposablen Elementen zählt z. B. LINE1, das u. a. in Prostatakarzinomen [Santourlidis et al., 1999] und in hepatozellulären Karzinomen [Takai et al., 2000] nachgewiesen wurde. Durch eine spezifische Hypomethylierung können beispielsweise

Proto-Onkogene wie BCL-2 in Leukämien [Hanada et al., 1993] aktiviert werden. Während die Hypermethylierung bestimmter Gene ein frühes Ereignis im Verlauf der Krankheit darstellt, ist die genomweite Hypomethylierung von repetitiven Sequenzen ein späterer Prozess im Karzinom.

2.3.6 Inhibitoren der DNA-Methylierung

Epigenetische DNA-Modifikationen sind reversible Prozesse, so dass Hypermethylierungen von Promotorregionen ein potentiell therapeutisches Target darstellen [Das und Singal, 2004]. Aus diesem Grund gewinnen demethylierende Agenzien zunehmend an Bedeutung, da sie Einfluss auf den Methylierungsstatus von Tumorzellen nehmen, ohne dass die Zellen dabei selbst entfernt werden müssen [Kantarjian et al., 2003]. Allerdings führt solch eine Demethylierung nicht nur zu epigenetischen Veränderungen der Tumorzellen, sondern beeinflusst auch das natürliche DNA-Methylierungsmuster, das für die normale Zellentwicklung entscheidend ist. Aufgrunddessen führen bisher entwickelte epigenetische Medikamente zu schweren Nebenwirkungen und sorgen für Schäden bei Nachkommen [Bock et al., 2006]. Als besonders potente demethylierende Agenzien haben sich die nukleosidanalogen DNMT-Inhibitoren 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabine, 5-Aza-CdR) herausgestellt (Abb. 13).

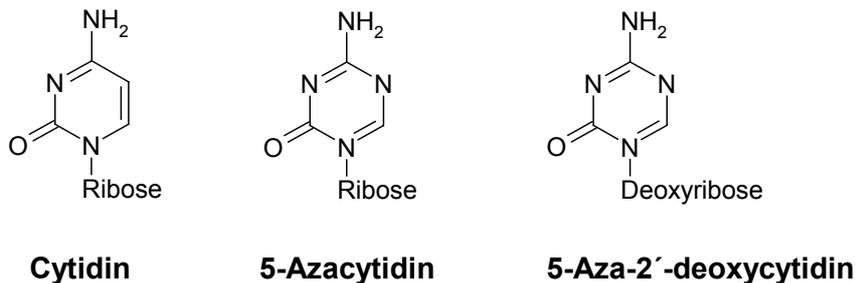


Abb. 13 Strukturen von Cytidin und Cytidinanaloga

Präklinische Studien zeigten bereits in den 80er Jahren, dass 5-Azacytidin und 5-Aza-CdR die DNA-Methylierung in zahlreichen Zelllinien und in den Zellen von humanen Leukämiepatienten vermindern [Momparler et al., 1984; Wilson et al., 1983].

Nach Phosphorylierung von 5-Aza-CdR durch ein Nukleosidtriphosphat [Momparler et al., 1979] erfolgt der Einbau als Cytidinanalogon in die DNA, jedoch nicht in die RNA [Covey et al., 1986]. Durch den Einbau in die DNA kommt es zur kovalenten Bindung von DNMT [Santi et al., 1984], über die der Zelltod durch Hemmung der DNA-Synthese induziert wird [Goffin und Eisenhauer, 2002]. Weiterhin kommt es durch Eingliederung des 5-Aza-CdR in die DNA zu einer strukturellen Instabilität und damit zu einer DNA-Schädigung [D'Incalci et al., 1985]. Durch Bindung an 5-Aza-CdR wird die Aktivität der DNMT inhibiert, so dass eine Methylierung der DNA ausbleibt und es zu einem signifikant demethylierenden Effekt nach Replikationen kommt

[Santini et al., 2001]. Bender et al. (1998) zeigten bereits, dass das demethylierende Potential des 5-Aza-CdR zur Reaktivierung stillgelegter Tumorsuppressorgene und zur Hemmung des Wachstums humaner Tumorzelllinien führt [Esteller, 2005]. Aufgrund der stark zytotoxischen Effekte von 5-Aza-CdR rücken nichtnukleoside, demethylierende Substanzen in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. So identifizierten Fang et al. (2003) Teecatechine als potente Inhibitoren der DNMT-vermittelten DNA-Methylierung in humanen Tumorzelllinien. Kokristallisationsuntersuchungen zur Aufklärung der DNMT-Hemmung durch (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) zeigten, dass EGCG direkt an die katalytische Domäne der humanen DNMT1 bindet und zur Inaktivierung der Enzymaktivität führt [Lee et al., 2005; Fang et al., 2003]. Ein weiterer Mechanismus, der zur Hemmung der DNMT führt, erfolgt über die Catecholstruktur des EGCG, die ein Substrat für die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) darstellt (Abb. 14) [Lu et al., 2003].

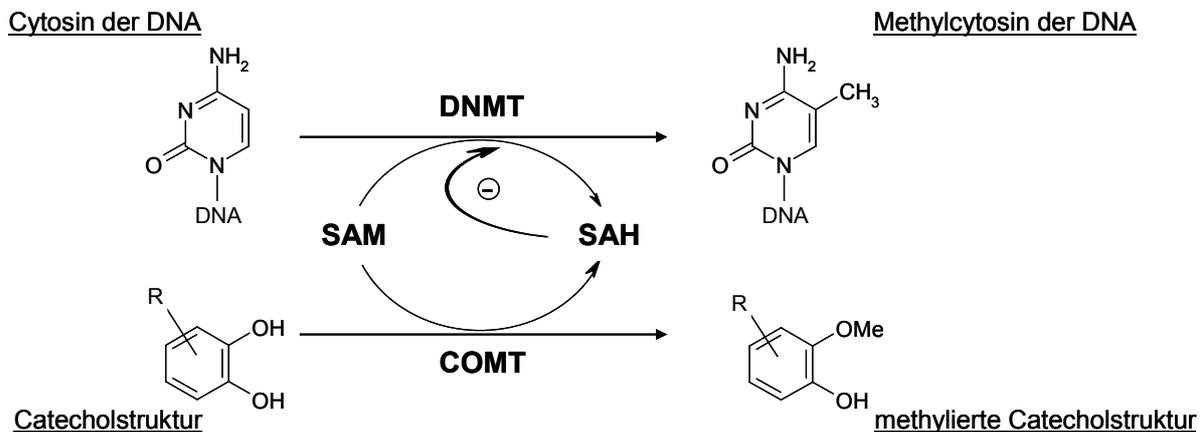


Abb. 14 COMT-vermittelte Hemmung der DNMT über SAH [Lee und Zhu, 2006] COMT, Catechol-O-Methyltransferase; DNMT, DNA-Methyltransferase; SAH, S-Adenosylhomocystein; SAM, S-Adosylmethionin

Als Methyl donor dient hierbei SAM, das nach dem Transfer der Methylgruppe, in SAH übergeht. SAH fungiert wiederum als Hemmstoff der DNMT, so dass durch EGCG sowohl eine direkte und als auch eine indirekte Hemmung der Aktivität der DNMT erfolgt [Lee und Zhu, 2006; Lee et al., 2005; Fang et al., 2003]. Auch eine EGCG-vermittelte Reaktivierung der Genexpression wurde bereits für zahlreiche Gene gezeigt [Fang et al., 2003].

2.3.7 Das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}

Die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus und damit der Zellproliferation beteiligt sind, wie Cycline, cyclinabhängige Kinasen (CDK) und Phosphatasen haben in den letzten Jahren zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Regulation des Zellzyklus beigetragen [Heichman und Roberts, 1994; Pines, 1993]. Eine weitere Familie von Proteinfaktoren, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, stellen die cyclinab-

hängigen Kinaseinhibitoren (CKI) dar, die an spezifischen Stellen des Zellzyklus (G1/S-Kontrollpunkt, G2/M-Kontrollpunkt) die Aktivität vor allem von CDK negativ regulieren können [Hirama und Koeffler, 1995]. Die CKI übernehmen damit eine Schlüsselfunktion innerhalb der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation von Zellen. Als potente Inhibitoren der CDK4/6 sind u. a. vier verschiedene Proteine der INK4 (Inhibitor der CDK4/6)-Familie beschrieben: p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Die Isoformen werden mit den Buchstaben a-d bezeichnet, während die Ziffern 15-19 das Molekulargewicht in kDa angeben (Abb. 15) [Hirai et al., 1995].

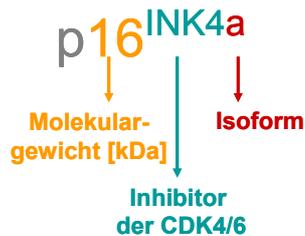


Abb. 15 Nomenklatur des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a}

Innerhalb dieser Familie spielt p16^{INK4a} die bedeutendste Rolle für die Tumorsuppression. Dies ist vermutlich auf seine besonderen Expressionsmerkmale zurückzuführen. Das p16-Gen, das auf dem humanen Chromosom 9p21 lokalisiert ist und aus 3 Exons besteht, transkribiert nicht nur p16^{INK4a}, sondern auch ein alternativ gespleißtes β -Transkript p14^{ARF} (ARF: alternative reading frame; in der Maus: p19^{ARF}) [Kamb et al., 1994]. Dieses Transkript verwendet dieselben Exons 2 und 3 wie die p16^{INK4a}-kodierende mRNA, enthält aber ein alternatives Exon 1 β . Der humane INK4a/ARF-Lokus kodiert somit die beiden Zellzyklus regulierenden Proteine p16^{INK4a} und p14^{ARF}, die sich zwei Exons teilen, aber verschiedene Leseraster gebrauchen [Quelle et al., 1995]. Die Tatsache, dass p14^{ARF} den Zellzyklus in Abwesenheit von p16^{INK4a} zu blockieren vermag, spricht für einen unabhängigen Wirkmechanismus, der gegenwärtig jedoch noch unklar ist.

p16^{INK4a} zählt zu den tumorassoziierten Genen, die mit einer Hypermethylierung ihrer Promotorregion und dem Verlust ihrer Tumorsuppressorfunktion in humanen Neoplasien in Verbindung gebracht werden [Baylin et al., 1998; Herman et al., 1997; Gonzalez-Zulueta et al., 1995; Merlo et al., 1995]. Bei dem Gen des CDK4/6-Inhibitors handelt es sich um ein potentielles Tumorsuppressorgen, das auch unter den Namen CDKN2 (cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 2) oder MTS1 (multipler Tumorsuppressor 1) bekannt ist [Strauss et al., 1995; Serrano et al., 1993]. Das p16^{INK4a}-Gen kodiert ein Protein aus 148 AS mit einem Molekulargewicht von 16 kDa [Serrano et al., 1993] und setzt sich zum größten Teil aus vier Wiederholungen von AS-Sequenzen, sogenannten Ankyrinwiederholungen, zusammen, die Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen entsprechen [Bogenrieder et al., 1998].

Für die kritische Funktion des CDK-Inhibitors $p16^{INK4a}$ im Rahmen der Kanzerogenese ist seine negativ-regulierende Rolle beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus entscheidend. Der Zellzyklus wird grundsätzlich in vier Phasen unterteilt:

- die G1-Phase (engl. gap, Lücke), in der die Zelle sich auf die DNA-Synthese vorbereitet
- die S-Phase (Synthese-Phase), in der die DNA repliziert wird
- die G2-Phase, in der Vorbereitungen für die Mitose getroffen werden
- Mitose-Phase

Grundsätzlich kann der Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten innerhalb der G1- und G2-Phase angehalten werden, so dass von einem sogenannten G1- bzw. G2-Arrest gesprochen wird. Tritt die Zelle aufgrund mitogener Stimuli in die G1-Phase ein, bindet ein Retinoblastoma-protein(Rb)-Repressorkomplex an den Transkriptionsfaktor E2F, so dass die nachgeschaltete Transkription gehemmt und das Zellwachstum unterdrückt wird (Abb. 16). Durch Phosphorylierung von Rb durch CyclinD/CDK4/6-Komplexe dissoziiert der Rb-Repressorkomplex [Lukas et al., 1996] und freies E2F aktiviert die Transkription von S-Phase fördernden Genen (z. B. Cyclin A) [Müller und Helm, 2000]. Da nun hauptsächlich Proteine exprimiert werden, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, ist die Zelle in der Lage, den Restriktionspunkt zu überschreiten und in die S-Phase einzutreten.

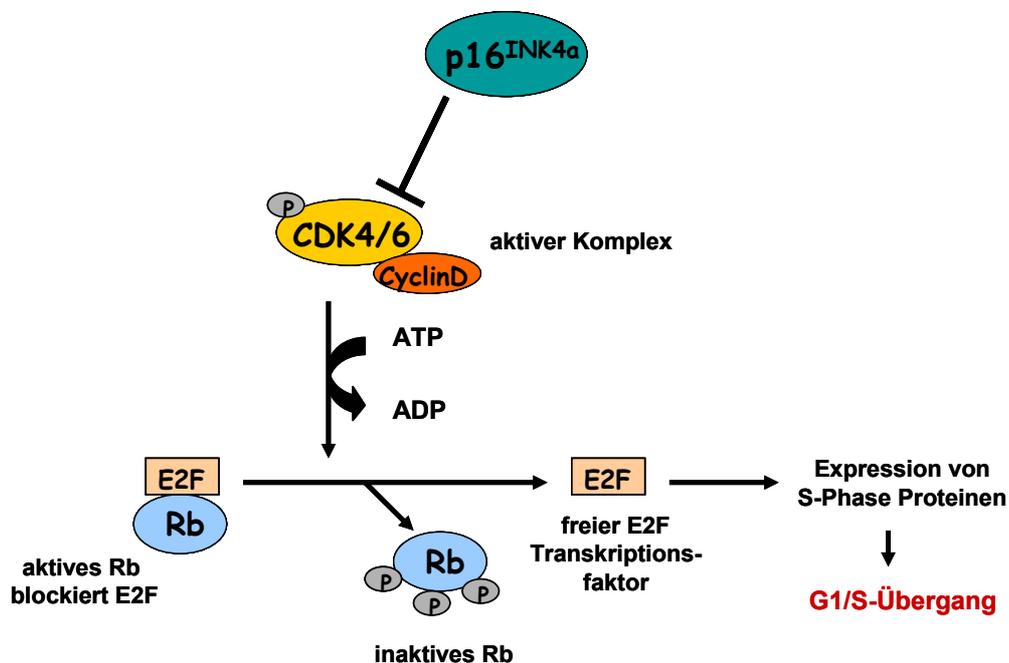


Abb. 16 Schematische Darstellung der Funktion des Tumorsuppressorgens $p16^{INK4a}$ [Lowe und Sherr, 2003]. CDK4/6: cyclinabhängige Kinase 4/6; E2F: Transkriptionsfaktor; G1-Phase: Gap1-Phase; Rb: Retinoblastoma-protein; S-Phase: DNA-Synthesephase

$p16^{INK4a}$ hemmt direkt die Aktivität des CyclinD/CDK4/6-Komplexes und inhibiert damit die Phosphorylierung des Rb. Aufgrund dieser Hemmung wird der Übergang der Zelle aus der G1-

Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert und die Transkription von proliferierenden Zielgenen unterdrückt (Abb. 16) [Lowe und Sherr, 2003; Sherr, 2001]. p16^{INK4a} scheint als cyclinabhängiger Kinaseinhibitor die Zellproliferation in Abhängigkeit von Funktionen des Tumorsuppressorgens Rb zu reprimieren. Alle bisherigen Daten lassen vermuten, dass aktivierte CyclinD/CDK4/6-Komplexe Rb phosphorylieren und damit inaktivieren. Durch die Inaktivierung von Rb wird die Rb-abhängige Repression der p16^{INK4a}-Expression weitestgehend aufgehoben. Dies führt zu einer erhöhten Synthese des p16^{INK4a}-Proteins und zu einer Inaktivierung der CDK4/6 zum richtigen Zeitpunkt im Zellzyklus. Somit wird die Expression von p16^{INK4a} durch Rb negativ reguliert [Harbour und Dean, 2000; Nevins, 1998].

2.4 Polyphenole

Unter dem Begriff Polyphenole werden Verbindungen zusammengefasst, die in ihrer chemischen Struktur auf das Phenol zurückzuführen und im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Da sie weder im Primärstoffwechsel der Pflanze gebildet, noch verbraucht werden, werden sie auch als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet. Die wichtigsten Polyphenole werden aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in drei Substanzgruppen unterteilt [Watzl und Rechkemmer, 2001]:

- Flavonoide
- Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate („Nicht-Flavonoide“)
- Chalkone

2.4.1 Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate

Die Phenolcarbonsäuren sind überwiegend in den Randschichten von Pflanzen zu finden und tragen zur Stabilität der Zellwände in der Schale bei. Sie lassen sich in Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren einteilen und kommen häufig mit organischen Säuren oder Zuckern verestert vor [Watzl und Rechkemmer, 2001].

Der am häufigsten in Früchten vorkommende Hydroxyzimtsäureester ist die Chlorogensäure (Abb. 17), die aus Kaffeesäure und Chinasäure gebildet wird.

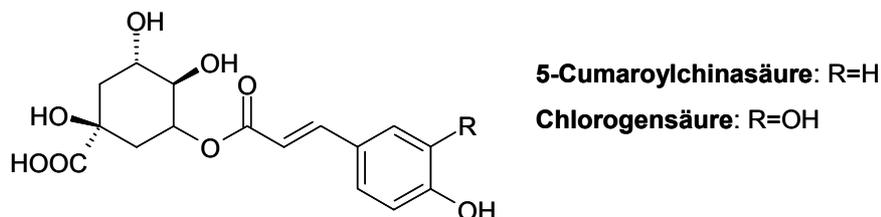


Abb. 17 Hydroxyzimtsäuren Chlorogensäure und 5-Cumaroylchinasäure

In Äpfeln beträgt der Gehalt an Chlorogensäure in Abhängigkeit von der Apfelsorte 30-60 mg/kg und in Apfelsaft bis zu 208 mg/l [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Neben Chlorogensäure und

ihren Isomeren stellen die Hydroxyzimtsäuren p-Cumarsäure, Kaffeesäure und 5-Cumaroylchinasäure weitere Inhaltsstoffe des Apfels dar (Abb. 17; Abb. 18).

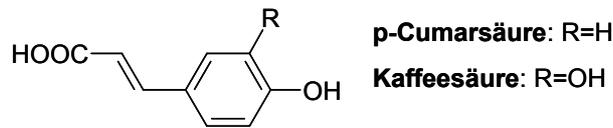


Abb. 18 Hydroxyzimtsäuren p-Cumarsäure und Kaffeesäure

Die Gallussäure gehört zu den Hydroxybenzoesäuren (Abb. 19) und wird zu 93 % mit Rot- und Weißwein aufgenommen [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Eine aus zwei Gallussäuremolekülen bestehende Hydroxybenzoesäure ist die Ellagsäure (Abb. 19), die in Beerenfrüchten der Familie der *Rosaceae*n (z. B. Himbeeren und Brombeeren) und in bestimmten Nüssen (z. B. Walnüssen und Pekannüssen) vorkommt.

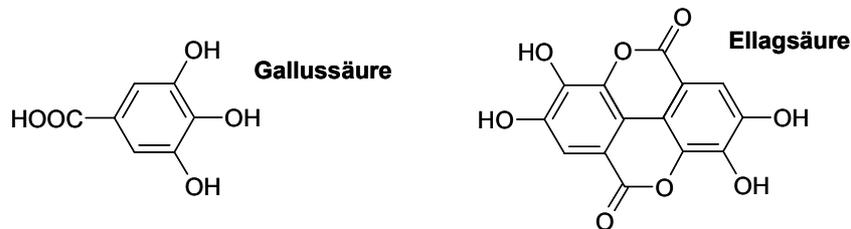
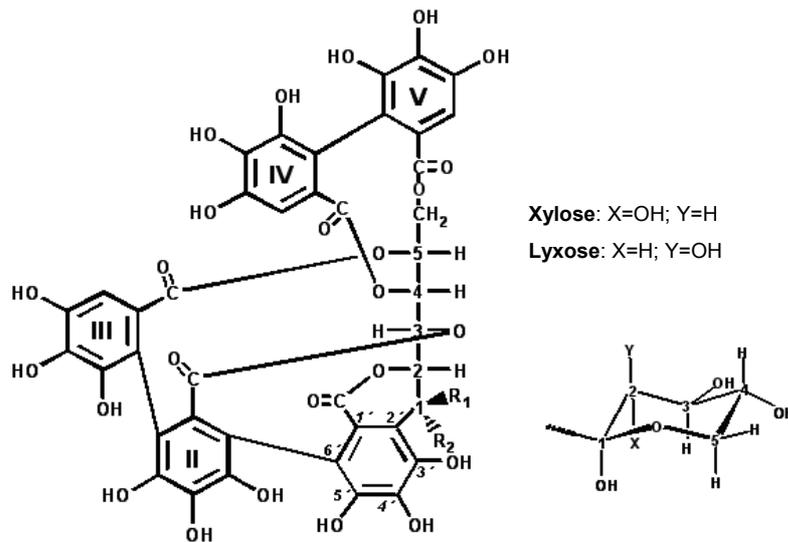


Abb. 19 Hydroxybenzoesäuren Gallussäure und Ellagsäure

Zur Substanzgruppe der hydrolysierbaren Tannine zählen neben den Gallotanninen auch die Ellagtannine, die als Ester der Hexahydroxydiphensäure häufig glykosidisch gebunden vorliegen [Clifford und Scalbert, 2000; Quideau et al., 1996].

Das Kernholz verschiedener Eichenarten besteht aus rund 10 %-Gewichtsprozent Ellagtanninen. Als Bestandteile der amerikanischen Eiche (*Quercus alba* L.) wurden im Besonderen die Ellagtannine Castalagin, Vescalagin, Grandinin und die Roburine A-E identifiziert (Abb. 20) [Glabasnia et al., 2006; Cadiah et al., 2001]. Ellagtannine haben zahlreiche gemeinsame Eigenschaften mit Procyanidinen, einschließlich ihres wasserlöslichen Charakters, ihres hohen Molekulargewichts und ihrer Fähigkeit Proteine und Alkaloide zu präzipitieren [Hofmann et al., 2006; Santos-Buelga et al., 2000].



Ellagannine	R1	R2
Castalagin	H	OH
Vescalagin	OH	H
Grandinin	Lyxose	H
Roburin E	Xylose	OH

Abb. 20 Ellagannine und Ellaganninglykoside [Fridrich et al., 2008a]

In Gegenwart von Säuren oder Basen werden Esterbindungen hydrolysiert (Abb. 21) und die dabei entstehende Hexahydroxydiphensäure reagiert spontan zu einem wasserunlöslichen Dilacton, der Ellagsäure, nach dieser die Substanzklasse auch benannt ist [Clifford und Scalbert, 2000; Quideau et al., 1996].

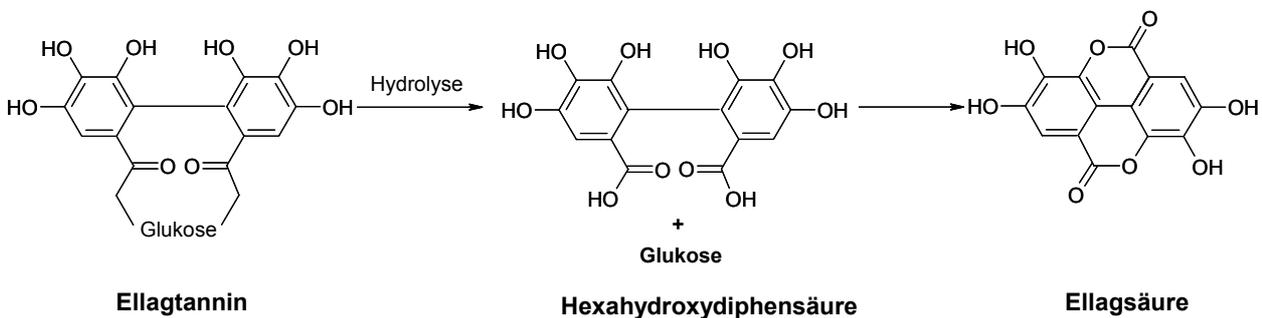


Abb. 21 Hydrolyse von Ellaganninen

Ellagannine wurden als wichtige Geschmackscomponenten in Wein und Bourbon-Whiskey identifiziert, die den mild-adstringierenden Geschmack und die Mundfülle bestimmen. Durch Lagerung von hydroalkoholischen Lösungen in Eichenholzfässern gehen die Ellagannine in die Lö-

sung über und reichern sich dort an [Glabasnia et al., 2007]. Die Konzentration der Ellagttannine im Eichenholz ist abhängig von der Holzspezies, vom geographischen Ursprung des Holzes, von der Jahreszeit und von der Herstellungsweise der Fässer [Cadiah et al., 2001].

Generell ist die Aufnahme von Ellagttanninen aus der Nahrung begrenzt auf einige wenige Früchte und Nüsse wie Himbeeren, Brombeeren, Walnüsse und Haselnüsse [Mertens-Talcott et al., 2006; Clifford und Scalbert, 2000].

2.4.1.1 Bioverfügbarkeit von Phenolcarbonsäuren und ihren Derivaten

Die Metabolisierung der Hydroxyzimtsäurenester erfolgt zum größten Teil im Dickdarm über Xylanasen und Esterasen der Mikroflora mit anschließender Resorption [Kroon et al., 1996]. Als Dickdarmbakterien, die beispielsweise den Hydroxyzimtsäurenester Chlorogensäure hydrolysieren, wurden *Escherischa coli* (*E. coli*), *Bifidobacterium lactis* und *Lactobacillus gasseri* identifiziert [Couteau et al., 2001; Plumb et al., 1999]. Dies bestätigen zahlreiche Studien, die nach Aufnahme von Chlorogensäure in Plasma und Urin (von Mensch und Ratte) Kaffeesäure und ihre *O*-methylierten Metabolite nachwiesen [Wittemer et al., 2005; Nardini et al., 2002; Rechner et al., 2001; Azuma et al., 2000]. Als Hauptausscheidungsprodukt nach Chlorogensäureaufnahme entsteht Hippursäure [Olthof et al., 2003; Gonthier et al., 2003]. Lafay et al. (2006) detektierten allerdings Spuren von Kaffeesäure im Rattendünndarm, nachdem den Tieren eine chlorogensäurereiche Kost verabreicht worden war, was daraufhin deutet, dass bereits im Dünndarm eine Spaltung der Hydroxyzimtsäurenester erfolgen muss. Nach Gabe eines chlorogensäurereichen Apfelsaftes bestimmten Kahle et al. (2007) in der Ileostomaflüssigkeit von Patienten hohe Konzentrationen an Chinasäure, ein Abbauprodukt, das vermutlich nach Spaltung der Esterbindung der Chlorogensäure entsteht. Daraufhin postulierten Kahle et al. (2007), dass Esterasen in den Enterozyten die Freisetzung der Chinasäure durch Hydrolyse von Chlorogensäure katalysieren müssen. Diese Vermutung teilen auch Kern et al. (2003) und Zhang et al. (2002), allerdings scheint die Hydrolyse im Dünndarm eine untergeordnete Rolle zu spielen [Olthof et al., 2001].

Für die Resorption von unveresterten Hydroxyzimtsäuren wie Kaffeesäure werden zwei Mechanismen diskutiert: Die passive Diffusion im Magen und die aktive Aufnahme im Dünndarm über einen Na^+ -abhängigen Transporter [Olthof et al., 2001; Ader et al., 1996, Wolffram et al., 1995]. Für die Ratte wurde dies bereits gezeigt. Resorbierte Hydroxyzimtsäuren wurden in der Leber durch β -Oxidation abgebaut bzw. dort methyliert und mit dem Gallensaft ausgeschieden [Ader et al., 1996, Wolffram et al., 1995].

Über die Resorption und den Metabolismus von Hydroxybenzoesäuren ist aufgrund des begrenzten Vorkommens in Nahrungsmitteln wenig bekannt [Tomas-Barberan und Clifford, 2000]. Die wenigen Studien, die es jedoch gibt, schreiben insbesondere der Gallussäure eine gute Bio-

verfügbarkeit zu [Manach et al., 2005]. Im Plasma wurde freie und glukuronidierte Gallussäure gefunden, wobei als Hauptmetabolit 4-*O*-Methylgallussäure identifiziert wurde [Manach et al., 2005].

Bislang ist wenig über die komplexe Bioverfügbarkeit der Ellagtannine in der Literatur beschrieben [Borges et al., 2007; Cerdá et al., 2005; Cerdá et al., 2004]. Espín et al. (2007) postulierten als erste Arbeitsgruppe den komplexen Metabolismus der Ellagtannine *in vivo*. Sie beobachteten, dass mit ellagtanninhaltigen Eicheln gefütterte Iberische Schweine Ellagtannine im Jejunum zu Ellagsäure abbauen, während diese dann durch die intestinale Darmflora metabolisiert wird. Dabei entstehen überwiegend Dibenzopyran-6-on(Urolithin)-Metabolite. Insgesamt wurden in Plasma, Urin, Gallenflüssigkeit, Fäzes und Darmgewebe 31 abgeleitete Ellagtanninmetabolite detektiert (25 Urolithin- und 6 Ellagsäurederivate). Insbesondere wurden Glukuronide und Methylglukuronide der Ellagsäure und Urolithinderivate in der Gallenflüssigkeit bestimmt, was darauf schließen lässt, dass sie einem aktiven enterohepatischen Kreislauf unterliegen. Eine Akkumulation der Metabolite in Organen wie Lunge, Gehirn, Leber und Niere wurde nicht festgestellt [Espín et al., 2007].

2.4.1.2 **Biologische Wirkung von Phenolcarbonsäuren und ihren Derivaten**

Phenolsäuren sind bereits während der Zubereitung von Nahrungsmitteln und auch im Gastrointestinaltrakt in der Lage, die Bildung von Mutagenen bzw. Kanzerogenen zu unterdrücken. Die antikanzerogene Wirkung von Phenolsäuren beruht größtenteils darauf, dass sie direkt mit dem aktivierten Kanzerogen in Wechselwirkung treten und kovalente Bindungen eingehen. Phenolsäuren können sowohl die Initiation als auch die Promotion der Kanzerogenese hemmen. Beispielsweise verhindern Chlorogensäure und Gallussäure über die Hemmung von Phase-I-Enzymen die Aktivierung von Prokanzerogenen. Im Besonderen Cytochrom-P450-abhängige Enzyme katalysieren diese Umwandlung. Chlorogensäure und Kaffeesäure stellen *in vitro* Antioxidantien dar [Rice-Evans et al., 1996; Castelluccio et al., 1995] und können die Bildung von mutagenen und karzinogenen *N*-Nitrosoverbindungen hemmen [Kono et al., 1995]. Weiterhin verhindert Chlorogensäure *in vitro* wie auch im Tiermodell die Entstehung oxidativer DNA-Schäden. Dies ist anhand der verminderten Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanosin sowie von DNA-Strangbrüchen beobachtet worden [Kasai et al., 2000; Shibata et al., 1999]. Die Oxidation der Low Density Lipoproteine wird als bedeutender Schritt bei der Entstehung „arterieller Plaques“ angesehen. Chlorogensäure und Kaffeesäure können zusammen mit körpereigenen Abwehrmechanismen diese Oxidation verhindern und damit einen Schutz gegen kardiovaskuläre Erkrankungen bieten [Nardini et al., 1995; Laranjinha et al., 1994].

Im Tierversuch hemmt Ellagsäure nach oraler Gabe chemisch induzierten Speiseröhren- und Lungenkrebs [Castonguay et al., 1997]. Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten, dass sowohl die Initiation als auch die Promotion der Kanzerogenese gehemmt wird. Ellagsäure unterbindet die Kanzerogenese in der Initiationsphase vermutlich dadurch, dass sie die Bindung von aktivierten Kanzerogenen an die DNA verhindert [Lin et al., 2000]. Ferner kommt es zur Hemmung von Phase-I-Enzymen, zur Induktion von Phase-II-Enzymen und zu antioxidativen Effekten. Die Induktion der Aktivität von Phase-II-Enzymen (z. B. Glutathion-S-Transferase) durch Ellagsäure sowie deren vermehrte *de novo* Synthese in der Leber wurde im Tierversuch nachgewiesen. Das antioxidative Potential der Ellagsäure wurde bislang nur *in vitro* gezeigt. Durch den Einfang reaktiver Sauerstoffspezies werden oxidative DNA-Schäden verhindert [Ross et al., 2007; Seeram et al., 2006; Mertens-Talcott et al., 2006; Losso et al., 2004].

Ellagtannine werden in der traditionellen Heilkunde in asiatischen Ländern zur Behandlung diverser Krankheiten (z. B. Herz-Kreislaufkrankungen, Bluthochdruck, rheumatoide Arthritis, Wechseljahresbeschwerden) eingesetzt. Für Ellagtannine und Ellagsäure wurde bereits gezeigt, dass sie antiproliferative, proapoptotische und antioxidative Effekte *in vitro* vermitteln [Ross et al., 2007; Seeram et al., 2006; Mertens-Talcott et al., 2006; Losso et al., 2004]. Auch antimikrobielle, herbizide und antivirale Eigenschaften der Ellagtannine sind bekannt [Cerdá et al., 2005; Clifford und Scalbert, 2000]. Jacob et al. (2007) untersuchten einen ellagtanninreichen Granatapfelsaft und schrieben diesem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antioxidative, antiinflammatorische, antiarteriosklerotische und antikanzerogene Wirkungen zu [Jacob et al., 2007].

2.4.2 Flavonoide

Die Gruppe der Flavonoide (lat.: flavus = gelb) zählt in der Natur zu den am häufigsten vorkommenden Polyphenolen und besitzt als Grundkörper ein Phenylpropanderivat (Abb. 22) [Harborne, 1994].

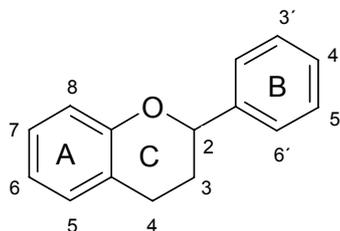


Abb. 22 C₁₅-Grundgerüst des Flavans

Grundsätzlich bestehen Flavonoide aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A und B) sowie einem *O*-heterozyklischen Ring (C) (Abb. 22). In der Natur treten die meisten Flavonoide nicht frei in Form ihres Aglykons auf, sondern liegen glykosidisch gebunden vor [Stahl et al.,

2003; Hollman et al., 1997; Harborne, 1994]. Die Glykosylierung trägt dazu bei, dass ihre Löslichkeit im Pflanzensaft erhöht wird und stabilisiert die Flavonoide gegenüber einem UV-bedingten enzymatischen Abbau [Aherne und O'Brien, 2002]. Eine Ausnahme bilden lediglich die Flavan-3-ole, die in der Natur hauptsächlich als Aglyka vorkommen. Der Gehalt an Flavonoiden schwankt je nach Pflanzensorte und Klima, wobei sich die Flavonoide überwiegend in den Randschichten von Pflanzen sowie den äußeren Blättern befinden. Als zellsaftlösliche Pigmente verleihen sie bestimmten Pflanzenteilen (z. B. Blüten oder Früchten) ihre charakteristische Farbe [Harborne und Williamson, 2000]. Weiterhin schützen sie die Pflanze vor Fressfeinden und dem Befall durch Pathogene. Die Aglyka der Flavonoide werden nach dem Oxidationsgrad ihres zentralen Pyranrings (C) in folgende Substanzklassen unterteilt [Watzl und Rechkemmer, 2001]:

- Flavonole
- Isoflavone
- Flavanone
- Flavone
- Anthocyanidine
- Flavan-3-ole (Catechine, Procyanidine)

Substanzen der einzelnen Flavonoidklassen unterscheiden sich sowohl in Anzahl an Hydroxy- und Methoxysubstituenten als auch in Art, Anzahl und Anordnung der nicht-acylierten und acylierten Zuckerreste. Durch diese strukturelle Vielfalt sind derzeit über 5000 verschiedene Flavonoide beschrieben [Harborne und Williams, 2000].

Die Biosynthese von Flavonoiden erfolgt durch stufenweise Kondensation der aromatischen Aminosäure Phenylalanin mit drei aktivierten Malonsäuren. Hierbei entstehen durch 1,6-Cyclisierung zunächst die Chalkone, aus denen durch Folgereaktionen (u. a. Hydroxylierungen) die nachfolgenden Flavonoide gebildet werden [Salunke et al., 1994].

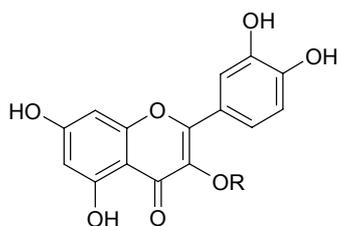
Aufgrund epidemiologischer Studien wie z. B. der „Zutphen-Elderly“-Studie [Hertog et al., 1993] oder der „Finnish Mobile Clinic“-Studie [Knekt et al., 1996/2002] werden Flavonoiden aus Früchten und Gemüse mit positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften in Verbindung gebracht [Erlund, 2004]. So werden ihnen antikanzerogene, antioxidative, antivirale, antimikrobielle, antiatherogene, antiinflammatorische, antiallergene immunstimulierenden und zellprotektive Wirkungen zugesprochen [Manch et al., 2004; Howell et al., 2002; Da Silva et al., 2000; Scalbert und Williamson, 2000; Middleton et al., 2000; Rice-Evans et al., 1996; Hertog et al., 1992]. Im Wesentlichen beruhen die gesundheitsförderlichen Eigenschaften jedoch auf dem Einfang freier Radikale und zeichnen sich durch folgende Strukturmerkmale aus [Bors et al., 1999; Bors et al., 1990]:

- o-Dihydroxystruktur (Catecholstruktur) im B-Ring für den Radikalangriff
- Doppelbindung in Position 2,3 in Kombination mit einer 4-oxo-Gruppe für eine effiziente Elektronendelokalisation zur Stabilisierung des Flavonoidradikals
- Gleichzeitige Anwesenheit einer 3'-OH und einer 4'-OH-Gruppe ebenfalls zur Erhöhung der Stabilität des Flavonoidradikals

In Europa stellen Äpfel eine signifikante Flavonoidquelle für die humane Ernährung dar [Arts et al., 2001; Knekt et al., 1997]. Epidemiologische Studien konnten bereits zeigen, dass der regelmäßige Konsum von Äpfeln mit einem reduzierten Risiko für Lungenkrebs korreliert [Feskanich et al., 2000; Knekt et al., 1997]. Bislang wurden in Äpfeln zahlreiche Substanzklassen von Polyphenolen identifiziert: Hydroxyzimtsäuren, Flavan-3-ole, Flavonole, Procyanidine und Dihydrochalkone [Alonso-Salces et al., 2004; Lu und Foo, 1997; Miller et al., 1995]. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten, polyphenolreichen Apfelextrakte werden nachfolgend kurz dargestellt. Die entsprechenden Tabellen befinden sich im Methodenteil dieser Arbeit.

Die Apfelsaftextrakte AE02, AE04 und AE05 bestehen zu einem großen Anteil aus den Hydroxyzimtsäuren Chlorogensäure und 4-Cumaroylchinasäure. Der AE02 ist im Vergleich zu den anderen Apfelextrakten durch einen erhöhten Gehalt an Phloretinxyloglykosid (Dihydrochalkon) und (-)-Epicatechin (Flavan-3-ol) charakterisiert. Der Tresterextrakt AE03B unterscheidet sich von den Apfelsaftextrakten in seiner Polyphenolzusammensetzung durch einen signifikant erhöhten Gehalt an Quercetinglykosiden und Dihydrochalkonen. Grundsätzlich bestehen die vier beschriebenen Apfelextrakte aus Dihydrochalkonen, Flavonolen (Quercetinderivate), Flavan-3-olen, Procyanidindimeren sowie unveresterten (z. B. Kaffeesäure) und veresterten Hydroxyzimtsäuren [Will et al., 2000]. Der Polyphenolzusammensetzung der aufgeführten Apfelextrakte (AE02, AE03B, AE04, AE05) entspricht auch das Polyphenolmuster der sortenreinen Apfelextrakte (Tab.13).

Die meist gelben Flavonole besitzen jeweils als Grundkörper ein Flavan, das an C4-Position eine Oxo-Gruppe trägt und sind in C3-Stellung hydroxyliert. Aufgrund ihrer gelben Färbung sind sie bedeutende Farbstoffe zahlreicher heimischer Obst- und Gemüsearten [Manach et al., 2004]. Die hellgelben Flavonolglykoside sind hauptsächlich in der Schale von Obst und Gemüse anzutreffen, da ihre Bildung lichtabhängig ist. Das wichtigste Aglykon der Flavonolglykoside in Früchten ist das Quercetin (Abb. 23).



Flavonole	R
Quercetin	H
Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	β -D-glc
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	β -D-gal
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	β -L-rha
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	β -L-rha- β -glc

Abb. 23 Quercetin und ausgewählte Quercetinglykoside

Die Catechine (Flavan-3-ole) sind als hydrierte Flavone aufzufassen und gehören zu einer Gruppe farbloser Verbindungen. Als (+)-Catechin nehmen sie eine [2R, 3S]-Konformation ein und als (-)-Epicatechin eine [2S, 3S]-Konformation (Abb. 24). Sie kommen in allen heimischen Früchten vor und bilden die Grundstruktur einer Reihe natürlicher Gerbstoffe (z. B. im Grünen Tee) [Scalbert und Williamson, 2000].

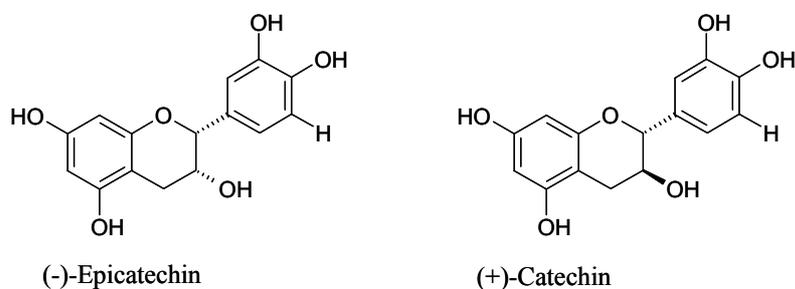


Abb. 24 (-)-Epicatechin und (+)-Catechin

Catechine, die als Di-, Oligo- oder Polymere des (+)-Catechin und des (-)-Epicatechin auftreten, werden als Procyanidine bezeichnet (Abb. 25; Abb. 26). Procyanidine unterscheiden sich von den meisten anderen Polyphenolen durch ihre oligomere bzw. polymere Struktur und ihr hohes Molekulargewicht. Die häufig verwendete Bezeichnung Proanthocyanidin leitet sich von der Eigenschaft ab, dass die Procyanidine bei Erhitzung mit Säuren und in Anwesenheit von Sauerstoff in die entsprechenden Anthocyanidine übergehen [Haslam, 1997].

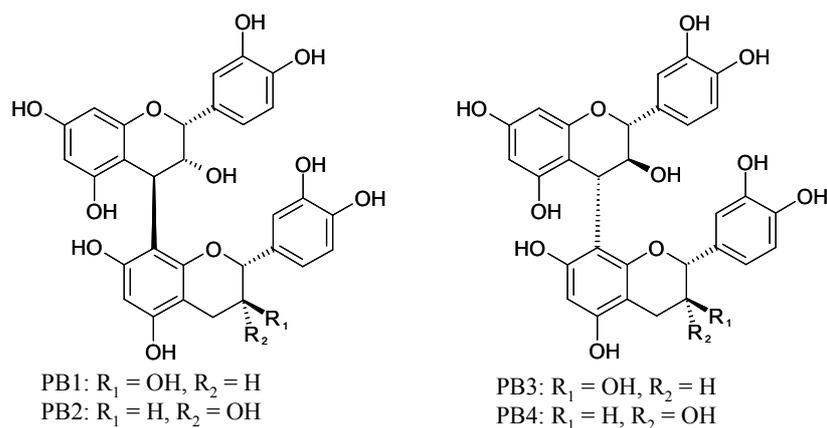


Abb. 25 Procyanidindimere PB1-PB4

Die häufigsten Verknüpfungen monomerer Flavanele zu dimeren (Abb. 25), oligomeren (Abb. 26) und polymeren Procyanidinen werden zwischen C4 und C8 gebildet, wobei zusätzlich zwischen den Stereoisomeren α oder β unterschieden wird.

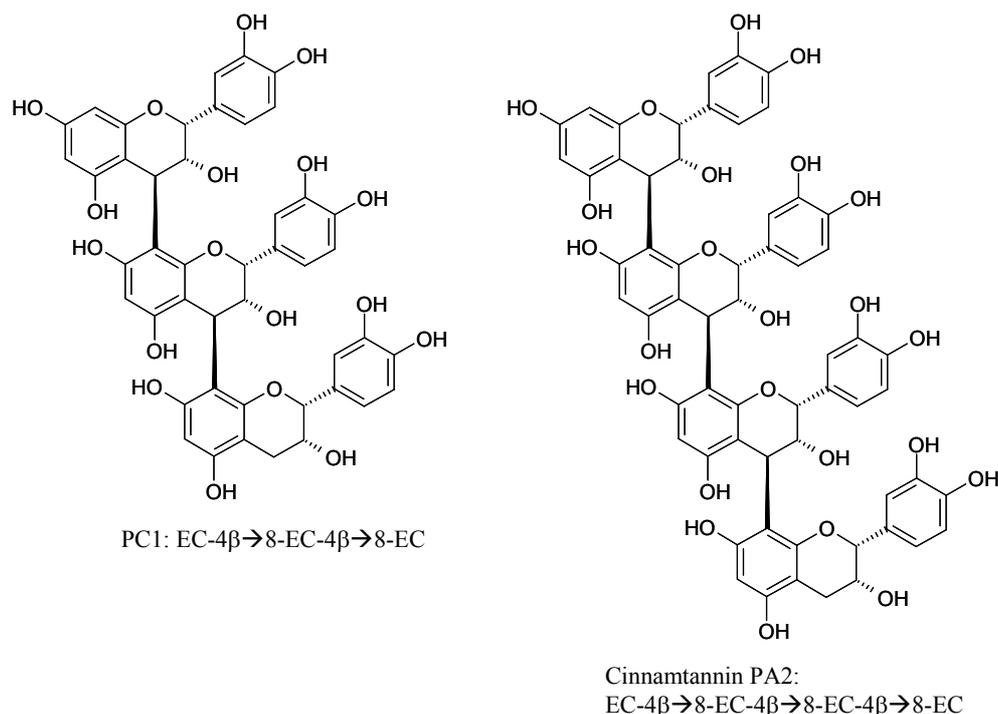
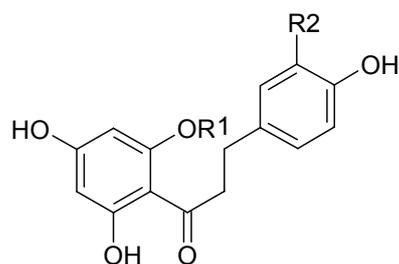


Abb. 26 PC1: Procyanidintrimer; PA2: Procyanidintetramer

Die vielen Kombinationsmöglichkeiten der Procyanidine durch Verknüpfung, Stereochemie und dem Grad der Oligo- bzw. Polymerisierung unterliegen einer großen strukturellen Vielfalt [Dixon et al., 2005]. Infolge der zahlreichen Hydroxygruppen besitzen die Procyanidine gerbende Eigenschaften. Procyanidine kommen in Früchten, Rinde, Blättern und Samen vieler Pflanzen vor und treten dadurch auch in verarbeiteten Nahrungsmitteln wie Fruchtsäften, Wein, Bier, Tee und

Kaffee auf. Auch das schwach gelbe Dihydrochalkon Phloretin und seine Glykoside, insbesondere das Phloridzin, sind charakteristische Apfelinhaltsstoffe (Abb. 27).



Dihydrochalkone	R1	R2
Phloretin	H	H
Phloretin-2-xyloglukosid	Xyloglukosid	H
Phloridzin	β-D-Glukosid	H
3-Hydroxyphloridzin	H	OH

Abb. 27 Phloretin und ausgewählte Phloretinglykoside

2.4.2.1 Biologische Wirkungen von Apfelpolyphenolen

2.4.2.1.1 *In vitro* Untersuchungen

“An apple a day, keeps the doctor away.” dieser Slogan ermutigte zahlreiche Wissenschaftler den Einfluss von Apfelpolyphenolen hinsichtlich ihrer chemoprotektiven Eigenschaften zu untersuchen und die „magischen“ Apfelinhaltsstoffe näher zu charakterisieren. Generell zeigt die Apfelschale ein stärkeres antioxidatives und antiproliferatives Potential als das Fruchtfleisch des Apfels [Wolfe et al., 2003a; Wolfe et al., 2003b; Eberhardt et al., 2000], was daraufhin deutet, dass die Schale des Apfels den größten Anteil an bioaktiven Verbindungen stellt.

Im Verlauf der Kanzerogenese kommt es infolge eines Ungleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose zu einem unkontrollierten Zellwachstum, dem die Ausbildung von Tumoren folgt. Als Hemmstoffe proliferationsassoziierter Signalkaskaden können Flavonoide die Signaltransduktion inhibieren und Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation nehmen. Im Folgenden werden exemplarisch Hemmeffekte von Apfelextrakten und Apfelpolyphenolen auf Zielelemente intrazellulärer Signalwege aufgelistet, deren Hemmung möglicherweise einen Beitrag zur Unterdrückung des Zellwachstums leistet. Der EGFR, der zur Familie der RTK zählt und zu Beginn der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade steht, spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellwachstums und ist in vielen Tumorzellen verstärkt aktiv [Lewis et al., 1998; Marais et al., 1996].

Polyphenolreiche Apfelextrakte (AE02, AE03B) sowie ausgewählte Apfelpolyphenole wurden bereits als potente Inhibitoren des EGFR im zellfreien System identifiziert [Fridrich et al., 2007a; Kern et al., 2005]. Ebenso wurden der ErbB2-Rezeptor, der IGF1R (insulinähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor) und der VEGFR2/3 (vaskulärer endotheler Wachstumsfaktorrezeptor) im zellfreien System durch einen Apfeltresterextrakt (AE03B) oder einen sortenreinen Apfelsaftextrakt (Bohnapfel) potent gehemmt [Nicole Teller, persönliche Mitteilung]. Zahlreiche *in vitro* Befunde zeigen, dass Apfelextrakte und charakteristische Apfelinhaltsstoffe das Wachstum von humanen Tumoren hemmen [Miura et al., 2008; Miura et al., 2007; Verriah et al., 2007; He et al. 2007; Kern et al., 2006; Verriah et al., 2006; Balavenkatraman et al., 2006; Kern et al., 2005; Gossé et al., 2005; Liu et al., 2003a; Wolfe et al., 2003a; Sun et al., 2002, Eberhardt et al., 2000].

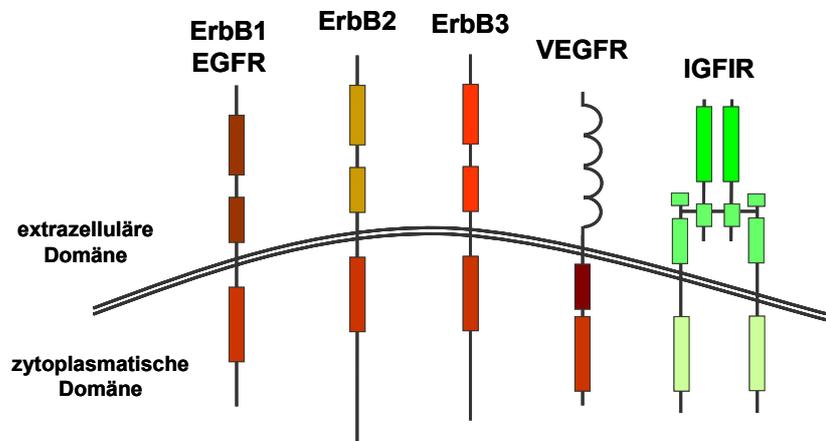


Abb. 28 Rezeptortyrosinkinase (EGFR: epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; IGF1R; insulinähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor; VEGFR: vaskulärer endotheler Wachstumsfaktorrezeptor)

Auch im zellulären Testsystem an HT29-Zellen (humane Kolonkarzinomzelllinie) führte die Inkubation mit Apfelsaftextrakt (AE02) zur Hemmung der EGFR-Aktivität sowie der nachgeschalteten MAPK-Kaskade und des Zellwachstums [Kern et al., 2005]. Demzufolge wird eine Unterdrückung des Rezeptors mit einer Hemmung des Tumorzellwachstums über den MAPK-Signalweg in Verbindung gebracht, wobei die aktiven Wirkkomponenten der Apfelextrakte bislang aber noch unbekannt sind. Auch die Inkubation der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 mit AE02 führte zur Unterdrückung des Zellwachstums und zur Hemmung der EGFR- und ErbB2-Rezeptoraktivität [Nicole Teller, Diplomarbeit 2006 bzw. persönliche Mitteilung]. Die Hemmwirkung des Extraktes auf den ErbB2-Rezeptor kann dabei weder auf das im AE02 enthaltene typische Apfelpolyphenol Phloridzin noch auf dessen Aglykon Phloretin zurückgeführt werden. Auch Quercetin, das bislang zwar nur in Form seiner Glykoside im AE02 identifiziert wurde, zeigte nur eine marginale Rezeptorhemmung [Fridrich et al., 2008b]. Ebenso unterdrückt der Bohnapfelsaftextrakt (mit Katalasezusatz) die Aktivität der immunopräzipitierten Rezeptortyro-

sinkinasen VEGFR2/3 aus PAE (Schweineaortenendothelzellen)-Zellen [Nicole Teller, persönliche Mitteilung]. Da Apfelpolyphenole in der Lage sind, mit noch unbekanntem Bestandteilen des Zellkulturmediums Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu generieren, wurde in Gegenwart von Katalase inkubiert, um einer H_2O_2 -Bildung im Medium entgegenzuwirken.

Durch sogenannte „Crosstalks“ können Elemente der MAPK-Kaskade auch durch andere Signalwege moduliert werden. So kann die Serin-/Threoninkinase Raf-1 durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg oder durch die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden [Clark et al., 2004]. Kern et al. (2007a) zeigten bereits, dass der AE02 die PKC-Aktivität im zellfreien Testsystem unterdrückt. In intakten Zellen wird die Aktivität der PKC zwar nicht primär gehemmt, scheint jedoch im Rahmen apoptotischer Prozesse beeinflusst zu werden. Caspase-3-Aktivierung, DNA-Fragmentierung und der Wiederanstieg der PKC-Aktivität weisen nach Zellinkubation mit AE02 daraufhin, dass eine PKC-vermittelte Induktion intermediär als Teil der Apoptose verstanden werden kann [Kern et al., 2007a]. Zu den Apoptose blockierenden Signalwegen zählt u. a. auch die PI3K-Signalkaskade, der sogenannte „Survival-Pathway“. Die Proteinkinase B (PKB) ist das zentrale Effektorprotein der PI3K-Signalkaskade, das durch Phosphorylierung aktiviert wird und nachgeschaltet die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β) sowie die Transkriptionsfaktoren der Forkheadfamilie (FKHR)-Familie phosphoryliert [Cantley, 2002]. Sowohl die Aktivität der GSK3 β als auch der FKHR-Transkriptionsfaktoren wird durch PKB-vermittelte Phosphorylierung gehemmt, so dass die Weiterleitung apoptotischer Signale unterdrückt wird. Für die Phosphorylierung der PKB sowie nachgeschaltet für die GSK3 β -Phosphorylierung wurde dabei gezeigt, dass sich durch Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 pro- und antiapoptotische Stimuli überlagern. Auf Ebene der FKHR-Transkriptionsfaktoren wurde durch den AE02 keine Apoptoseinduktion vermittelt [Ute Böttler, Diplomarbeit 2006].

Auch der Wnt-Signalweg übernimmt eine wichtige Rolle in der Kolonkanzerogenese, da durch Interaktion mit Elementen dieses Signalweges proliferationsfördernde und somit unerwünschte Effekte ausgelöst werden können (Abb. 29). Durch den Apfelsaftextrakt AE02 wurden jedoch in verbraucherrelevanten Konzentrationen keine wachstumsstimulierenden Effekte in HT29-Zellen vermittelt. Die Zellinkubation mit AE02 führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Hemmung der zellulären GSK3 β -Aktivität. Damit einher ging die signifikante Abnahme an phosphoryliertem β -Catenin. Gleichzeitig nahm aber unerwarteterweise der Gehalt an Gesamt- β -Catenin ab. Aufgrund der Ergebnisse wurde daher angenommen, dass der AE02 in humanen Kolonkarzinomzellen keinen Wachstumsstimulus über den Wnt-Signalweg induziert und somit wegen der Reduktion der Expression von β -Catenin eher antiproliferative Effekte des AE02 zu erwarten

sind [Kern et al., 2006]. Im Einklang mit den Ergebnissen auf die β -Catenin-Homöostase wird auch die Tcf/Lef-vermittelte Gentranskription durch AE02 nicht beeinflusst [Kern et al., 2006].

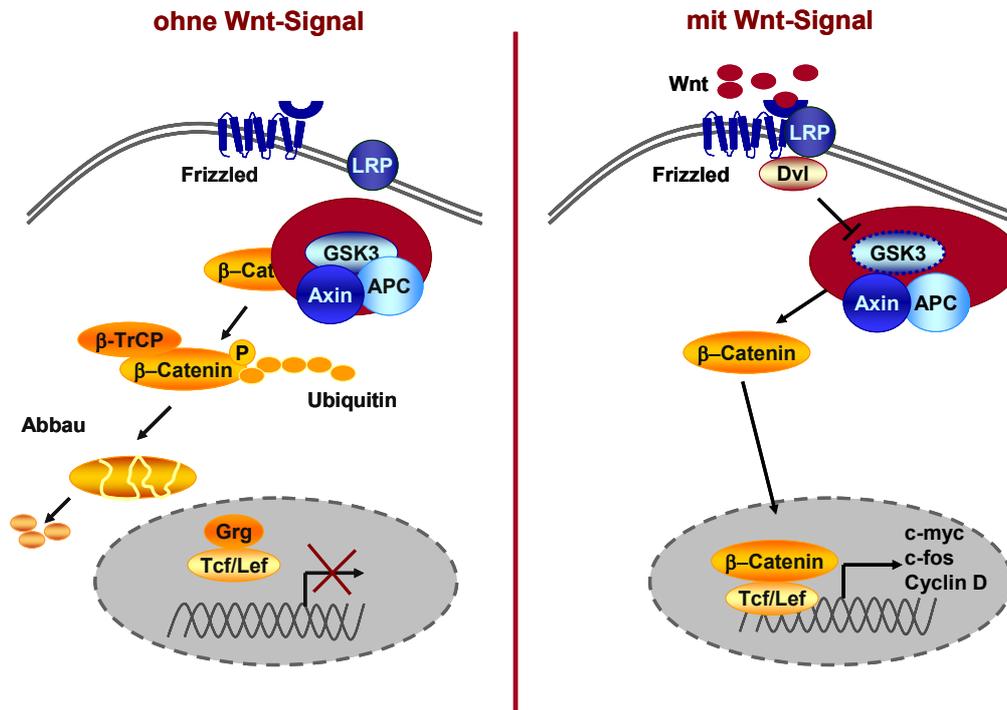


Abb. 29 Der Wnt-Signalweg [modifiziert nach Oving und Clevers, 2002] A) ohne Wnt-Signal; B) nach Wnt-Signalbindung; APC, „adenomatous polyposis coli“ Tumorsuppressorgen; c-fos, c-myc Onkogene; Dkk, Faktor Dickkopf; Dvl, „dishevelled“ Protein; GBP, GSK3-bindendes Protein; Grg, Protein der Groucho-Familie; GSK3, Glykogensynthasekinase 3; LRP, Lipoproteinrezeptor-verwandte Protein; Tcf/Lef, „T-cell factor/lymphocyte enhancer factor“ Transkriptionsfaktorfamilie; TrCP, F-Box Protein

Veeriah et al. (2006) berichteten, dass die Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit AE02 zur Veränderung der Expression verschiedener Enzyme des Fremdstoffmetabolismus führt. Hierbei war im Besonderen eine Erhöhung von Transkripten, die in den Phase II Metabolismus involviert sind, wie Glutathion-S-Transferasen (GST) und UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT), zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Apfelpolyphenole somit in zelluläre Abwehrmechanismen eingreifen und dadurch potentiell die Verweilzeit von Karzinogenen in der gesunden Kolonmukosa reduziert wird. Auch in der humanen Kolonadenomzelllinie LT97, die durch präneoplastische Läsionen charakterisiert ist, wurden in Gegenwart eines Apfelextraktes die Enzymaktivitäten von GST und UGT moduliert [Veeriah et al., 2008]. Die durch Apfelextrakt veränderten Expressionsmerkmale der Gene deuten somit auch bereits in Adenomzellen auf einen möglichen Schutz der Zellen gegen toxische Einflüsse hin. Somit scheinen Apfelpolyphenole im Rahmen einer polyphenolreichen Ernährung einen Beitrag zur Chemoprotektion zu leisten. Der Mechanismus ist bislang aber noch unklar [Veeriah et al., 2008].

2.4.2.1.2 Fermentation von Apfelextrakten

Die kurzkettige Fettsäure Butyrat stellt einen wichtigen Nährstoff der Kolonmukosa dar und führt in humanen Kolonkarzinomzellen zu Differenzierung und Apoptose. Die Hemmung der Histondeacetylase (HDAC) scheint im Rahmen dessen eine wichtige Rolle zu spielen. Polymere Kohlenhydrate wie Pektine, die gegenüber einem Verdau durch die Dünndarmflora resistent sind, fungieren als Substrate der Butyratbildung der mikrobiellen Flora des Dickdarms. Nach Inkubation des humanen Fäzeswassers mit Apfelpektinen und/oder Apfelsaftextrakt wurden die Fermentationsüberstände als butyratreich identifiziert und führten zur Hemmung der HDAC [Waldecker et al., 2008]. Im Gegensatz dazu zeigte die Fermentation mit ausschließlich Apfelsaftextrakt geringere Butyratkonzentrationen, aber eine vergleichbare HDAC-Hemmung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Butyrat, das durch Fermentation von Apfelpektinen durch die Dickdarmflora gebildet wird, einen potenten Inhibitor der HDAC darstellt, während die Fermentation von Apfelpektinen in Kombination mit Apfelsaftextrakt zur Bildung von Butyrat und anderen noch unbekanntem HDAC-Hemmstoffen führt [Waldecker et al., 2008].

In Untersuchungen von Veeriah et al. (2007) führte die *in vitro* Fermentation von Apfelextrakten zu einem Anstieg an kurzkettigen Fettsäuren und zu einem Abbau von Polyphenolen [Veeriah et al., 2007]. Im Vergleich zur Hemmung des Tumorzellwachstums durch unfermentierte Apfelextrakte zeigte sich ein Verlust der chemoprotektiven Eigenschaften der Extrakte. Die fermentierten Apfelextrakte waren ca. um das 3-fache weniger bioaktiv.

Das Cytochrom P450 (CYP) 1A1 metabolisiert u. a. chemische Karzinogene wie polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe zu karzinogenen Metaboliten. Die Regulation der Expression von CYP1A1 erfolgt durch den Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (AhR). Untersuchungen von Pohl et al. (2006) zeigten, dass der Apfelsaftextrakt AE02 einer TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)-vermittelten CYP1A1-Induktion entgegenwirkt. Dabei kommt es zu einer Unterdrückung der AhR-abhängigen Gentranskription und zu einer Hemmung der katalytischen CYP1A1-Aktivität, so dass die metabolische Aktivierung von bestimmten chemischen Karzinogenen durch Apfelpolyphenole verringert wird [Pohl et al., 2006].

Im Besonderen scheint auch das antioxidative Potential einzelner Apfelpolyphenole einen Beitrag zu den chemoprotektiven Eigenschaften der Apfelextrakte zu leisten. Schäfer et al. (2006a) zeigten, dass polyphenolreiche Apfelextrakte zu einer Verminderung von oxidativen DNA-Schäden in HT29- und Caco2-Zellen (beides humane Kolonkarzinomzellen) beitragen, die durch den Redoxzykler Menadion induziert wurden. Innerhalb der Apfelextrakte verringerte im Besonderen der Apfeltrestereextrakt AE03B die Anzahl an oxidativen Schäden. Auch die Inhaltsstoffe Rutin, (-)-Epicatechin und Kaffeesäure zeigten eine erhöhte biologische Wirksamkeit gegenüber oxida-

tiven DNA-Schäden [Schäfer et al., 2006a]. In weiteren Untersuchungen konnten künstliche Mischungen ausgewählter Apfelpolyphenole zelluläre DNA-Schäden sogar effizienter reduzieren als die Orginalextrakte [Schäfer et al., 2006b].

Im Rahmen der Kanzerogenese scheint auch die Hypermethylierung der Promotorregion proliferationsassoziierter Gene von Relevanz zu sein, die zur Stilllegung von Genexpression und Genfunktion führt [Langer et al., 2006; Ohgaki und Kleihues, 2005; Ueki et al., 2002]. Untersuchungen von Fini et al. (2007) zeigten, dass durch einen Apfelextrakt aus Annurca Äpfeln ein demethylierender Effekt eintrat, so dass die Hypermethylierung in der Promotorregion von Tumorsuppressorgen aufgehoben wurde und es zur Reaktivierung der Genexpression kam.

2.4.2.1.3 In vivo Untersuchungen

Bisherige Untersuchungen an Ratten legen nahe, dass nur naturtrüber Apfelsaft die Bildung früher Stadien von Dickdarmkrebs unterdrückt, nicht jedoch der entsprechende Klarsaft [Barth et al., 2005]. Dies ist möglicherweise auf die höheren Polyphenolgehalte in trüben Apfelsäften zurückzuführen [Oszmianski et al., 2007]. Barth et al. (2005) zeigten, dass durch 1,2-Dimethylhydrazin induzierte, genotoxische Schäden in Mukosazellen des distalen Kolons von Ratten durch naturtrüben Apfelsaft gehemmt werden. Ebenso scheint der naturtrübe Apfelsaft im Vergleich zum klaren Apfelsaft die Anzahl an aberranten Kryptofoci im distalen Rattenkolon zu reduzieren [Barth et al., 2007].

In der Literatur werden Apfelextrakten zahlreiche weitere gesundheitlich protektive Eigenschaften zugeschrieben. Durch orale Gabe eines Apfeltresterextraktionsaftes wurden in Tierstudien an Ratten positive ernährungsphysiologische Effekte beobachtet [Sembries et al., 2006]. Dies äußerte sich u. a. darin, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt primäre Gallensäuren und Cholesterol sowie deren Metabolite ausgeschieden wurden. Auch konnten im Kolon der mit Extraktionsaft gefütterten Ratten erhöhte Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren nachgewiesen werden, die protektive Eigenschaften gegen Kolontumore zeigen. Ebenfalls wurde durch Apfelpolyphenole die adipöse Gewebebildung in Wistar Ratten gehemmt, wobei jedoch keine appetitzügelnde Reaktion beobachtet wurde [Nakazato et al., 2006]. Ebenso berichten Nakazato et al. (2007), dass Apfelpolyphenole zur Verbesserung der Muskel-funktion in Wistar Ratten führen können. Dabei vermuten sie, dass Apfelpolyphenole einerseits Einfluss auf den oxidativen Metabolismus nehmen und somit die Ermüdungsresistenz erhöhen und andererseits die Muskelfasern vor oxidativem Stress schützen [Nakazato et al., 2007]. Weiterhin zeigten Enomoto et al. (2006) in einer Humanstudie, dass Apfelpolyphenole einen Beitrag zur Linderung der Symptome bei allergischer Rhinitis leisten.

2.4.2.1.4 Aktive Wirkkomponenten von Apfelextrakten in vitro und in vivo

Zeßner et al. (2008) untersuchten einen Apfelsaftextrakt und seine Fraktionen in unterschiedlichen Testsystemen, um Apfelinhaltsstoffe mit potentiellen chemopräventiven Eigenschaften zu erfassen. Im Rahmen dieser Testsysteme wurden antioxidative Effekte, Modulationen des Kanzerogenese-metabolismus, antinflammatorische und antihormonelle Aktivitäten sowie das antiproliferative Potential bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse identifizierten Zeßner et al. (2008) Procyanidine als potente Substanzklasse innerhalb der Apfelpolyphenole. Bezüglich des chemopräventiven Potentials von Apfelextrakten scheinen Procyanidinfraktionen allein oder in Kombination mit Verbindungen von geringem Molekulargewicht von Relevanz zu sein. Diese Daten stehen in Einklang mit weiteren Untersuchungen, die Procyanidine als Antioxidantien und Radikalfänger beschreiben und ihnen zytotoxische und apoptoseinduzierende Effekte in Tumorzelllinien zusprechen [Gossé et al., 2006; Medina et al., 2006; Gossé et al., 2005; Tourino et al., 2005]. Im Einzelnen zeigten Gossé et al. (2005/2006), dass procyanidinreiche Apfelfraktionen das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW620 hemmen und im Rahmen intrazellulärer Signalwege die Expression der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2, der c-Jun N-terminalen Kinase erhöhen und die Aktivität der Proteinkinase C unterdrücken. Ferner kommt es zur Hemmung der G2/M-Phase des Zellzyklus und einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität. Auch Miura et al. (2008) und Nomoto et al. (2004) publizierten, dass Procyanidine apoptoseinduzierende Effekte vermitteln und diese über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg ausgelöst werden. Weiterhin beobachteten Gossé et al. (2005), dass procyanidinreiche Apfelfraktionen bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (0,01 % im Trinkwasser) signifikant die Anzahl von hyperproliferierenden Krypten und aberranten Kryptofoci im Azoxymethan-induzierten Rattenkanzerogenesemodell um 50 % reduzierten, während Fraktionen aus monomeren Flavonoiden ineffektiv blieben.

Hümmer et al. (2008) zeigten, dass signifikante Unterschiede im Gesamtprocyanidingehalt von Apfelextrakten bestehen. Dabei scheint das Procyanidinprofil abhängig von der Verarbeitung des Apfelsaftes sein. Im Vergleich zu einem trüben Apfelsaft sind Procyanidingehalt und Oligomerisierungsgrad in einem Klarsaft signifikant verringert. Dies korreliert mit Daten von Gokmen et al. (1998), die ebenfalls beobachteten, dass es durch Aufreinigung eines naturtrüben Apfelsaftes zu einem auffälligen Procyanidinverlust kommt.

Sugiyama et al. (2007) konnten in Mäusen und humanen Probanden zeigen, dass oligomere Procyanidine aus Apfelpolyphenolen die Triglyceridabsorption hemmen, indem sie die Aktivität der Pankreaslipase unterdrücken. Dabei konnten sie beobachten, dass der Hemmeffekt mit steigendem Oligomerisierungsgrad zunimmt. Tsao et al. (2005) postulieren, dass Catechine bzw. Procy-

anidine in *in vitro* Untersuchungen einen wichtigen Beitrag zum antioxidativen Potential von Äpfeln leisten. Im Besonderen identifizierten sie (-)-Epicatechin und das dimere Procyanidine B2 als die potente Antioxidantien in Äpfeln.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Apfelpolyphenole aufgrund ihrer vielfältigen, positiven Wirkungen, von denen nur einige wenige dargestellt wurden, im Rahmen der Chemoprävention einen Beitrag zu den protektiven Eigenschaften der Apfelextrakte leisten. Allerdings muss beachtet werden, dass *in vitro* Untersuchungen nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind. Um die gesundheitlich positiven Eigenschaften der Polyphenole auf den humanen Organismus zu extrapolieren, sind Kenntnisse über die Bioverfügbarkeit der Verbindungen zwingend erforderlich. Zudem sind Daten, die die Bioverfügbarkeit betreffen von großer Bedeutung, um unphysiologisch hohe Konzentrationen an Polyphenolen in *in vitro* Untersuchungen zu vermeiden.

2.4.2.2 Bioverfügbarkeit von Apfelpolyphenolen

Viele Polyphenole besitzen eine nur begrenzte systemische Verfügbarkeit. Allerdings können gerade bei geringer Resorptionsrate im Dünndarm lokale Konzentrationen entstehen, die eine biologische Aktivität erwarten lassen. Neben der aufgenommenen Menge an Flavonoiden wird die Bioverfügbarkeit durch Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung beeinflusst. Bei Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit müssen Alter, Geschlecht, Ernährungsbedingungen und genetische Dispositionen sowie Wechselwirkungen mit Lebensmittelinhaltsstoffen bzw. bestimmten Arzneimitteln berücksichtigt werden [Arts et al., 2002; Erlund, 2001]. Mit Ausnahme des Flavonols Quercetin ist die Bioverfügbarkeit der Flavonoide beim Menschen bisher nur ansatzweise untersucht [Hollman et al., 1997; Hollman und Katan, 1998].

Nach Verabreichung eines polyphenolreichen Apfelsaftes untersuchten Kahle et al. (2005b) die Ileostomaflüssigkeit von Patienten hinsichtlich des Polyphenolprofils. Dabei stellten sie fest, dass ein Großteil der oral verabreichten Apfelpolyphenole im Dünndarm resorbiert oder metabolisiert wird. Nicht metabolisierte Polyphenole (ca. 33 %) wurden in den Ileostomieausscheidungen nach 2 h bestimmt, die somit das Kolon unter physiologischen Bedingungen erreicht hätten [Kahle et al., 2005b; Kahle et al., 2006].

Untersuchungen von Hollman et al. (1995) zeigten, dass nach oraler Aufnahme von gedünsteten Zwiebeln (v. a. Quercetin-3-glukosid) durch gesunde Ileostomapatienten 52 % der applizierten Dosis resorbiert werden. Nach Applikation des Aglykons Quercetin lag die Resorption nur noch bei 24 %, während die Gabe von Rutin (Quercetin-3-rutinosid) die Resorption auf 17 % verringerte. Weitere Untersuchungen führten zu der Schlussfolgerung, dass Quercetin-3-glukosid aus Zwiebeln effizienter resorbiert wird als die Quercetinglykoside aus Äpfeln [Hollman et al., 1997], die vorrangig Glykoside in Form von Galaktosiden, Rhamnosiden und Arabinosiden enthalten

[Hollman und Arts, 2000; Robards et al., 1999]. Bezüglich der Bioverfügbarkeit des Quercetins scheint somit die Struktur des Zuckers von Relevanz zu sein, was weitere Studien bestätigten [Shimoi et al., 2003; Khaled et al., 2003, Mullen et al., 2002]. Aktuell zeigten Knaup et al. (2008), dass die humane intestinale Hydrolyse von Quercetinglykosiden abhängig vom glykosylierten Zucker und der mikrobiellen Darmflora ist. Kahle et al. (2005) identifizierten nach Gabe von Apfelsaft Quercetin-3-*O*-rhamnosid und Spuren von Quercetin-3-*O*-arabinosid in der Ileostomaflüssigkeit von Patienten. Allerdings wurden weder Quercetin-3-*O*-glukosid noch Quercetin-3-*O*-galaktosid noch Quercetin-3-*O*-xylosid bestimmt. Ebenso wurden keine Quercetinglukuronide oder -sulfate nachgewiesen [Kahle et al. 2006; Kahle et al., 2005].

Der erste Schritt des metabolischen Abbaus von Quercetinglykosiden ist die Hydrolyse seiner Zuckermoleküle im Dünndarm [Williamson et al., 2000]. Für die Resorption von Flavonolen und Flavonolglykosiden aus dem Dünndarm werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Erstens ein aktiver Transport durch den Na⁺-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 in die Enterozyten [Wolffram et al., 2002; Walgren et al., 2000], in denen durch eine in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisierte zytosolische β -Glukosidase eine hydrolytische Spaltung erfolgt [Day et al., 2003; Day et al., 1998]. Und zweitens die luminale Hydrolyse von Glykosiden durch die Laktase-Phloridzin-Hydrolase und Resorption des Aglykons durch passive Diffusion [Day et al., 2000; Day et al., 1998]. Generell sind im Blutplasma keine intakten Quercetinglykoside oder das Aglykon nachzuweisen, sondern ausschließlich Metabolite des Quercetins [Day et al., 2001; Wittig et al., 2001; Sesink et al., 2001, Graefe et al., 2001; Moon et al., 2000]. Nach Resorption des Quercetins aus dem Darmlumen erfolgt die Metabolisierung durch Phase II metabolisierende Enzyme wie UDP-Glukuronyltransferase (UGT), Phenolsulfotransferase und Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) [Kroon et al., 2004]. Als Hauptmetabolite des Quercetins identifizierten Day et al. (2001) Quercetin-3-*O*-glukuronide, 3'-*O*-Methylquercetin-3-*O*-glukuronide und Quercetin-3'-*O*-sulfat im humanen Plasma, wobei ungefähr 20-40 % des Quercetins in Position 3' methyliert vorliegen [Day et al., 2001; Graefe et al., 2001; Olthof et al., 2000]. Für die im Blut zirkulierenden Konjugate muss auch die Plasmaproteinbindung des Quercetins und seiner Metabolite berücksichtigt werden. So wurde für das Quercetinaglykon eine fast vollständige Bindung (95 %) an Serumalbumin nachgewiesen, so dass gegenwärtig unklar ist, inwieweit dadurch die Verfügbarkeit von Quercetin eingeschränkt wird [Boulton et al., 1998; Manach et al., 1995]. Charakteristisch für die Bioverfügbarkeit des Quercetins ist die relativ langsame Ausscheidung seiner Metabolite, für die eine Halbwertszeit von 11 bis 28 h angegeben wird [Manach et al., 2004]. Neben der Darmmukosa finden weitere Glukuronidierungen und Methylierungen auch in der Leber statt, wobei hier v. a. der Hauptort für die Bildung von Sulfokonjugaten zu sein scheint

[Piskula und Terao, 1998; Shali et al., 1991]. Ein großer Teil der Metabolite wird über die Galle ins Darmlumen sezerniert. Dort können sie partiell rückresorbiert werden und stehen somit dem enterohepatischen Kreislauf zur Verfügung [Manach et al., 1996; Crespy et al., 1999]. Ein weiterer Teil der Metabolite wird mit dem Urin ausgeschieden [Manach et al., 1996]. Allerdings scheint die Elimination über die Niere eine untergeordnete Rolle zu spielen [Hollman et al., 1995]. Crespy et al. (1999) beobachteten *in vitro* teilweise auch eine Resekretion von den in der Darmmukosa gebildeten Quercetinkonjugaten. Ob diese Sekretion über den MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) erfolgt und inwieweit dies auch *in vivo* von Relevanz ist, bedarf noch weiteren Untersuchungen [Walgren et al., 2000].

Flavonoide, Flavonoidglykoside und Flavonoidmetabolite, die nicht im Dünndarm absorbiert bzw. über die Galle resezerniert werden, gelangen in den Dickdarm und unterliegen dort einer intensiven mikrobiellen Verstoffwechslung [Hollman et al., 1999].

Die Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (EC) und (+)-Catechin werden nach Kuhnle et al. (2000) im Dünndarm *O*-methyliert und glukuronidiert. Im isolierten Rattendünndarm zeigten Breidenassel et al. (2004), dass (+)-Catechin und EC im Dünndarm in intakter Form resorbiert und zu Sulfat- und Glukuronidkonjugaten metabolisiert werden.

Natsume et al. (2003) identifizierten als Metabolite des EC im Blutplasma von Mensch und Ratte EC-3'-*O*-glukuronid, 4'-*O*-Methyl-EC-3'-*O*-glukuronid, 4'-*O*-Methyl-EC-5- oder 7-*O*-glukuronid, das EC-Aglykon und 4'-*O*-Methyl-EC. Im Gegensatz dazu detektierten Kahle et al. (2006) nach Gabe von (+)-Catechin und EC durch einen Apfelsaft weder freies (+)-Catechin noch *O*-methyliertes oder glukuronidiertes (+)-Catechin und/oder konjugiertes EC in der Ileostomaflüssigkeit von Patienten.

Generell werden Flavan-3-ole rasch über den Urin eliminiert [Manach et al., 2005]. Untersuchungen von van Amelsvoort et al. (2001) zeigten, dass durch einen Galloylrest die Resorption der Flavan-3-ole reduziert wird. Bislang konnten im Urin keine Flavan-3-ole mit einem Galloylrest detektiert werden, was jedoch nicht auf eine Degalloylierung zurückzuführen ist, da diese im humanen Organismus eine untergeordnete Rolle spielt. Nach van Amelsvoort et al. (2001) werden Galloylderivate bevorzugt über die Galle ausgeschieden.

Procyanidine unterscheiden sich von den meisten anderen Polyphenolen durch ihre polymere Struktur und ihr hohes Molekulargewicht. Deprez et al. (2001) vermuten, dass Procyanidine mit einem niedrigen Molekulargewicht (Oligomersierungsgrad (OG) ≤ 3) intakt im GIT absorbiert werden. Kahle et al. (2007) bestätigen diese Vermutung, da 90,3 % der aufgenommenen Apfelsaftprocyanidine in der Ileostomaflüssigkeit mit einem überwiegenden OG von 3,4 detektiert wurden, während im Ausgangssaft ein OG von bis zu 5,7 vorlag. Für Procyanidine aus Kakao ist

nachgewiesen worden, dass sie während der Passage des Gastrointestinaltrakts in ihre Monomere gespalten werden [Zhu et al., 2002; Spencer et al., 2002; Spencer et al., 2000]. Nach Aufnahme von Procyanidindimeren über einen Apfelsaft wurde in der Ileostomaflüssigkeit keine dimeren Procyanidine, jedoch das Monomer (-)-Epicatechin bestimmt, was ebenfalls für eine Spaltung spricht [Kahle et al., 2005]. Im Vergleich dazu berichteten allerdings Donovan et al. (2002) und Rios et al. (2002), dass ein Großteil der aufgenommenen Procyanidine den Dünndarm intakt erreichen. Auch Deprez et al. (2001) konnten die Absorption von intakten Procyanidindimeren und -trimeren beobachten. Weiterhin detektierten Shoji et al. (2006) im Blutplasma von Ratten Procyanidindimere und das trimere Procyanidin PC1. Kahle et al. (2007) unterstützen die Vermutung, dass oligomere Procyanidine (OG > 2) das Kolon unter physiologischen Bedingungen intakt erreichen, während dimere Procyanidine in ihre monomeren Einheiten gespalten werden. Bislang wird die Datenlage zur Bioverfügbarkeit der Procyanidine in der Literatur jedoch noch kontrovers diskutiert. Als Abbauprodukte der Procyanidine durch die mikrobielle Darmflora postulieren Rios et al. (2002) verschiedene Phenolsäuren (u. a. Hydroxyphenylelessigsäure, Hydroxyphenylvaleriansäure, Phenylpropionsäure), die sie im Urin von Testpersonen bestimmten. Crespy et al. (2001) zeigten, dass die Dihydrochalkone Phloretin und Phloridzin zum größten Teil im Dünndarm resorbiert werden, indem sie ein *in situ* Perfusionsmodell verwendeten. Nach Perfusion von Phloridzin wurde im Darmlumen das korrespondierende Aglykon Phloretin sowie konjugierte Glukuronid- und Sulfatderivate nachgewiesen. Dabei wurde Phloridzin zu 80 % in Phloretin hydrolysiert. In einer weiteren Studie von Crespy et al. (2002) wurde nach Phloridzingabe im Blutplasma von Ratten in geringen Mengen das Phloretinaglykon bestimmt, ebenfalls jedoch kein Phloridzin. Dies stimmt mit Daten von Kahle et al. (2005) überein, die beobachteten, dass nach Gabe von phloridzinhaltigem Apfelsaft, kein Phloridzin, sondern nur das Aglykon Phloretin in der Ileostomaflüssigkeit von Probanden zu detektieren war. Das Dihydrochalkon Phloretin, das nicht im verabreichten Apfelsaft enthalten war, sowie Phloretinlukuronide wurden in der Ileostomaflüssigkeit mit einem Maximum nach 2-4 h detektiert. Dies deutet daraufhin, dass das Glykosid Phloridzin vor seiner Absorption hydrolysiert wird [Kahle et al., 2005].

2.5 Flavonoidabbau durch die mikrobielle Darmflora

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass ein großer Anteil der mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide nicht im Dünndarm resorbiert bzw. über die Galle resezerniert wird, sondern unverändert den Dickdarm erreicht, wo dann die Umsetzung durch die intestinale Mikroflora erfolgt [Rechner et al., 2004; Spencer et al., 2003; Scalbert und Williamson, 2000; Hollman und Katan, 1997]. Die Bedeutung der Darmflora für den Flavonoidabbau wurde erstmals von Nakagawa et al. (1965) gezeigt. Nach gleichzeitiger Gabe von Quercetin und dem Antibiotikum

Neomycin wurde festgestellt, dass keine phenolischen Abbauprodukte im Urin von Ratten nachweisbar waren, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die ohne Antibiotikungabe und somit intakter Darmflora Quercetin metabolisierte. Diese und weitere Untersuchungen sowie die im Allgemeinen niedrige Wiederfindungsrate von intakten Flavonoiden im Urin oder in der Fäzes lassen auf eine intensive Biotransformation der Verbindungen schließen. Somit sind neben den Ausgangsverbindungen auch die Abbauprodukte der Flavonoide von biologischer Relevanz, da sie möglicherweise einen Beitrag zu den bioaktiven Eigenschaften der Ausgangsverbindungen leisten. Im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen sind die bioaktiven Eigenschaften der Abbauprodukte bislang noch unzureichend untersucht.

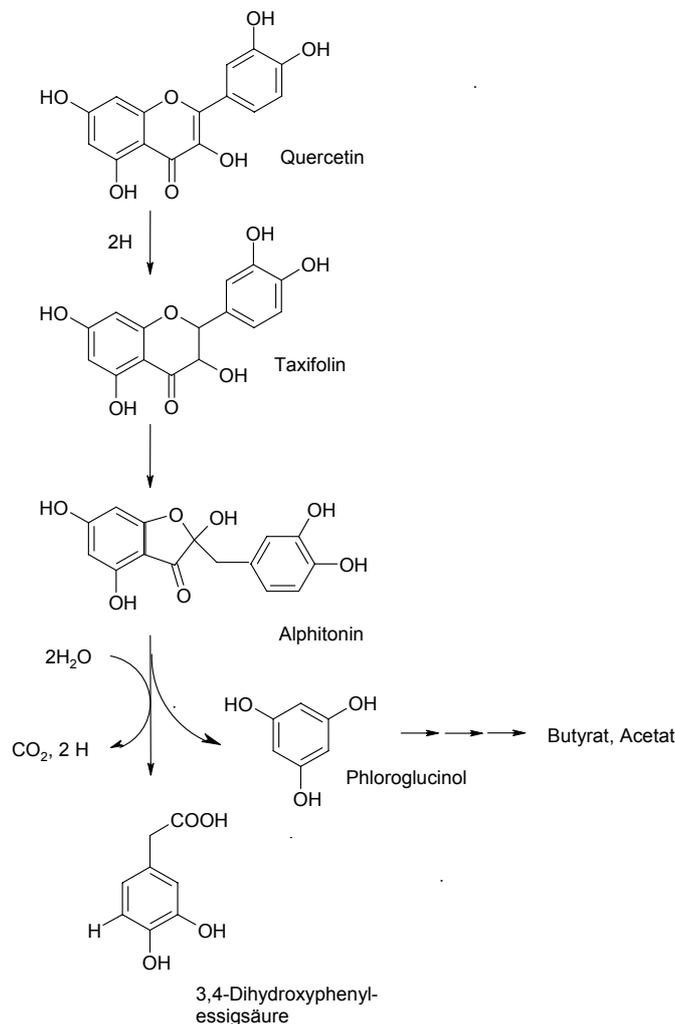


Abb. 30 Postulierter Abbau des Flavonols Quercetin durch *Eubacterium ramulus* [Schoefer et al., 2003]

Gegenwärtig sind mehr als 400 verschiedene Bakterienspezies und Subspezies (insgesamt 10^{12} - 10^{13} Bakterien) in der Darmflora bekannt [Autenrieth, 2003; Blaut et al., 2003], wobei Schätzungen davon ausgehen, dass die tatsächliche Anzahl weit höher liegt [Suan et al., 1999; Doré et al., 1998]. Am intensivsten besiedelt ist der Dickdarm, der pro Gramm Darminhalt zwischen 10^{11}

und 10^{12} Bakterien enthält [Autenrieth, 2003]. Zu 99 % sind dies obligate Anaerobier wie *Bacteroides*-Arten, *Eubacterium*, *Bifobacterium* oder *Clostridium*-Spezies [Autenrieth, 2003]. Ferner finden sich im Dickdarm auch etwa 10^8 Bakterien pro Gramm Darminhalt, die zu den fakultativen Anaerobiern gehören, vorwiegend *E. coli* und andere Enterobacteriaceae [Autenrieth, 2003].

Für Quercetin und seine Glykoside wird ein Abbau durch das humane Darmbakterium *Eubacterium ramulus* postuliert [Hein et al., 2008; Blaut et al., 2003; Aura et al., 2002; Braune et al., 2001]. Dabei kommt es über Reduktion des heterozyklischen C-Rings zur Bildung von Taxifolin, das nachfolgend über eine Chalkon- oder Diketonstruktur zu Alphitonin metabolisiert wird. Die hydrolytische Ringöffnung führt zur Bildung von Phloroglucinol (A-Ring) und 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (B-Ring) (Abb. 30) [Schoefer et al., 2003]. Phloroglucinol wird durch *Eubacterium ramulus* weiter in die kurzketigen Fettsäuren Butyrat und Acetat abgebaut [Schoefer et al., 2003; Braune et al., 2001].

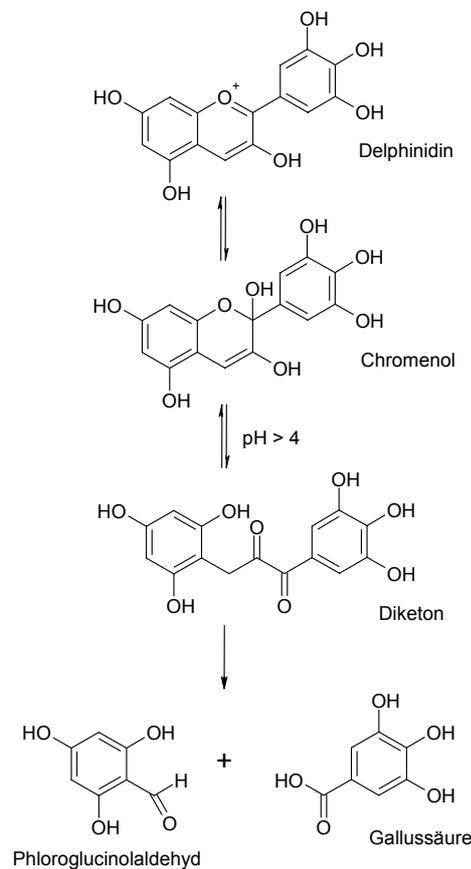


Abb. 31 Postulierter Zerfall des Anthocyanidins Delphinidin [modifiziert nach Fleschhut et al., 2006]

Ebenso sind intestinale Mikroorganismen in der Lage, Anthocyanidine abzubauen. In Abhängigkeit vom pH-Wert kommt es über eine Chromenol- und eine Diketonstruktur zum Abbau der Anthocyanidine in eine korrespondierende Benzoessäure (B-Ring) und einen Phloroglucinolaldehyd

(A-Ring) [Fleschhut et al., 2006; Keppler und Humpf, 2005; Seeram et al., 2001]. Für das Anthocyanidin Delphinidin wird ein mikrobieller Abbau zu Gallussäure und Phloroglucinolaldehyd beschrieben (Abb. 31) [Fleschhut et al., 2006; Keppler und Humpf, 2005].

Jedoch führt nicht nur die intestinale Mikroflora zu einem Abbau der Flavonoide, sondern auch unter Zellkulturbedingungen kommt es aufgrund der begrenzten chemischen Stabilität zur Bildung entsprechender Abbauprodukte [Fleschhut et al., 2006; Keppler et al., 2005; Seeram et al., 2001]. Kern et al. (2007b) zeigten dies bereits für das Anthocyanidin Delphinidin.

2.6 Bildung von Wasserstoffperoxid unter Zellkulturbedingungen

Die Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Bildung stellt keine Besonderheit für Apfelextrakte dar, sondern spielt immer dann eine Rolle, wenn Polyphenole, insbesondere mit catecholischer Struktur, in Zellkulturexperimenten eingesetzt werden. Dabei ist das Ausmaß der H_2O_2 -Bildung u. a. vom eingesetzten Zellkulturmedium abhängig. In DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) werden deutlich höhere H_2O_2 -Konzentrationen erreicht als in RPMI-Medium [Long et al., 2000]. Polyphenole sind in der Lage mit noch unbekanntem Bestandteilen des Zellkulturmediums zu reagieren und auf diese Weise H_2O_2 zu generieren, welches sich dann im Medium anreichert [Halliwell et al., 2000; Dashwood et al., 2002; Hou et al., 2005].

Als Mechanismus wird die Autooxidation von Polyphenolen postuliert, wobei die Reaktion von im Zellkulturmedium vorhandenen Metallionen wie Cu^{2+} katalysiert werden soll [Hou et al., 2005; Lapidot et al., 2002]. Am Beispiel von Gallussäure konnte gezeigt werden, dass die Substanz unter Zellkulturbedingungen in Gegenwart von Katalase weniger schnell abgebaut wird [Kern et al., 2007b]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Stabilität verschiedener Klassen von Polyphenolen unter Zellkulturbedingungen abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und der Sauerstoffkonzentration ist [Van der Sluis et al., 2005; Friedman und Jürgens, 2000]. Beispielsweise begünstigt ein steigender pH-Wert die Autooxidation der Polyphenole [Yang et al., 2004; Akagawa et al., 2003; Mochizuki et al., 2001]. Allerdings scheint im Zellkulturmedium akkumuliertes H_2O_2 nicht nur zum verstärkten Abbau der Polyphenole beizutragen, sondern auch Einfluss auf das zelluläre System zu nehmen.

In aeroben Organismen entsteht H_2O_2 als Nebenprodukt des zellulären Stoffwechsels und ist in der Lage, zelluläre Strukturen zu schädigen und deren Funktionalität einzuschränken [Jung und Grune, 2008]. DeYulia und Cárcamo (2005) zeigten, dass durch Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung (EGFR-EGF) extrazellulär generiertes H_2O_2 die Aktivität der Proteintyrosinphosphatasen (PTP) *in vitro* hemmt. PTP hydrolysieren spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne und sind somit an einer erhöhten RTK-vermittelten Signaltransduktion beteiligt [DeYulia und Cárcamo, 2005]. *In vitro* wurde bereits auch die Induktion von phos-

phoryliertem ERK1/2 durch H_2O_2 beschrieben [Nguyen et al., 2004; Huang et al., 2003]. Insbesondere zeigten Lapidot et al. (2002) für Apfelpolyphenole, dass diese in einem noch unbekanntem Mechanismus H_2O_2 im Medium generieren. Da H_2O_2 in Gegenwart von Katalase in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) disproportioniert, wurde dem Zellkulturmedium Katalase zugesetzt, um einer H_2O_2 -Akkumulation entgegenzuwirken und um H_2O_2 -bedingte biologische Effekte zu unterdrücken [Veeriah et al., 2006; Nakagawa et al., 2004; Kanner et al., 1987].

3 Problemstellung

Bisherige Untersuchungen im Arbeitskreis haben gezeigt, dass ein polyphenolreicher Apfelsaftextrakt das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 potent unterdrückte. Die Beeinflussung des Tumorzellwachstums *in vitro* wird dabei mit der Modulation wachstumsassoziierter Signalkaskaden durch Apfelpolyphenole in Verbindung gebracht. Als herausragende Wirkqualität wurde die Hemmung der Proteintyrosinkinaseaktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) charakterisiert [Kern et al., 2005].

Im Fokus dieser Arbeit stand nun die Frage, inwieweit eine potente Unterdrückung der EGFR-Aktivität durch Apfelpolyphenole limitiert ist auf das zellfreie Testsystem oder auch in intakten Zellen zum Tragen kommt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Apfelpolyphenole unter Zellkulturbedingungen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Medium generieren und es somit zu H_2O_2 -bedingten, experimentellen Artefakten kommen kann [Lapidot et al., 2002], wurden die Untersuchungen zur Modulation der EGFR-Aktivität in HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase verifiziert.

Ferner sollte der Frage nachgegangen werden, welche Substanzen für die Hemmwirkung der Apfelextrakte verantwortlich sind. Im Vergleich der Apfelsaftextrakte führt die Herstellung eines Apfeltresterextraktes zu substantziellen Unterschieden im Polyphenolmuster. Dabei unterscheidet sich der Tresterextrakt von den Apfelsaftextrakten durch einen signifikant erhöhten Gehalt an Quercetinglykosiden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, wie sich der quercetinglykosidreiche Tresterextrakt gegenüber den Apfelsaftextrakten verhält und inwieweit Quercetinglykoside einen Beitrag zu den inhibierenden Eigenschaften des Tresterextraktes leisten. Zur Identifizierung von potenziell bioaktiven Apfelinhaltsstoffen wurden aktivitätsgeleitete Fraktionierungen durchgeführt. Dabei wurden procyanidinreiche Fraktionen als potente Wirkkomponenten im Hinblick auf ein mögliches chemopräventives Potential von Äpfeln bzw. Apfelsäften identifiziert [Zeßner et al., 2008]. Infolgedessen sollte die Hemmwirkung isolierter Procyanidine unterschiedlichen Oligomerisierungsgrads auf die Aktivität des EGFR erfasst werden.

Eine weitere Substanzklasse der Polyphenole stellen die Ellagttannine dar, die u. a. in Nüssen, Beeren und Eichenholz vorkommen. Bisherige Arbeiten im Arbeitskreis haben gezeigt, dass Ellagttannine aus Eichenholz das Wachstum von HT29-Zellen potent inhibieren [Fridrich et al., 2008a]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Hemmung des Zellwachstums auf eine Unterdrückung der EGFR-Aktivität zurückzuführen ist.

Flavonoide unterliegen einem starken Abbau durch die intestinale Mikroflora. Aber auch unter Zellkulturbedingungen ist ein extensiver Abbau aufgrund der begrenzten chemischen Stabilität der Verbindungen beschrieben [Kern et al., 2007b; Fleischhut et al., 2006; Keppler et al., 2005;

Seeram et al, 2001]. Bislang ist jedoch wenig über den Beitrag der potenziellen Abbauprodukte zu den zellulären Wirkungen der Ausgangsubstanzen bekannt. Infolgedessen wurden auch die Abbauprodukte Gallussäure und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure näher untersucht, um deren Anteil am wachstumshemmenden Potential der Ausgangsverbindungen Delphinidin bzw. Quercetin zu bestimmen. Aufgrund der H₂O₂-generierenden Eigenschaften der Polyphenole wurde die Modulation des Zellwachstums in Gegenwart von Katalase und Ascorbinsäure verifiziert.

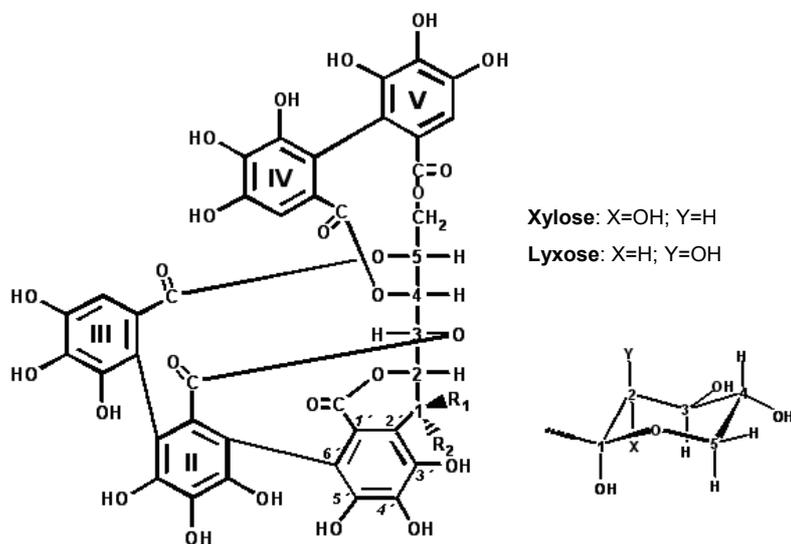
Ein weiteres zelluläres Schlüsselement dieser Arbeit stellte das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} dar, das durch Hypermethylierung seiner Promotorregion inaktiviert wird. Demethylierende Eigenschaften polyphenolreicher Apfelextrakte wurden bereits von Fini et al. (2007) beschrieben.

Um den Einfluss eines Apfeltresterextraktes auf das DNA-Methylierungsprofil des p16^{INK4a}-Gens zu erfassen, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Untersuchung des Methylierungsstatus der DNA und zur Erfassung von RNA-Transkripten des p16^{INK4a}-Gens etabliert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ellagtannine

Ellagtannine zählen zu den Polyphenolen und werden in zahlreichen Studien als antiproliferativ, apoptotisch und antioxidativ wirksam beschrieben [Ross et al., 2007; Seeram et al., 2006; Mertens-Talcott et al., 2006; Losso et al., 2004]. Das Vorkommen von Ellagtanninen ist in der Natur auf einige wenige Früchte und Nüsse beschränkt, wobei Castalagin, Vescalagin, Grandinin und die Roburine A-E auch in Eichenholz identifiziert werden konnten. In Abb. 32 sind die beiden stereoisomeren Aglyka Castalagin und Vescalagin sowie die beiden korrespondierenden C-Glykoside Roburin E und Grandinin dargestellt, die mit Xylose bzw. Lyxose glykosidisch verknüpft sind.



Ellagtannine	R1	R2
Castalagin	H	OH
Vescalagin	OH	H
Grandinin	Lyxose	H
Roburin E	Xylose	OH

Abb. 32 Ellagtannine und Ellagtanninglykoside [Fridrich et al., 2008a]

4.1.1 Modulation der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen durch Ellagtannine

Bisher ist wenig über den zellulären Wirkmechanismus der Ellagtannine bekannt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der stereoisomeren Ellagtanninaglyka Castalagin und Vescalagin sowie der korrespondierenden C-Glykoside Roburin E und Grandinin auf das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Im Vergleich dazu wurde ein Extrakt aus Eichenholz

(*Quercus alba L.*) und Ellagsäure, ein Ellagtanninabbauprodukt, das nach Säurehydrolyse gebildet wird, in die Untersuchungen mit einbezogen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Castalagin, Vescalagin, Roburin E und Grandinin als potente Inhibitoren des Wachstums von HT29-Zellen charakterisiert, während der Hemmeffekt des hydrolysierten Abbauproduktes Ellagsäure wesentlich schwächer ausfiel [Tab. 1; Fridrich et al., 2008a]. Auch der Eichenholzextrakt unterdrückte das Wachstum von HT29-Zellen [Dissertation Jessica Fritz, 2008]. Das Ergebnis zeigt, dass Unterschiede der wachstumshemmenden Effekte der einzelnen Ellagtannine vermutlich abhängig vom Glykosylierungsmuster und von der Stereoisomerie sind.

Tab. 1 Wachstumshemmende Eigenschaften der Ellagtannine und Ellagsäure im Sulforhodamin B (SRB)-Test in HT29-Zellen und Hemmung der isolierten EGFR-Aktivität im ELISA [Fridrich et al., 2008a]

Ellagtannine	Wachstumshemmung IC ₅₀ -Werte [µM]	EGFR-ELISA IC ₅₀ -Werte [nM]
Castalagin	11,1 ± 1,8	49,9 ± 2,5
Vescalagin	22,4 ± 2,6	61,8 ± 9,5
Roburin E	16,7 ± 1,4	59,2 ± 5,4
Grandinin	28,9 ± 2,6	71,2 ± 3,2
Ellagsäure	66,7 ± 9,6	65,5 ± 5,6

Innerhalb der Aglyka zeigte Castalagin im Vergleich zu Vescalagin eine potentere Hemmwirkung auf das Zellwachstum, was möglicherweise auf stereoselektive Wechselwirkungen mit den zellulären Zielstrukturen zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigten auch die Ellagtanninglykoside Roburin E und Grandinin wachstumshemmende Eigenschaften, während in vorausgegangenen Untersuchungen das inhibierende Potential von Flavonoidglykosiden vergleichsweise schwach einzustufen war [Kern et al., 2005]. Dabei überstieg der Hemmeffekt des Glykosids Roburin E sogar signifikant die des Aglykons Vescalagin. Im Vergleich zu anderen Polyphenolklassen (z. B. Quercetin) scheint die Glykosylierung von Ellagtanninen somit nicht mit einem substantiellen Verlust ihres Hemmpotentials einherzugehen.

Einen der zentralen Signalwege, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren, stellt die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade dar. Am Anfang dieser Kaskade steht der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), der u. a. in vielen Kolontumoren überexprimiert wird. Eine effektive Hemmung des EGFR ist verbunden mit der Unterdrückung des Zellwachstums und/oder der Induktion von Apoptose. Die Ellagtannine, Ellagsäure und der Eichenholzextrakt stellen potente Hemmstoffe der Aktivität der Proteintyrosinkinase (PTK) des EGFR im zellfreien Testsystems dar [Tab. 1; Fridrich et al., 2008a; Arbeitskreis Prof. Marko, unveröffentlichte Daten]. Aufgrund der hochpotenten Hemmwirkung der Ellagtannine auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation stellte sich die Frage, ob und inwieweit diese Hemmung auch im zellulären

Testsystem von Relevanz ist. Dazu sollte der Phosphorylierungsstatus des EGFR, der ein Maß für die Rezeptoraktivität darstellt und entscheidend für eine Interaktion der PTK-Domäne mit nachgeschalteten Elementen der MAPK-Kaskade ist, in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mittels Western Blot Analyse untersucht werden. Neben den Ellagtanninen Castalagin und Grandinin erfolgte die Inkubation von HT29-Zellen auch mit dem ellagtanninreichen Eichenholzextrakt und Ellagsäure. Als Positivkontrolle wurde der EGFR-spezifische Hemmstoff Tyrphostin AG1478 (4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin) eingesetzt (Abb. 33) [Osherov und Levitsky, 1994; Osherov et al., 1993; Gazit et al., 1991; Gazit et al., 1989].

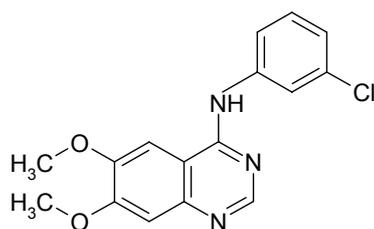


Abb. 33 Struktur des EGFR-spezifischen Hemmstoffs Tyrphostin AG1478

Im zellfreien Testsystem wird die PTK-Aktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation mit einem IC₅₀-Wert von $2,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ gehemmt [Kern et al., 2005; Meiers et al., 2001], während der Phosphorylierungsstatus des EGFR in intakten HT29-Zellen in Gegenwart von 1-5 μM Tyrphostin AG1478 zu ca. 70-90 % unterdrückt wird [Fridrich et al., 2008a]. Die Positivkontrolle wurde in den nachfolgenden Messungen stets mitgeführt, wird jedoch nicht immer abgebildet.

In der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 führte Grandinin zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR mit einem IC₅₀-Wert von $35 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (Abb. 34). Der Gesamtproteingehalt des Rezeptors wurde im Rahmen versuchsbedingter Schwankungen und der Fehlertoleranz nicht signifikant durch Grandinin moduliert. Der EGFR-spezifische Hemmstoff Tyrphostin AG1478 unterdrückte den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors zu 90 %.

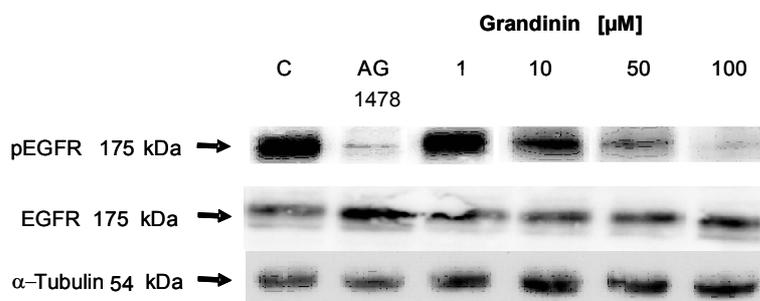
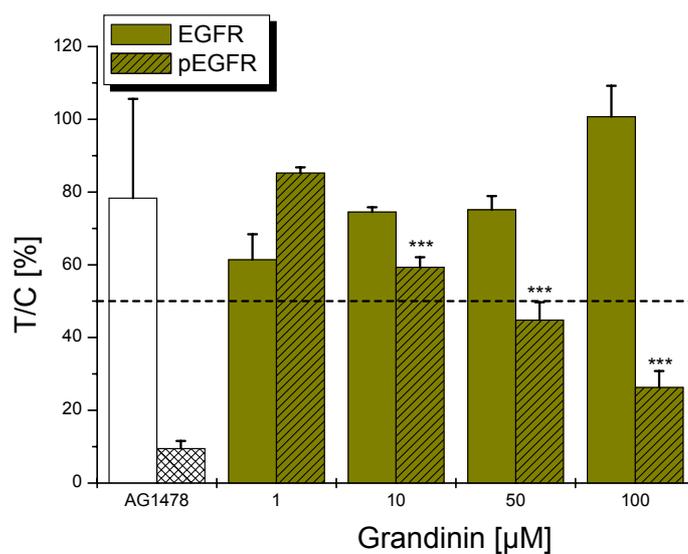


Abb. 34 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch Grandinin, 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); AG 1478 (Tyrphostin), EGFR-spezifischer Hemmstoff (1 µM); MW ± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten; ***: p<0,001 bezogen auf 1 µM Grandinin

Das Aglykon Castalagin hemmte bereits in Konzentrationen von 10 µM hoch signifikant die Autophosphorylierung des EGFR in HT29-Zellen (Abb. 35). Im selben Konzentrationsbereich wurde der Phosphorylierungsstatus um 60 % unterdrückt (Abb. 35), so dass es im Vergleich zum glykosylierten Grandinin (10 µM Grandinin, 40 % Hemmung des Phosphorylierungsstatus, Abb. 34) zu einem noch potenteren Hemmeffekt kam. Der Gesamtproteingehalt an EGFR wurde durch Castalagin nicht beeinflusst. Aufgrund der limitierten Stoffmenge konnte Castalagin nur in drei Konzentrationen eingesetzt werden, so dass eine exakte Berechnung des IC₅₀-Wertes nicht möglich war.

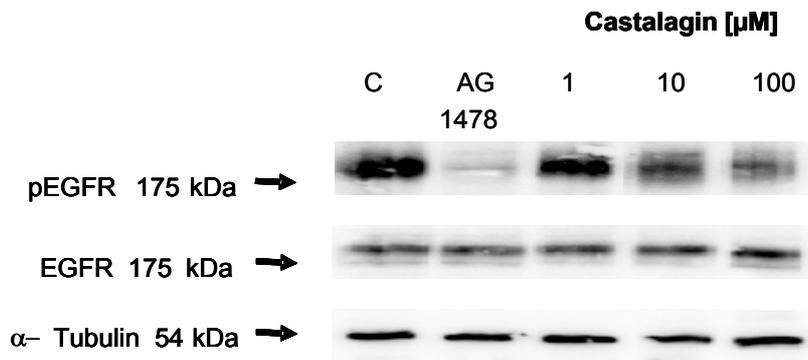
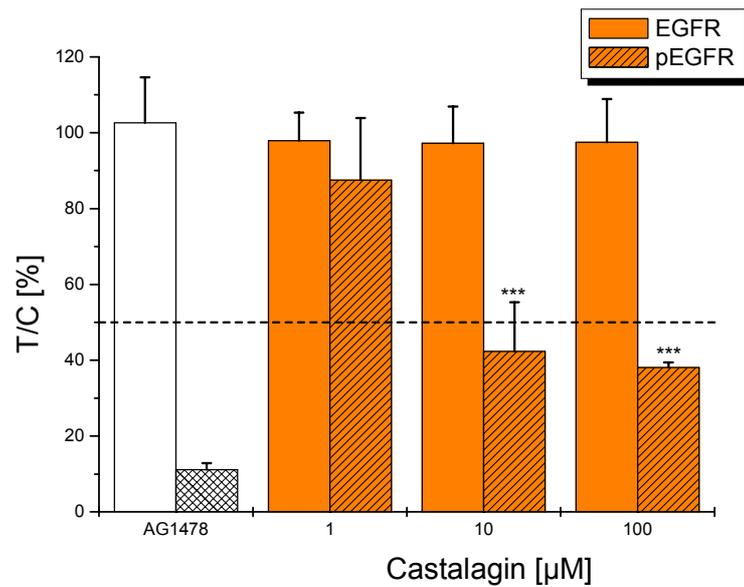


Abb. 35 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch Castalagin, 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); AG 1478 (Typhostin), EGFR-spezifischer Hemmstoff (1 µM); MW ± SD von 3 unabhängigen Experimenten; ***: p<0,001 bezogen auf 1 µM Castalagin

Um zu prüfen, ob sich der potente Hemmeffekt der Einzelsubstanzen auch im komplexen Eichenholzextrakt widerspiegelt, wurde im Folgenden der Einfluss des Extraktes auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR untersucht.

Der Eichenholzextrakt zeigte in Konzentrationen ≤ 100 µg/ml keine Beeinflussung der Autophosphorylierung des EGFR in HT29-Zellen (Abb. 36). Die untersuchten Ellagantannine Grandinin und Castalagin wurden hingegen als hoch potente Inhibitoren (Abb. 34, Abb. 35) der EGFR-Autophosphorylierung identifiziert.

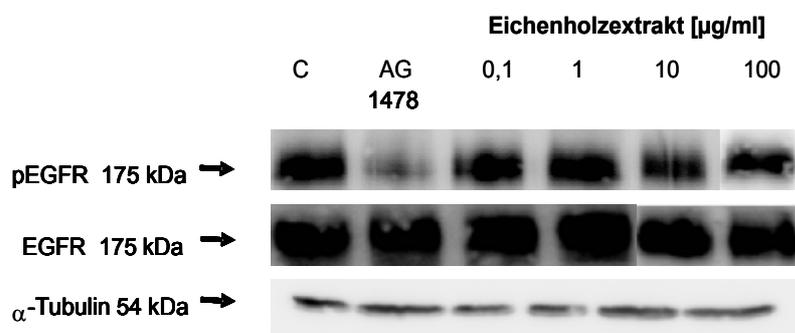
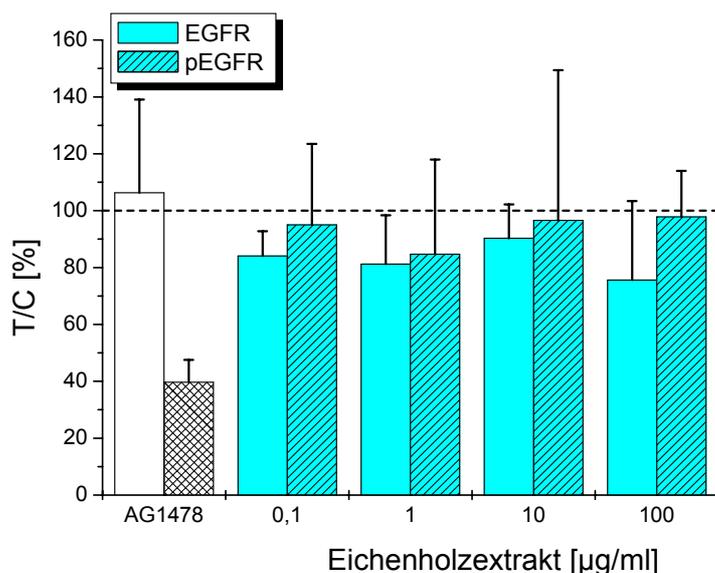


Abb. 36 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch Eichenholzextrakt, 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); AG 1478 (Tyrphostin), EGFR-spezifischer Hemmstoff (1 µM); MW ± SD von mindestens 4 unabhängigen Experimenten

Sofern Ellagtannine Säuren oder Basen ausgesetzt sind, kommt es zur Hydrolyse der Esterbindungen und es entsteht Hexahydroxydiphensäure, die spontan zu Ellagsäure lactonisiert. Auch für Ellagsäure ist bereits bekannt, dass sie das Zellwachstum und die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR hemmt [Fridrich et al., 2008a]. Aufgrunddessen wurde auch der Einfluss von Ellagsäure auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR bestimmt.

In HT29-Zellen zeigte Ellagsäure bis zu einer Konzentration von 100 µM keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung des EGFR (Abb. 37). Die starken Schwankungen – trotz Wiederholungen (n=6) – deuten möglicherweise auf ein Löslichkeitsproblem der Substanz in DMSO hin. Auch eine Erhöhung der DMSO-Endkonzentration von 1 % auf 5 % führte zu keiner verbesserten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Stattdessen konnten zytotoxische Effekte (verursacht durch 5 % DMSO) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich scheint eine effiziente Hemmung durch hydrolysierte Ellagtannine auszubleiben.

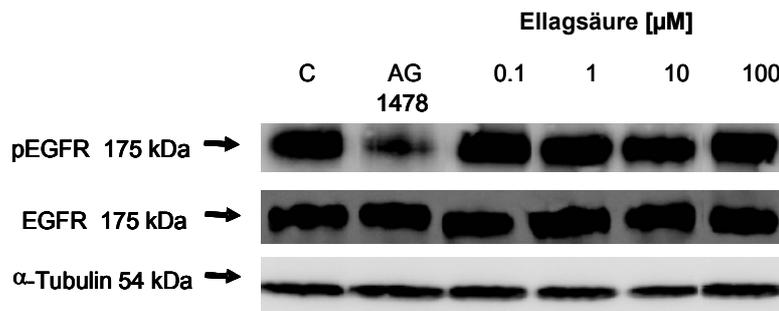
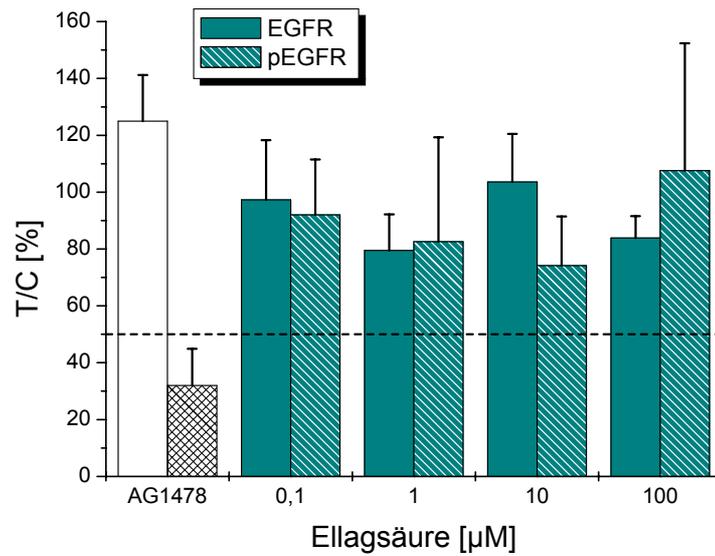


Abb. 37 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch Ellagsäure, 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); AG1478 (Tyrphostin), EGFR-spezifischer Hemmstoff (1 μM); MW \pm SD von mindestens 6 unabhängigen Experimenten

4.1.2 Diskussion Ellagtannine

Innerhalb der Gruppe der Polyphenole wurden Ellagtannine bereits als vielversprechende, bioaktive Substanzklasse hinsichtlich ihres chemopräventiven Nutzens identifiziert [Mertens-Talcott et al., 2006]. Weiterhin konnten die Ellagtannine Castalagin, Vescalagin, Grandinin und Roburin E schon als potente Hemmstoffe des Wachstums von HT29-Zellen sowie des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) im isolierten Testsystem charakterisiert werden [Tab. 1; Fridrich et al., 2008a]. Aufgrund der hochpotenten Hemmwirkung der Ellagtannine auf die isolierte Rezeptorpräparation im nanomolaren Konzentrationsbereich stellte sich die Frage, ob und inwieweit diese Hemmung auch im zellulären Testsystem von Relevanz ist und somit möglicherweise zur Wachstumshemmung beiträgt. Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus des EGFR, der ein Maß für die Rezeptoraktivität darstellt, in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Repräsentativ wurden das Aglykon Castalagin, im Vergleich zu seinem C-

Glykosid Grandinin sowie ein ellagtanninreicher Eichenholzextrakt und die Ellagsäure für die Testung ausgewählt. Die Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR wurde schon für zahlreiche Polyphenolklassen gezeigt [Sah et al., 2004; Lee et al., 2002; Bahtia et al., 2001; Huang et al., 1999] und ist im Hinblick auf einen chemopräventiven Nutzen von großer Bedeutung.

In wachstumshemmenden Konzentrationen wurden Grandinin und Castalagin als potente Inhibitoren der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen charakterisiert (Abb. 34+Abb. 35). Möglicherweise steht somit der Einfluss von Ellagtanninen auf den EGFR im intakten Zellsystem in direktem Zusammenhang mit den wachstumshemmenden Eigenschaften der Verbindungen [Fridrich et al., 2008a]. Interessanterweise wurde die Unterdrückung der Aktivität des EGFR nicht nur für das Aglykon Castalagin, sondern auch für das korrespondierende C-Glykosid Grandinin beobachtet. Somit ist die Hemmwirkung von Ellagtanninen auf die EGFR-Aktivität erstens nicht nur auf die isolierte Rezeptorpräparation begrenzt, sondern auch für das intakte Zellsystem von Relevanz. Zweitens wird der Hemmeffekt sowohl durch das Aglykon als auch durch das Glykosid vermittelt. Dies ist im Vergleich zu anderen Polyphenolklassen ungewöhnlich, da beispielsweise die potente Hemmwirkung des Quercetinaglykons in Form seiner Glykoside aufgehoben wird [Kern et al., 2005]. Das inhibierende Potential von Castalagin spiegelt sich in allen bisher untersuchten Testsystemen wider und zeigt, dass wahrscheinlich die Aglykonform mit einer α -orientierten OH-Gruppe entscheidend für die biologische Aktivität ist. Um jedoch diese Vermutung bestätigen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit strukturell unterschiedlichen Ellagtanninen durchgeführt werden. In weiterführenden Experimenten sollte auch berücksichtigt werden, dass Castalagin und Grandinin im Zellkulturmedium substantielle Mengen an H_2O_2 generieren [Dr. Melanie Esselen, persönliche Mitteilung].

Im Vergleich zu den Ellagtanninen zeigten der Eichenholzextrakt und Ellagsäure keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR in substantiell wachstumshemmenden Konzentrationen (Abb. 36 + Abb. 37) [Fridrich et al., 2008a; Dissertation Jessica Fritz, 2008]. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung wider, da beide Substanzen nicht in der Lage waren, die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren [Dissertation Jessica Fritz, 2008]. Sofern es zu einer Hemmung der Aktivität und/oder Expression von Elementen proliferationsassoziierter Signalkaskaden kommt, die zur Wachstumshemmung beitragen, zeigt sich dies auch in einem substanzinduzierten Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Ein artifizieller Einfluss durch H_2O_2 kann für Ellagsäure ausgeschlossen werden, hingegen wurden für den Eichenholzextrakt substantielle Mengen an H_2O_2 im Zellkulturmedium bestimmt werden [Dr. Melanie Esselen, unveröffentlichte Daten]. Somit sollte die Modulation des EGFR-Phosphorylierungsstatus durch den Eichenholzextrakt in Gegenwart von Katalase wiederholt werden.

Auch scheint die Hemmung des Zellwachstums durch den Eichenholzextrakt nicht Topoisomerase-vermittelt zu sein [Dissertation Jessica Fritz, 2008]. Somit müssen bislang noch nicht identifizierte zelluläre Zielstrukturen für die wachstumshemmenden Eigenschaften dieser beiden Verbindungen verantwortlich sein.

Einige Ellagtannine sind bereits als Hemmstoffe der katalytischen Aktivität von Topoisomerasen beschrieben [Quideau et al., 2005; Quideau et al., 2004; Quideau et al., 2003; Bastow et al., 1993; Kashiwada et al., 1993]. Grundsätzlich spielen DNA-Topoisomerasen eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der DNA-Topologie während der Transkription, Replikation, Chromosomenkondensation und der DNA-Reparatur. Auch die Ellagtannine Castalagin und Grandinin sowie der ellagtanninreiche Eichenholzextrakt stellen hochpotente Inhibitoren der humanen Topoisomerasen I und II dar und beeinflussen die DNA-Integrität nur marginal [Dissertation Jessica Fritz, 2008]. Bis zu einer Konzentration von 50 μM wurden durch die Ellagtannine keine DNA-Strangbrüche induziert. Auch eine direkte Interaktion der Substanzen mit der DNA als Interkalator oder „minor groove binder“ kann ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass die Ellagtannine das Topoisomerase-DNA-Intermediat nicht stabilisieren und somit als rein katalytische Hemmstoffe der Topoisomerasen wirken. Infolgedessen wird ein potentieller chemopräventiver Nutzen der Ellagtannine durch unerwünschte DNA-Schädigung nicht limitiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ellagtannine bioaktive Eigenschaften besitzen, die Einfluss auf proliferationsassoziierte Signalkaskaden nehmen. So unterdrückten die Ellagtannine Castalagin und Grandinin die Aktivität des EGFR in humanen Kolonkarzinomzellen in wachstumshemmenden Konzentrationen und lassen somit auf einen direkten Zusammenhang zwischen EGFR- und Wachstumshemmung schließen. Im Hinblick auf eine mögliche chemopräventive Wirkung der Verbindungen ist diese Wirkqualität von großem Interesse. Allerdings stehen Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen aus, um Aussagen über *in vivo* relevante Stoffkonzentrationen treffen zu können.

4.2 Procyanidine

Als Procyanidine werden Di- oder Oligomere von Catechinen (Flavan-3-olen) bezeichnet. Die häufigsten Verknüpfungen der monomeren Flavanole zu dimeren oder oligomeren Procyanidinen werden zwischen C4 und C8 gebildet, wobei zusätzlich zwischen den Stereoisomeren α oder β unterschieden wird. Infolge der zahlreichen Hydroxygruppen (5 pro Monomereinheit) besitzen die Procyanidine gerbende Eigenschaften. Oligomeren Procyanidinen werden eine Reihe gesundheitlich positiver Eigenschaften zugesprochen, darunter antiinflammatorische, antiatherosklerotische, antidiabetische und antikanzerogene Effekte [Zhang et al., 2006; Saito et al., 2005; Gossé

et al., 2005; Pinent et al., 2005; Kenny et al., 2004; Pinent et al., 2004]. Auch das Haarwachstum soll durch oligomere Procyanidine beeinflusst werden [Kamimura et al., 2006].

4.2.1 Einfluss von Procyanidinen auf die Aktivität des isolierten EGFR

Bisherige Arbeit im Arbeitskreis haben gezeigt, dass ein polyphenolreicher Apfelsaftextrakt (AE02) sowohl die PTK-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) ($IC_{50} = 10,8 \pm 5,5 \mu\text{g/ml}$) als auch die Autophosphorylierung des Rezeptors in intakten Zellen ($IC_{50} = 90 \pm 12 \mu\text{g/ml}$) effektiv unterdrückt. Mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierung wurden procyanidinreiche Fraktionen des Extraktes mit potenter Hemmwirkung auf die EGFR-Aktivität identifiziert [Dissertation Melanie Kern, 2006]. Darauf aufbauend sollte im Folgenden die Wirkung isolierter, oligomerer Procyanidine auf die Aktivität des EGFR getestet werden. Dazu wurden die Procyanidine im Arbeitskreis von Prof. Winterhalter (Universität Braunschweig) aus einem Traubenkernextrakt isoliert (Abb. 38).

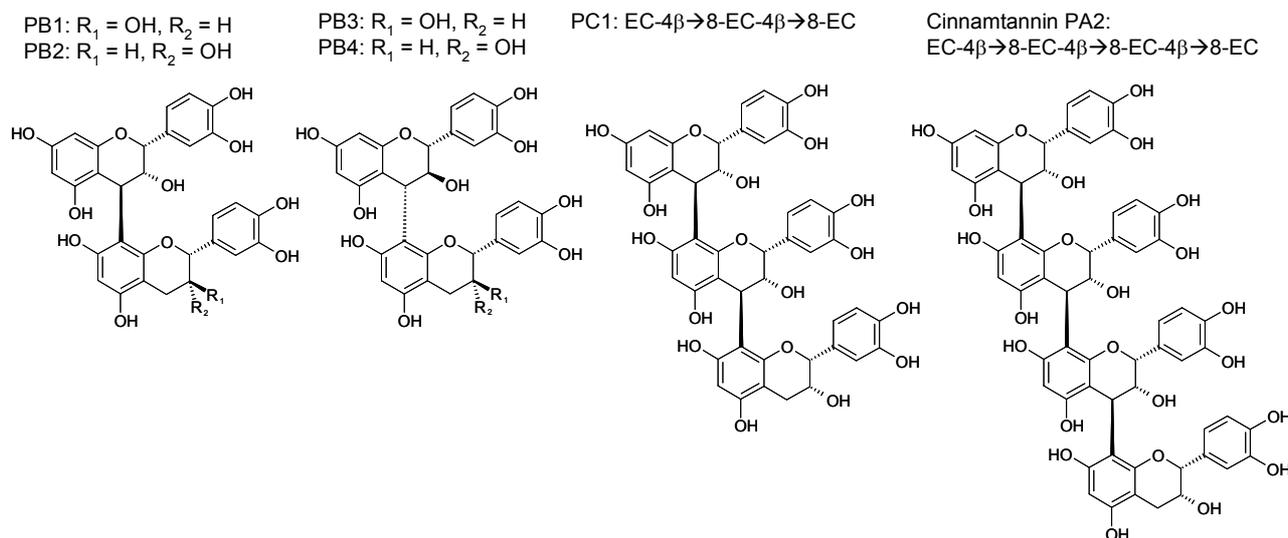


Abb. 38 Di- und oligomere Procyanidine [Fridrich et al., 2007b]

In die Untersuchungen wurden die bislang in den Apfelextrakten identifizierten Procyanidindimere PB1 und PB2 sowie das Procyanidintrimer PC1 miteinbezogen. Aufgrund wirkmechanistischer Untersuchungen wurden weitere strukturverwandte Procyanidine in die Messungen integriert – die Dimere PB3 und PB4 und das Tetramer PA2. Als Positivkontrolle wurde jeweils der EGFR-spezifische Hemmstoff Tyrphostin AG1478 mitgeführt (Daten nicht gezeigt).

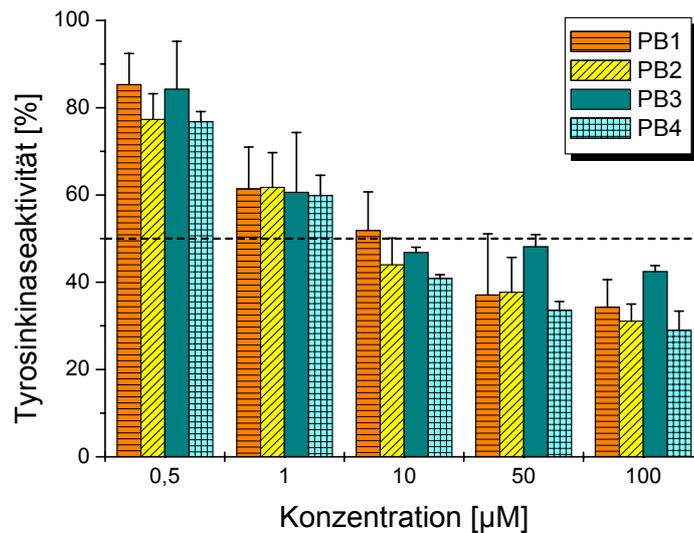


Abb. 39 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch die Procyanidindimere PB1-PB4, MW \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung

Die dimeren Procyanidine (PB1-4) hemmten 50 % der PTK-Aktivität ab einer Konzentration von 10 μ M, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Hemmwirkung der vier Stereoisomere bestehen (Abb. 39).

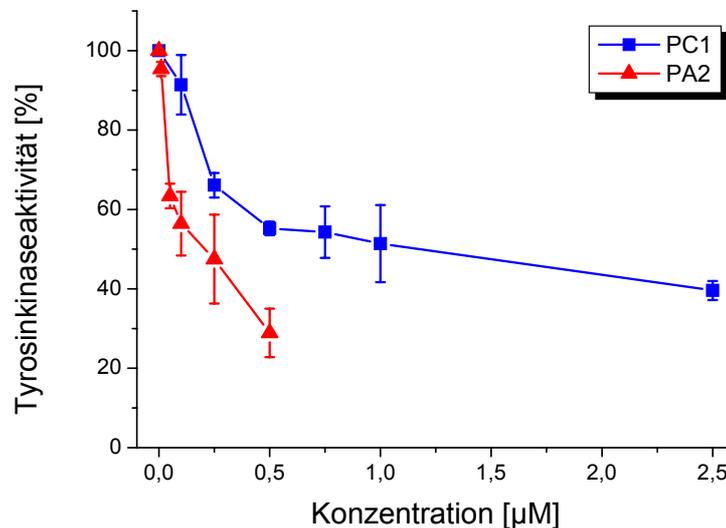


Abb. 40 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch das Procyanidintrimer PC1 und das Procyanidintetramer PA2; MW \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung

Das Procyanidintrimer PC1 hemmte die PTK-Aktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation hochpotent mit einem IC_{50} -Wert von $1,3 \pm 0,4$ μ g/ml (Abb. 40). Das tetramere Procyanidin PA2 zeigte innerhalb der untersuchten Procyanidine die potenteste Hemmwirkung auf die EGFR-Akti-

vität (IC_{50} -Wert: $0,22 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$, Abb. 40). Insgesamt lässt sich sagen, dass die Hemmwirkung der Procyanidine auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation mit steigendem Oligomerisierungsgrad zunimmt: $PA2 > PC1 \gg PB1=PB2=PB3=PB4$.

4.2.2 Modulation der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen durch Procyanidine

Ferner wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die im ELISA als hochpotent identifizierten Procyanidine PC1 und PA2 den Phosphorylierungsstatus des EGFR, als Maß für die Rezeptoraktivität in intakten HT29-Zellen beeinflussen. Dazu wurden HT29-Zellen für 45 min mit dem entsprechenden Procyanidin inkubiert und der EGFR-Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot Analyse bestimmt.

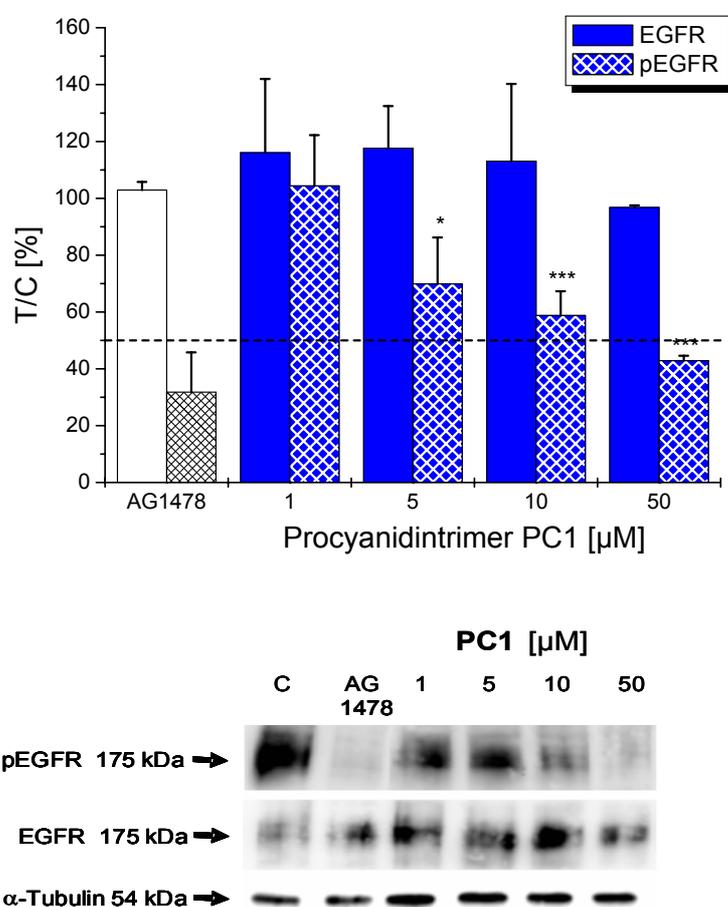


Abb. 41 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen durch das Procyanidintrimer PC1; Western Blot Analyse; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten; K: Kontrolle (1 % DMSO), AG1478 (Tyrphostin): EGFR-spezifischer Hemmstoff (5 μM); *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

Das Procyanidintrimer PC1 erwies sich als potenter Hemmstoff der Autophosphorylierung des EGFR mit einem IC_{50} -Wert von $35 \pm 15 \mu\text{M}$ (Abb. 41). Bereits ab 5 μM PC1 kam es zu einer signifikanten Hemmung der Rezeptoraktivität, die sich konzentrationsabhängig fortsetzte, während der Gesamtproteingehalt unbeeinflusst blieb (Abb. 41).

Das Procyanidintetramer PA2 war hingegen bis zu einer Konzentration von 50 μM weitestgehend unwirksam (Abb. 42). Auch der Gesamtproteingehalt wurde durch das tetramere Procyanidin nicht moduliert. Durch die Positivkontrolle Tyrphostin AG1478 konnte erwartungsgemäß eine potente Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR hervorgerufen werden.

Im Vergleich der oligomeren Procyanidine deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Hemmwirkung in der Zelle – im Gegensatz zur isolierten EGF-Rezeptorpräparation – aufgrund des Molekulargewichtes der Verbindungen limitiert zu sein scheint.

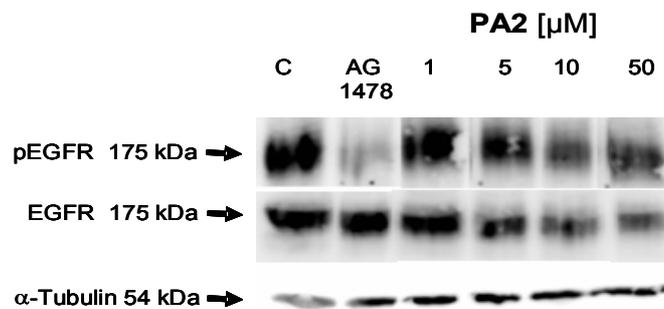
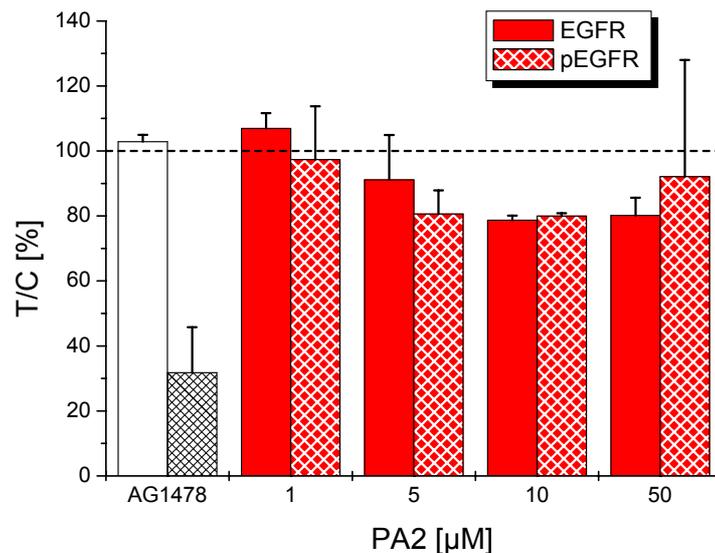


Abb. 42 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen durch das Procyanidintetramer PA2; Western Blot Analyse; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten; C: Kontrolle (1 % DMSO), AG1478 (Tyrphostin): EGFR-spezifischer Hemmstoff (5 μM); *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

4.2.3 Diskussion Procyanidine

Oligomere Procyanidine wurden hinsichtlich ihres chemopräventiven Potentials als viel versprechende Substanzklasse bioaktiver Nahrungsbestandteile identifiziert. Procyanidinreiche Extrakte wurden bereits als Hemmstoffe des Wachstums von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* beschrieben [Faria et al., 2006; Gossé et al., 2005; Tourino et al., 2005]. Allerdings ist der grundle-

gende Wirkmechanismus bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von einzelnen Procyanidinoligomeren mit definierten Strukturen konnten bisher auch nur wenig Aussagen über Strukturwirkungsbeziehungen getroffen werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten die Effekte von vier stereoisomeren Procyanidindimeren (PB1-PB4), des Trimers PC1 und des Tetramers PA2 auf die Aktivität des isolierten EGFR [Fridrich et al., 2007b]. Dazu wurden die Procyanidine im Arbeitskreis von Herrn Prof. Winterhalter aus einem Traubenkernextrakt aufgereinigt und charakterisiert [Fridrich et al., 2007b]. Basierend auf einem zellfreien Testsystem (ELISA) wurden oligomere Procyanidine als potente Hemmstoffe der PTK-Aktivität des isolierten EGFR charakterisiert. Dabei stieg das inhibierende Potential der Procyanidine mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad an (Abb. 39 + Abb. 40). Weiterhin zeigten Kern et al. (2005), dass das monomere Flavan-3-ol, (-)-Epicatechin, die isolierte EGF-Rezeptorpräparation erst in Konzentrationen $> 300 \mu\text{M}$ hemmt [Kern et al., 2005]. Im Vergleich der stereoisomeren Procyanidindimere PB1-PB4, deren IC_{50} -Werte im Konzentrationsbereich von $15 \mu\text{M}$ liegen, wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Hemmeffekte auf die Aktivität des isolierten EGFR beobachtet. Das inhibierende Potential des Procyanidintrimers wurde im Vergleich zu den Dimeren um eine Zehnerpotenz verstärkt (Abb. 39 + Abb. 40), während das zu untersuchende Tetramer PA2 die potentesten EGFR-inhibierenden Eigenschaften im zellfreien System zeigte (Abb. 40). In Bezug auf die Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR können die Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden: $\text{PA2} > \text{PC1} \gg \text{PB1}=\text{PB2}=\text{PB3}=\text{PB4} \gg (-)\text{-Epicatechin}$ [Fridrich et al., 2007b].

Unter Berücksichtigung des ansteigenden Molekulargewichtes musste die Frage gestellt werden, inwieweit die oligomeren Procyanidine auch die EGFR-Aktivität in intakten Zellen beeinflussen. Dabei spiegelt sich die Rezeptoraktivität im intakten Zellsystem im Status der Autophosphorylierung wider, die entscheidend für die Interaktion mit nachgeschalteten Elementen der MAPK-Kaskade ist [Boonstra et al., 1995; Fan et al., 1995]. Die Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR konnte bereits für zahlreiche Flavonoide, wie das Grüntee catechin (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), das Flavonol Quercetin oder das Flavon Luteolin nachgewiesen werden [Sah et al., 2004; Lee et al., 2002; Liang et al., 1997]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Procyanidintrimer mit potenter Hemmwirkung auf die Rezeptorautophosphorylierung in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 identifiziert (Abb. 41). Im Vergleich dazu zeigte das Procyanidintetramer PA2 bis zu einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ keinen signifikanten Effekt auf den EGFR-Phosphorylierungsstatus (Abb. 41). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Hemmwirkung oligomerer Procyanidine auf die EGFR-Aktivität in intakten Zellen durch das Molekulargewicht limitiert zu sein scheint. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass die Hem-

mung der EGFR-Aktivität durch das Procyanidintrimer PC1 nicht nur auf die isolierte Rezeptorpräparation begrenzt ist, sondern auch im zellulären Testsystem zum Tragen kommt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass oligomere Procyanidine abhängig von ihrem Oligomerisierungsgrad potente Hemmstoffe des EGFR darstellen und als solche möglicherweise zur wachstumshemmenden Wirkung von Apfelsaftextrakt beitragen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Daten von Gossé et al. (2005), die zeigten, dass procyanidinreiche Fraktionen eines Apfelsaftextraktes das Wachstum von humanen Kolonkarzinomzellen hemmen. Weiterhin wird berichtet, dass Procyanidine die Induktion von Apoptose vermitteln können [Hibasami et al., 2004; Nomoto et al., 2004].

Hinsichtlich ihrer Effekte auf proliferationsassoziierte Signalkaskaden können Procyanidine im Rahmen der Chemoprävention gesundheitlich positive Eigenschaften zugesprochen werden. Als potentiell unerwünschte Effekte bezüglich eines chemopräventiven Nutzens werden die Interaktionen zahlreicher Flavonoide mit den humanen Topoisomerasen I und II beschrieben [Markovits et al., 1989; Austin et al., 1992; Constantinou et al., 1995; Suzuki et al., 2001; López-Lázaro et al., 2002; Habermeyer et al., 2005]. DNA-Topoisomerasen spielen eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der DNA-Topologie während der Transkription, der Replikation, der Chromosomenkondensation und der DNA-Reparatur. Die Art der Interaktion von Substanzen mit Topoisomerasen ist dabei entscheidend für die daraus resultierenden Konsequenzen auf die DNA-Integrität. Innerhalb der Klasse der Procyanidine wurde bislang das Dimer PB2 als Hemmstoff der katalytischen Aktivität der Topoisomerase II identifiziert [Jo et al., 2005]. Weiterhin stellten sich vicinale Hydroxygruppen am B-Ring von Flavonoiden als wichtiges strukturelles Merkmal der Hemmung von Topoisomerasen II heraus [Austin et al., 1992; Habermeyer et al., 2005]. Auch die trimeren und tetrameren Procyanidine PC1 und PA2 hemmen die Aktivität der Topoisomerasen I und II [Fridrich et al., 2007b]. Procyanidine hemmen die Aktivität von Topoisomerasen im vergleichbaren Konzentrationsbereich wie die bekannten Topoisomeraseninhibitoren EGCG und Quercetin [Habermeyer et al., 2005; López-Lázaro et al., 2002; Suzuki et al., 2002; Austin et al., 1992].

Die bislang untersuchten bioaktiven Eigenschaften der oligomeren Procyanidine führten zu der Fragestellung, inwiefern *in vivo* relevante Substanzkonzentrationen überhaupt erreicht werden. Studien zur Bioverfügbarkeit oligomerer Procyanidine sind extrem begrenzt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Untersuchungen mit humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2) zeigten, dass radiomarkierte Procyanidintrimere und -tetramere in selbem Umfang wie (+)-Catechin absorbiert werden. Weiterhin wird berichtet, dass die Resorption oligomerer Procyanidine vom Molekulargewicht abhängig ist [Deprez et al., 2002]. Aufgrund ihres relativ hohen Molekular-

gewichtet werden oligomere Procyanidine relativ schwer im Dünndarm resorbiert. Untersuchungen, die Hinweise auf die Resorption von Procyanidinen durch die Darmbarriere geben, sind bisher aber noch widersprüchlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine potente Hemmung der EGFR-Aktivität durch oligomere Procyanidine sowohl auf den isolierten Rezeptor als auch im zellulären System zu beobachten ist. Im Hinblick auf eine mögliche chemopräventive Wirkung der Verbindungen ist diese Wirkqualität von großem Interesse. Allerdings bleibt durch die inhibierenden Effekte von PC1 und PA2 auf die Aktivität der Topoisomerasen I und II unklar, in welchem Ausmaße die DNA-Integrität beeinträchtigt wird und somit einen potentiellen chemopräventiven Nutzen aufgrund unerwünschter DNA-Schädigung limitiert.

4.3 Zelluläre Wirkmechanismen von Apfelextrakten *in vitro*

4.3.1 Bildung von Wasserstoffperoxid durch Apfelextrakte unter Zellkulturbedingungen

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Polyphenole unter Zellkulturbedingungen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Medium generieren und zu experimentellen Artefakten führen können [Kern et al., 2007b; Hou et al., 2005; Dashwood et al., 2002; Halliwell et al., 2000]. Lapidot et al. (2002) zeigten bereits, dass durch Reaktion von Apfelpolyphenolen mit Bestandteilen des Mediums H_2O_2 in einem noch unbekanntem Mechanismus entsteht. Somit stellte sich die Frage, inwieweit eine H_2O_2 -Bildung durch die im Folgenden eingesetzten Apfelextrakte zu erwarten ist und inwieweit eine Akkumulation zu zellulären Effekten führt. Durch den Zusatz von Katalase ist es möglich, die Bildung von H_2O_2 im Medium effizient zu unterdrücken, da H_2O_2 zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) disproportioniert wird [Veeriah et al., 2006; Nakagawa et al., 2004; Kanner et al., 1987].

Die zu untersuchenden Apfelextrakte unterscheiden sich in der Zusammenstellung ihrer Apfelsorten und ihrer Gewinnungsprozesse (Kapitel 6.1). Während AE02 und AE05 Apfelsaftextrakte darstellen, ist der AE03B ein Apfeltresterextrakt. Der Apfelsaftextrakt AE02 setzt sich aus verschiedenen Apfelsorten (Bohnapfel, Winterrambur, Bittenfelder und Topaz) der Ernte des Jahres 2002 zusammen (Kapitel 6.1.1) [Kern et al., 2005]. Auch der AE05 besteht aus verschiedenen Apfelsorten (Bittenfelder, Bohnapfel, Seestermüher, Zitronenapfel, Börtlinger Weinapfel und Topaz) und war als Masterextrakt mit AE02-vergleichbaren Eigenschaften angedacht (Kapitel 6.1.5). Im Rahmen des NutritionNet Netzwerkes wurde der AE02 als Apfelextrakt mit antioxidativem, antiproliferativem, antiinflammatorischem und antihormonellem Potential sowie als Modulator des Karzinogenmetabolismus charakterisiert [Veeriah et al., 2006; Schäfer et al., 2006a/b; Kern et al., 2005; unveröffentlichte Netzwerkdaten]. In diesem Sinne wurde der AE05 mit einem dem AE02 vergleichbaren Polyphenolmuster hergestellt (Tab. 9). Mit Ausnahme des Tafelapfels

Topaz handelt es sich hierbei ausschließlich um Mostapfelsorten. Der Apfeltresterextrakt AE03B unterscheidet sich von den Apfelsaftextrakten vor allem durch seine Herstellung (Kapitel 6.1.2) [Schäfer et al., 2006a/b]. Der bei der Apfelsaftproduktion als Pressrückstand anfallende Apfeltrester ist besonders polyphenolreich, da er überwiegend aus Schalen und Kernen besteht. Der Trester des AE03B wurde aus Tafeläpfeln (Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold) der Ernte des Jahres 2003 gewonnen. Da der Apfeltrester anschließend enzymatisch aufgearbeitet und der Extrakt aus dem sogenannten B-Saft gewonnen wurde, wäre es zweckmäßiger gewesen, die Bezeichnung „Extrakt eines Maischeerzeugnisses“ statt „Tresterextrakt“ zu verwenden. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch in Anlehnung an das Apfelnetzwerk „NutritionNet“ der Begriff Apfeltresterextrakt beibehalten. Charakteristisch für den Tresterextrakt AE03B ist ein erhöhter Gehalt an Quercetinglykosiden. Das Polyphenolmuster der Extrakte wurde mittels HPLC mit Diodenarraydetektor bestimmt (Tab. 9).

Die Untersuchungen zur Bestimmung der H₂O₂-generierenden Effekte durch Apfelpolyphenole im Zellkulturmedium von HT29-Zellen (DMEM 4500 mg/ml Glukose, ohne Natriumpyruvat) erfolgten mittels des Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kits (Invitrogen). Dabei wurden die Inkubationsbedingungen so gewählt, dass sie der Zellbehandlung der Western Blot Analyse (45 min, serumfreie Inkubation) bzw. des Sulforhodamin B (SRB)-Tests (72 h, serumhaltige Inkubation) entsprachen.

In Voruntersuchungen wurde bereits erfasst, inwiefern der Wachstumsfaktor EGF (100 ng/ml), der zur Stimulation des EGF-Rezeptors im Rahmen der Western Blot Analyse eingesetzt wird, die H₂O₂-Bildung im Zellkulturmedium begünstigt. Hierbei zeigte sich, dass zwischen einer Substanzinkubation mit und ohne EGF keine signifikanten Unterschiede bestehen [Diplomarbeit Nadine Volz, 2007]. Aufgrunddessen wurde in weiteren Untersuchungen auf einen EGF-Zusatz verzichtet.

Nach serumfreier Zellinkubation von 45 min wurde in Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ AE02 die Bildung von substantiellen Mengen an H₂O₂ beobachtet. Mit höheren Extraktkonzentrationen ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$) stieg der H₂O₂-Gehalt auf $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ an (Abb. 43A) [Fridrich et al., 2007a].

Unter Zellkulturbedingungen wurde bereits gezeigt, dass einige Polyphenole im Medium instabil sind und innerhalb einer Stunde in ihre Abbauprodukte zerfallen, die wiederum H₂O₂ bilden [Kern et al., 2007b; Esselen et al., MNF eingereicht]. Da es sich bei den Apfelextrakten um komplexe Zusammensetzungen verschiedenster Polyphenole handelt, die zum Teil auch im Zellkulturmedium abgebaut werden [Schäfer et al., 2006a/b], kann es über einen längeren Zeitraum zu H₂O₂-generierende Effekten kommen. So zeigte sich während einer 24 stündigen Inkubationszeit

mit 500 µg/ml AE02 immer noch eine H₂O₂-Konzentration von 1,1 ± 0,3 µM (Daten nicht gezeigt) [Diplomarbeit Nadine Volz, 2007].

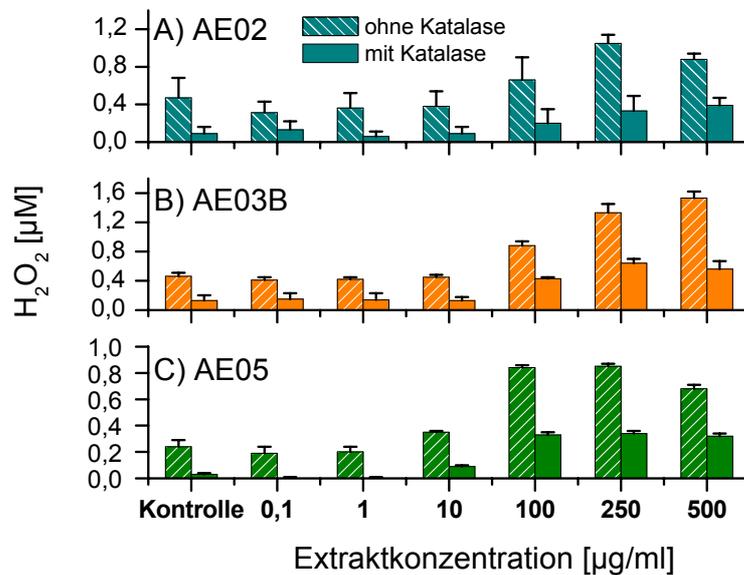


Abb. 43 H₂O₂-Akkumulation im Zellkulturmedium (DMEM, 4500 mg/l Glukose ohne Natriumpyruvat) nach 45 min serumfreier Substanzinkubation mit und ohne Katalase (100 U/ml); Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit (Invitrogen). A) AE02, B) AE03B und C) AE05; MW ± SD von n=2 in einer Doppelbestimmung

Die durch AE03B generierten H₂O₂-Konzentrationen führten innerhalb von 45 min in Extraktkonzentrationen ≥ 100 µg/ml im Zellkulturmedium zur Bildung von 1,5 ± 0,1 µM H₂O₂ (Abb. 43B). Im Vergleich zum AE02 erreichte der AE03B in Konzentrationen von 250 und 500 µg/ml signifikant höhere H₂O₂-Konzentrationen und überstieg somit die H₂O₂-generierenden Eigenschaften des AE02 [Fridrich et al., 2007a]. Auch durch Inkubation von HT29-Zellen mit AE05 für 45 Minuten wurde ab einer Konzentration von 100 µg/ml ein Anstieg der H₂O₂-Mengen im Medium bestimmt. Für 250 µg/ml AE05 wurden Konzentrationen bis zu 0,9 ± 0,02 µM H₂O₂ nachgewiesen (Abb. 43C) [Diplomarbeit Nadine Volz, 2007].

In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde die Akkumulation von H₂O₂ für die Apfelextrakte bis auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle effizient unterdrückt (Abb. 43A-C).

Nach einer 72 h, serumhaltigen Zellinkubation wurden keine substantiellen Mengen an H₂O₂ im Zellkulturmedium detektiert, unabhängig vom eingesetzten Extrakt oder der Gegenwart von Katalase (ohne Abb.) [Fridrich et al., 2007a; Diplomarbeit Nadine Volz, 2007].

4.3.2 Hemmung des Zellwachstums (SRB-Test) durch Apfelextrakte

Kern et al. (2005) zeigten bereits, dass der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 im Sulforhodamin B (SRB)-Test nach 72 h Inkubation hemmt. Um zu prüfen, inwieweit die beobachtete Hemmwirkung auf den Extrakt zu-

rückzuführen ist oder ein experimentelles Artefakt infolge der H₂O₂-Bildung darstellt, wurde die Untersuchung in Gegenwart von 100 U/ml Katalase durchgeführt.

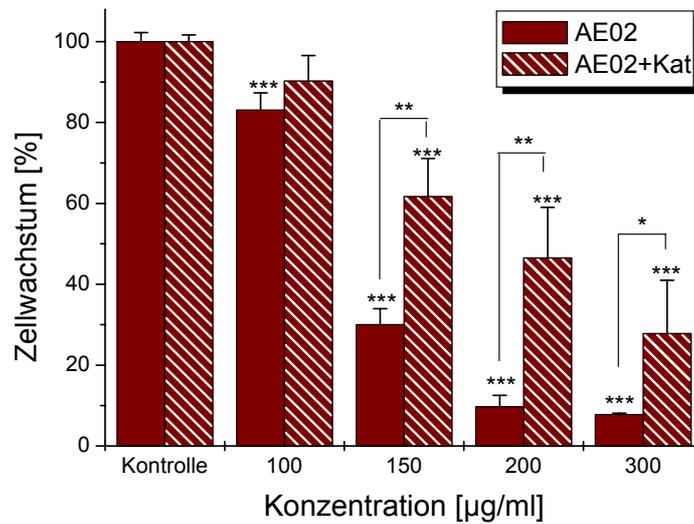


Abb. 44 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch AE02 mit und ohne Katalase (100 U/ml); 72 h serumhaltige Inkubation; SRB-Test; MW ± SD in mindestens 4 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung; *: p<0,05; **: p<0,005;***:p<0,001

Auch in Gegenwart von 100 U/ml Katalase zeigte der Apfelextrakt AE02 nach 72 h Substanzinkubation wachstumshemmende Eigenschaften an HT29-Zellen (Abb. 44). Allerdings ist die Hemmwirkung des AE02, im Vergleich zum SRB-Test ohne Katalasezusatz, in Konzentrationen ≥ 150 µg/ml signifikant verringert. Der resultierende IC₅₀-Wert von 188 ± 35 µg/ml liegt jedoch im vergleichbaren Konzentrationsbereich, wie der des AE02 ohne Katalase (134 ± 18 µg/ml; Tab. 2). Somit wird deutlich, dass H₂O₂ zwar in höheren Extraktkonzentrationen (≥ 150 µg/ml) einen Beitrag zur Wachstumshemmung leistet, der Apfelsaftextrakt aber auch in Gegenwart von Katalase substantielle Wachstumseffekte vermittelt und folglich die gezeigten wachstumshemmenden Eigenschaften nicht allein auf die H₂O₂-Bildung zurückzuführen sind und somit auch kein experimentelles Artefakt darstellen. Des Weiteren wurden die wachstumshemmenden Eigenschaften des Apfeltresterextraktes AE03B bestimmt.

Ohne Zusatz von Katalase kam es bereits ab einer Konzentration von 200 µg/ml AE03B zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums mit einem IC₅₀-Wert von 301 ± 28 µg/ml (Abb. 45; Tab. 2). In Gegenwart von 100 U/ml Katalase verminderten sich die wachstumshemmenden Eigenschaften (IC₅₀= 365 ± 17 µg/ml) - signifikant verringerte sich die Hemmwirkung jedoch erst mit einer Konzentration von 500 µg/ml AE03B (Abb. 45).

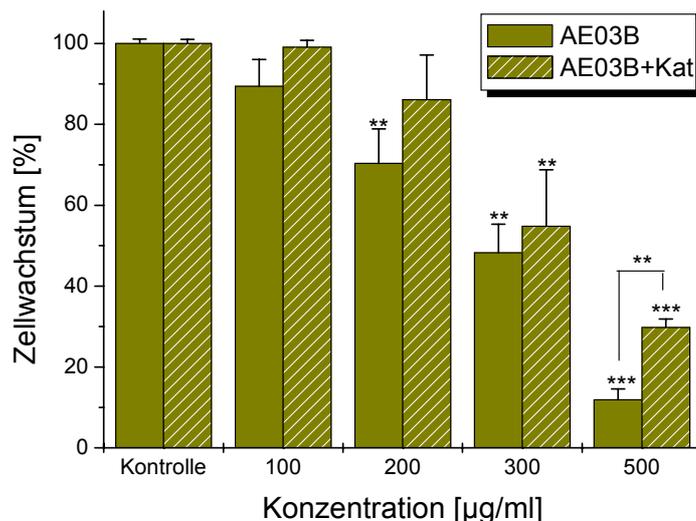


Abb. 45 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch AE03B mit und ohne Katalase (100 U/ml); 72 h serumhaltige Inkubation; SRB-Test; MW \pm SD in mindestens 4 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

Ein Vergleich der IC₅₀-Werte weist jedoch auf einen vergleichbaren Konzentrationsbereich hin (Tab. 2). Somit ist die Hemmung des Zellwachstums auf den Tresterextrakt selbst zurückzuführen und stellt kein experimentelles Artefakt infolge einer H₂O₂-Bildung dar.

Tab. 2 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Apfelextrakte mit und ohne Katalase (100 U/ml); 72 h, serumhaltige Inkubation; SRB-Test; # nicht bestimmt; §Kern et al., 2005; §Fridrich et al., 2007a

Apfelextrakte	Wachstumshemmung: IC ₅₀ -Werte [µg/ml]	
	ohne Katalase	mit Katalase (100 U/ml)
AE02	134 \pm 18 §	188 \pm 35 §
AE03B	301 \pm 28 §	365 \pm 17 §
AE04	236 \pm 56	-#
AE05	-#	> 500
Bohnapfel, klar, SP70	-#	460 \pm 24
Bohnapfel, klar, XAD	-#	> 500
Haux, trüb, XAD	-#	488 \pm 58
Seestermüher, trüb, XAD	-#	> 500
Gehrsrambur, klar, XAD	-#	> 500

Ferner wurde der AE05 sowie die sortenreinen Apfelextrakte Bohnapfel, Seestermüher, Gehrsrambur und Haux in die Untersuchungen miteinbezogen. Die sortenreinen Apfelextrakte stellen u.a. Apfelsorten der Extrakte AE02 und AE05 dar und leisten möglicherweise einen Beitrag zum wachstumshemmenden Potential des AE02 (Kapitel 6.1.6). Hierbei werden zwischen Klar- und

Trübsaft sowie dem Säulenmaterial zur Aufreinigung (SP70-, XAD-Säule) unterschieden (Tab. 9). Der Apfelsaftextrakt AE05 und die sortenreinen Apfelextrakte wiesen in Konzentrationen bis zu 500 µg/ml nur marginal wachstumshemmende Effekte auf.

Durch die Apfelextrakte Bohnapfel (klar, SP70-Säule) und Haux (trüb, XAD-Säule) wurde das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit einem IC₅₀-Wert von ca. 500 µg/ml gehemmt (Abb. 46; Tab. 2). Die Apfelextrakte AE05, Bohnapfel (klar, XAD-Säule), Seestermüher (trüb, XAD-Säule) und Gehrsrambur (klar, XAD-Säule) unterdrückten das Zellwachstum zwar signifikant, jedoch nicht bis auf den 50%-Wert der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 46).

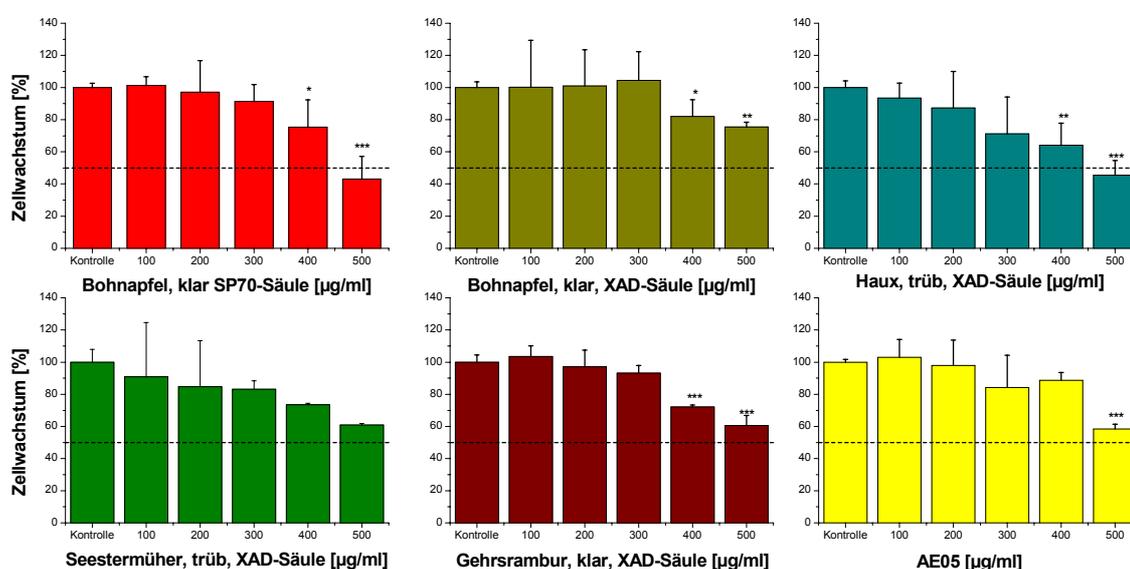


Abb. 46 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch sortenreine Apfelextrakte in Gegenwart von Katalase (100 U/ml); 72 h, serumhaltige Inkubation; SRB-Test; MW ± SD in mindestens 4 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung (Seestermüher: MW ± SD in 2 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung) *: p<0,05; **: p<0,005; ***: p<0,001

Zusammenfassend vermitteln ausschließlich AE02 und AE03B wachstumshemmende Effekte, wobei die Hemmwirkung des AE02 die des AE03B deutlich übersteigt (Tab. 2). Da für den Apfelsaft AS02 ein Polyphenolgehalt von 500 mg/ml bestimmt wurde, liegen die wachstumshemmenden Eigenschaften des Apfelsaftextraktes AE02 im verbraucherrelevanten Konzentrationsbereich. Der AE02 hemmte das Zellwachstum mit einem IC₅₀-Wert von 134 µg/ml (ohne Katalase) bzw. 188 µg/ml (mit Katalase) und befindet sich somit – unabhängig von einem Katalasezusatz – innerhalb des verbraucherrelevanten Konzentrationsbereichs.

Der AE05 sowie die sortenreinen Apfelextrakte zeigten nur eine marginale Wachstumshemmung der HT29-Zellen. Inwieweit jedoch additive oder synergistische Effekte eine Rolle spielen, bleibt noch zu klären.

4.3.3 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die Aktivität des isolierten EGFR

Die polyphenolreichen Apfelextrakte AE02 und AE03B wurden bereits als potente Inhibitoren der Aktivität der Proteintyrosinkinase (PTK) der isolierten EGF-Rezeptorpräparation charakterisiert (Tab. 3) [Fridrich et al., 2007a; Kern et al., 2005]. Im Folgenden wird die Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes AE05 auf den isolierten EGFR dargestellt.

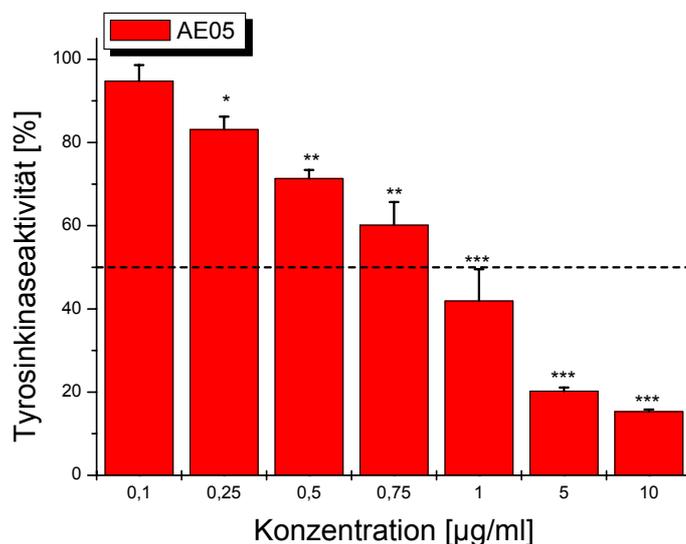


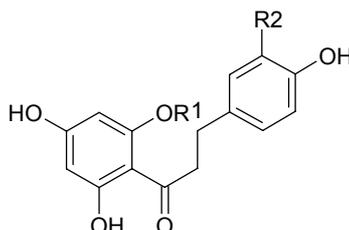
Abb. 47 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch den Apfelsaftextrakt AE05. MW± SD von 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung. *: p<0,01; p**.: p<0,005;***: p<0,001; bezogen auf 0,1 µg/ml AE05

Im Vergleich zu den bisher untersuchten Apfelextrakten ist der Einfluss des AE05 auf die PTK-Aktivität des EGFR mit einem IC₅₀-Wert von 0,9 ± 0,1 µg/ml als höchst potent einzustufen (Abb. 47; Tab. 3). Der Apfelextrakt AE02 zeigte einen um Faktor 10 verringerten Hemmeffekt auf die Aktivität des isolierten EGFR, so dass die EGFR-inhibierenden Eigenschaften der Extrakte untereinander stark divergieren.

Tab. 3 Hemmung der isolierten EGF-Rezeptorpräparation durch Apfelextrakte, [§]Kern et al., 2005; [§]Fridrich et al., 2007a; [#]Dissertation Melanie Kern, 2006

Apfelextrakte	IC ₅₀ -Werte [µg/ml]
AE01	16,8 ± 3,5
AE02	10,8 ± 5,5 [§]
AE03B	1,6 ± 0,2 [§]
AE04	0,30 ± 0,04 [#]
AE05	0,9 ± 0,1

Der Einfluss der charakteristischen Apfelpolyphenole Phloretin und Phloridzin (Phloretin-2-glykosid) (Abb. 48) ist bereits von Kern et al. (2005) auf die PTK-Aktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation getestet worden. Die Dihydrochalkone Phloretin und Phloridzin hemmten als Einzelsubstanzen die EGFR-Aktivität im ELISA mit einem IC_{50} -Wert von $43,4 \pm 5,2 \mu\text{M}$ bzw. von $267 \pm 50 \mu\text{M}$ [Kern et al., 2005]. Während das Aglykon Phloretin nicht in den Apfelextrakten zu detektieren war, sondern ausschließlich Strukturanaloge, zählt das Dihydrochalkonglykosid Phloridzin zu den charakteristischen Apfelinhaltsstoffen der untersuchten Apfelextrakte.



Dihydrochalkone	R1	R2
Phloretin	H	H
Phloretin-2-xyloglukosid	Xyloglukosid	H
Phloridzin	β -D-glukosid	H
3-Hydroxyphloridzin	H	OH

Abb. 48 Phloretin und ausgewählte Phloretinglykoside

Um differenzierte Aussagen über Strukturwirkungsbeziehungen treffen zu können, wurden die Strukturanaloga 3-Hydroxyphloridzin und Phloretin-2-xyloglukosid in die Untersuchungen mit einbezogen (Abb. 48).

Die Glykoside 3-Hydroxyphloridzin und Phloretin-2-xyloglukosid wurden als potente Inhibitoren des isolierten EGFR identifiziert (Abb. 49). Phloretin-2-xyloglukosid hemmte die PTK-Aktivität des EGFR mit einem IC_{50} -Wert von $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Zur Charakterisierung des inhibierenden Potenzials des 3-Hydroxyphloridzins stehen weitere Untersuchungen aus, um eine korrekte Berechnung des IC_{50} -Wertes zu ermöglichen. Vorab wurde ein vorläufiger IC_{50} -Wert von $4,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bestimmt.

Im Vergleich zum Dihydrochalkonglykosid Phloridzin und zum korrespondierenden Aglykon Phloretin wird der EGFR durch 3-Hydroxyphloridzin und Phloretin-2-xyloglukosid potent gehemmt (Tab. 4).

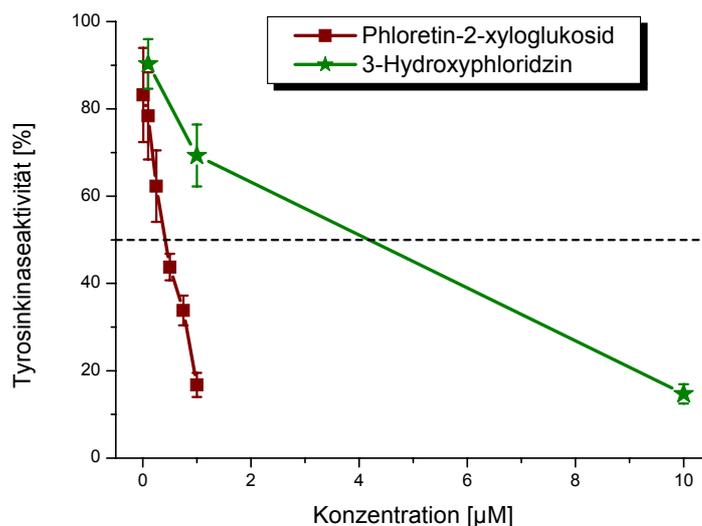


Abb. 49 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch Dihydrochalkone. MW± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung.

Im Vergleich zum Aglykon Phloretin zeigte das Phloretin-2-xyloglukosid einen um Faktor 80 stärkeren Hemmeffekt auf die PTK-Aktivität des EGFR (Abb. 49). Das Hemmpotential des 3-Hydroxyphloridzins ist im Gegensatz zum Phloretin um Faktor 9 erhöht (Abb. 49). Phloridzin (Phloretin-2-glukosid) zeigte mit Abstand den schwächsten Hemmeffekt auf die EGFR-Aktivität (Tab. 4) [Kern et al., 2005].

Tab. 4 Hemmung der isolierten EGF-Rezeptorpräparation durch Dihydrochalkone, [§]Kern et al., 2005

Dihydrochalkone	IC ₅₀ -Werte [µM]
Phloretin	43,4 ± 5,1 [§]
Phloretin-2-xyloglukosid	0,5 ± 0,1
Phloridzin	267 ± 50 [§]
3-Hydroxyphloridzin	4,9 ± 1,5

Im Vergleich zum Phloridzin (Phloretin-2-glukosid) scheint demnach eine zusätzliche Hydroxygruppe am B-Ring (3-Hydroxyphloridzin) oder eine Verknüpfung mit Xyloglukosid statt mit Glukose (Phloretin-2-xyloglukosid) zu einer Verbesserung der Hemmwirkung zu führen (Abb. 48). In Abhängigkeit von der Glykosylierung werden somit die EGFR-inhibierenden Eigenschaften des Aglykons Phloretin moduliert.

4.3.4 Modulation der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen durch Apfelextrakte

Die polyphenolreichen Apfelextrakte AE02 und AE03B wurden bereits als potente Inhibitoren der PTK-Aktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation charakterisiert (Tab. 3, Fridrich et al.,

2007a; Kern et al., 2005). Weiterhin zeigte Kern (2006), dass auch die EGFR-Autophosphorylierung, die ein Maß für die Rezeptoraktivität in HT29-Zellen darstellt, in Konzentrationen bis zu 100 µg/ml AE02 (Western Blot Analyse, $IC_{50} = 4,9 \pm 2,4$ µg/ml) potent gehemmt wird (Dissertation Melanie Kern, 2006). Somit setzte der AE02 nicht nur die PTK-Aktivität der isolierten Rezeptorpräparation herab, sondern unterdrückt auch die Autophosphorylierung des EGFR. Da der AE02 jedoch in Konzentrationen ≥ 100 µg/ml Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium bildet (Kapitel 4.2.1; Fridrich et al., 2007a), sollte die Modulation des Rezeptors in Konzentrationen von 250 µg/ml und 500 µg/ml AE02 untersucht werden. Dazu wurden EGF-stimulierte HT29-Zellen für 45 min mit AE02 serumfrei inkubiert und der Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot Analyse bestimmt. Der EGFR-spezifische Hemmstoff Tyrphostin AG1478 wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zeigte in den durchgeführten Untersuchungen einen potenten Hemmeffekt auf die Autophosphorylierung des EGFR.

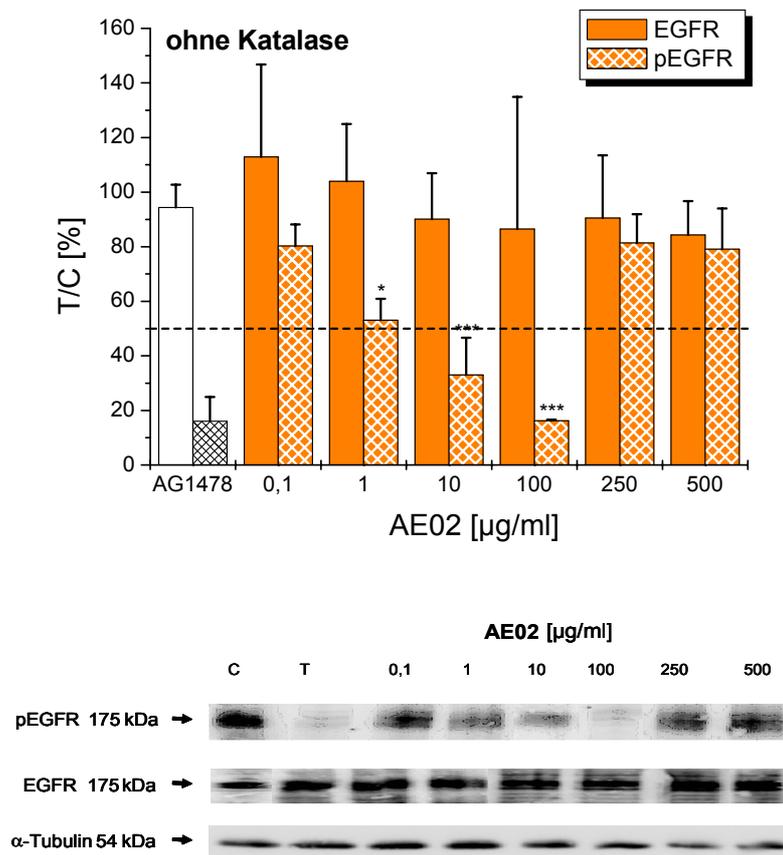


Abb. 50 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch AE02 ohne Katalase, 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); T: Tyrphostin AG1478, EGFR-spezifischer Hemmstoff MW \pm SD von mindestens 4 unabhängigen Experimenten; *: $p < 0,01$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$; bezogen auf 0,1 µg/ml AE02

In Konzentrationen ≥ 250 µg/ml AE02 kam es zu einem Wiederanstieg des Phosphorylierungsstatus bis auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Endkonzentration: 1 %) (Abb.

50; Fridrich et al., 2007a). Somit stellte sich die Frage, inwieweit eine H₂O₂-Entwicklung im Zellkulturmedium zu den bereits beobachteten zellulären Effekten beiträgt. In einem weiteren Experiment wurde die Modulation des EGFR-Phosphorylierungsstatus in Gegenwart von 100 U/ml Katalase untersucht.

In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde eine signifikante Abnahme des Phosphorylierungsstatus des EGFR bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml in HT29-Zellen beobachtet (Abb. 51, IC₅₀ = 90 ± 12 µg/ml). Im Vergleich zur Zellinkubation ohne Katalase blieb ein Wiederanstieg des Gehaltes an phosphoryliertem EGFR aus (Abb. 50 + Abb. 51) [Fridrich et al., 2007a]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation von H₂O₂ im Zellkulturmedium dem EGFR-hemmenden Potential von Apfelpolyphenolen entgegenwirkt.

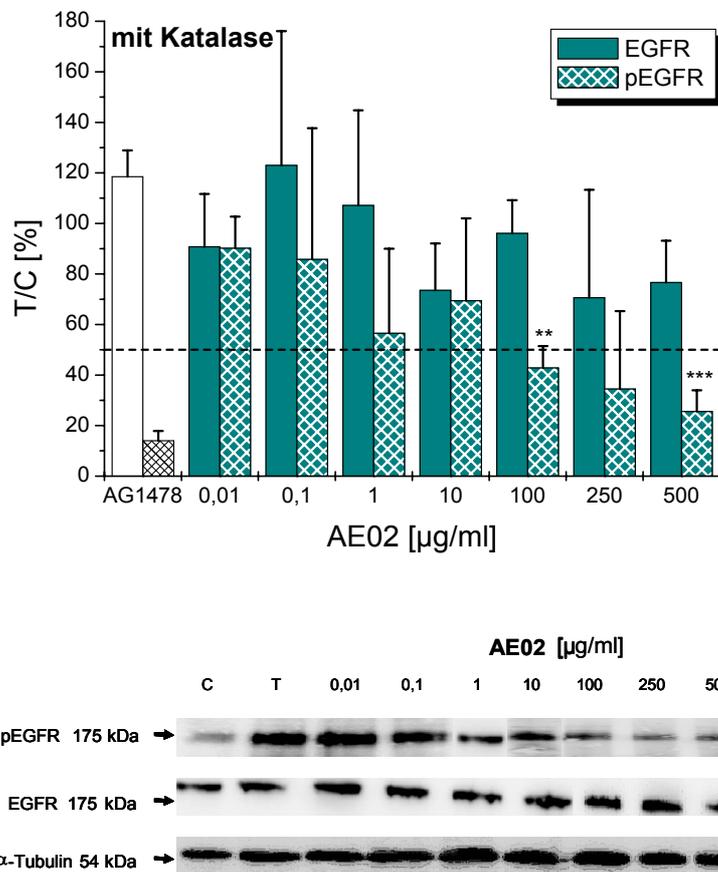


Abb. 51 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch AE02 mit 100 U/ml Katalase; 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); T: Tyrophostin AG1478, EGFR-spezifischer Hemmstoff; MW ± SD von 4 unabhängigen Experimenten; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,005, bezogen auf 0,1 µg/ml AE02

Der Gesamtproteingehalt des Rezeptors blieb durch einen Zusatz von Katalase unbeeinflusst (Abb. 51). Durch Katalasezusatz wurde gezeigt, dass die Apfelpolyphenole selbst potente Hemm-

stoffe des EGFR darstellen, H₂O₂ allerdings die zelluläre Antwort modifiziert und so zur Artefaktbildung führen kann.

Auch der Apfeltresterextrakt AE03B ist als potenter Inhibitor der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA beschrieben und führt in Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ zur Bildung von H₂O₂ im Zellkulturmedium (Tab. 3, Fridrich et al., 2007a). Um den möglichen Einfluss des generierten H₂O₂ auf die Autophosphorylierung des Rezeptors im zellulären System zu bestimmen, wurde die Zellinkubation mit und ohne Katalasezusatz durchgeführt.

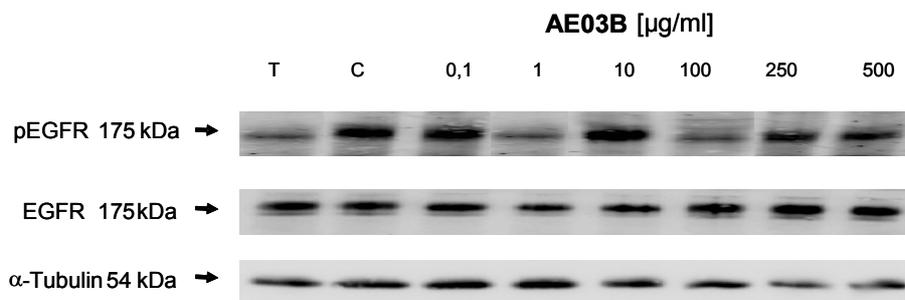
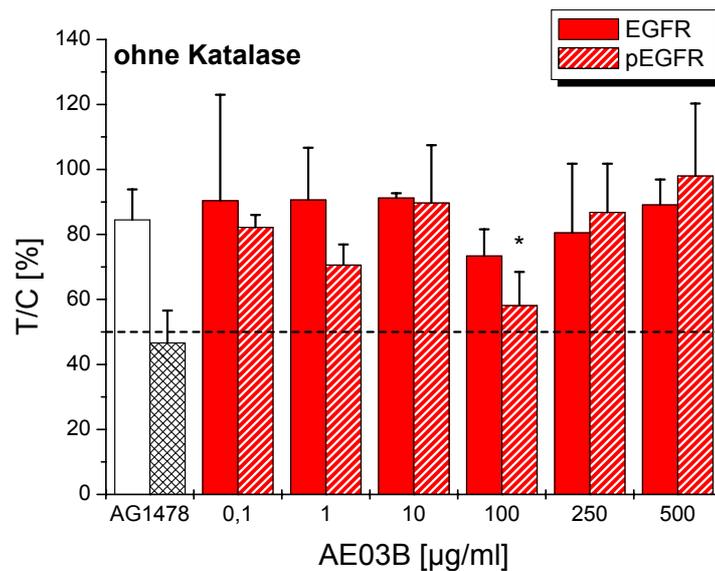


Abb. 52 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch AE03B ohne Katalase; 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); T: Tyrphostin AG1478, EGFR-spezifischer Hemmstoff; MW \pm SD von mindestens 4 unabhängigen Experimenten; *: $p < 0,01$; bezogen auf 0,1 $\mu\text{g/ml}$ AE03B

Die Inkubation von HT29-Zellen mit AE03B bewirkte ohne Zusatz von Katalase bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ nur eine marginale Hemmung des EGFR-Phosphorylierungsstatus. Ab einer Konzentration $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ wurde ein Wiederanstieg an phosphoryliertem EGFR beobachtet, der bei 500 $\mu\text{g/ml}$ AE03B den Wert der Lösungsmittelkontrolle erreichte (Abb. 52). Der Gesamtproteingehalt blieb bis zu 500 $\mu\text{g/ml}$ AE03B unbeeinflusst.

In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml AE03B bestimmt (Abb. 53; IC₅₀-Wert von 48 ± 4 µg/ml). Ein signifikanter Wiederanstieg in Extraktkonzentrationen ≥ 250 µg/ml wurde im Vergleich zum Experiment ohne Katalase vollständig unterdrückt. Somit führte ein Zusatz von Katalase zu einer substantiellen Verbesserung der EGFR-inhibierenden Eigenschaften des AE03B. Des Weiteren blieb ein Einfluss von Katalase auf den Gesamtproteingehalt des EGFR aus.

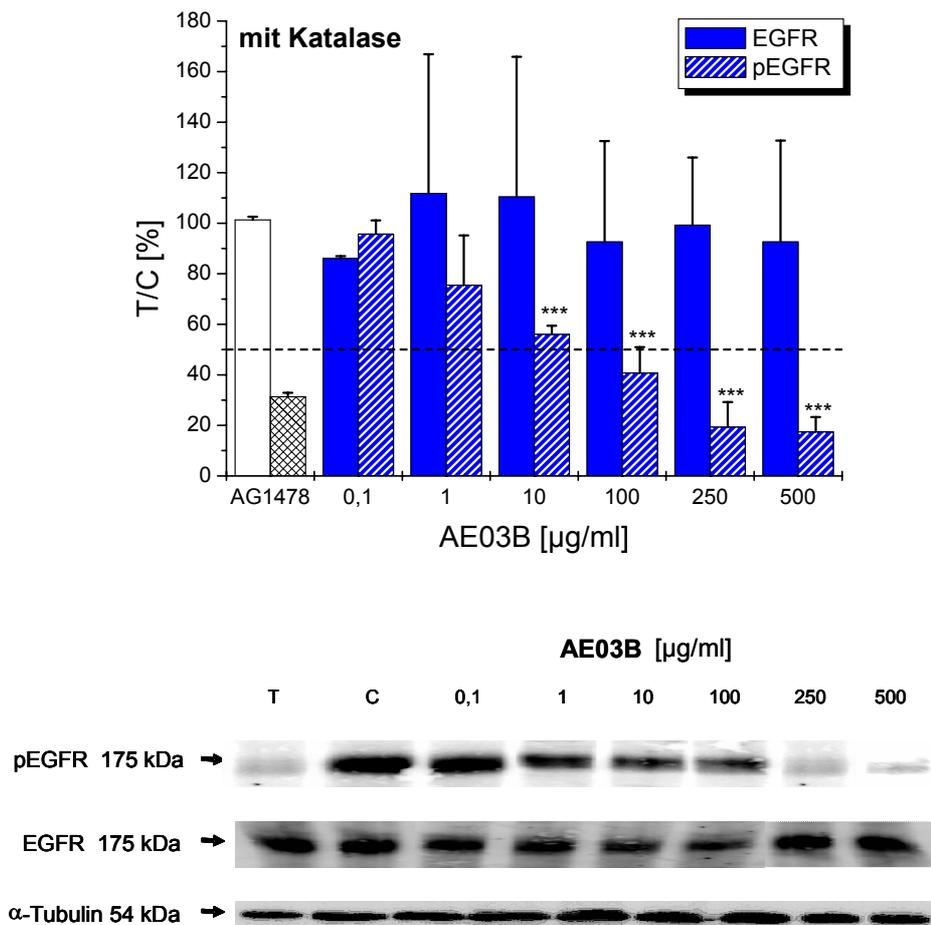


Abb. 53 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch AE03B mit 100 U/ml Katalase; 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); T: Tyrosinkinaseinhibitor AG1478, EGFR-spezifischer Hemmstoff; MW ± SD von mindestens 4 unabhängigen Experimenten; ***: p < 0,001; bezogen auf 0,1 µg/ml AE03B

Aufgrund des potenten Hemmeffekts des AE05 auf die PTK-Aktivität des EGFR wurde sein Einfluss auch in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) auf die Autophosphorylierung des Rezeptors im zellulären Testsystem untersucht. Da der AE05 als Masterextrakt mit AE02-vergleichbaren Eigenschaften angedacht war, sollte sich durch die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus

herausstellen, ob der AE05 auch in intakten HT29-Zellen die EGFR-Aktivität potent unterdrückt und möglicherweise einen AE02-vergleichbaren Hemmeffekt aufzeigt.

Die Bestimmung des EGFR-Phosphorylierungsstatus stellte eine erste orientierende Messung (n=2-3) im zellulären Testsystem dar. Der Apfelsaftextrakt AE05 hemmte in Konzentrationen $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ signifikant die Autophosphorylierung des EGFR (Abb. 54). Der Gesamtproteingehalt unterliegt starken Schwankungen, wird jedoch vermutlich im Rahmen der Fehlertoleranz und mit Blick auf die geringe Anzahl an Wiederholungen (n=2-3) nicht moduliert.

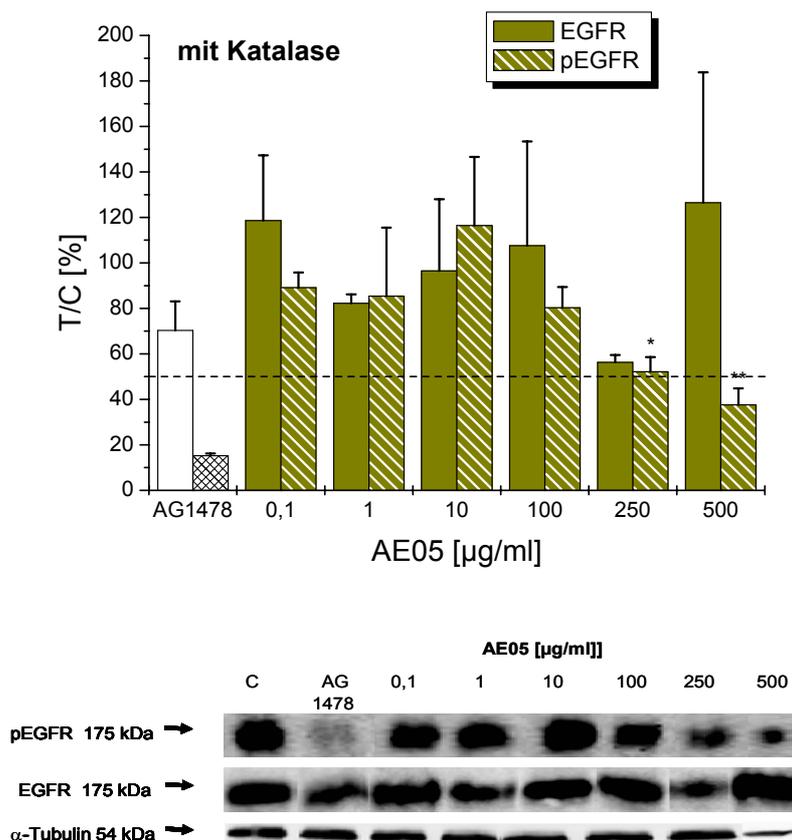


Abb. 54 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch AE05 in Gegenwart von 100 U/ml Katalase; 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); AG1478 (Tyrphostin): EGFR-spezifischer Hemmstoff; MW \pm SD von 3 (pEGFR) bzw. 2 (EGFR) unabhängigen Experimenten; *:p<0,05; **:p<0,005; bezogen auf 0,1 $\mu\text{g/ml}$ AE05

Somit ist die Hemmwirkung des AE05 nicht nur auf die isolierte Rezeptorpräparation begrenzt, sondern auch im zellulären Testsystem zu beobachten. Jedoch erwies sich der „geplante Masterextrakt“ AE05, der in seinen Eigenschaften dem AE02 entsprechen sollte, als deutlich geringer wirksam.

Im Anschluss an die Untersuchungen zur Modulation der Rezeptorautophosphorylierung durch Apfelextrakte mit und ohne Katalase wurde der Einfluss von zugesetztem H_2O_2 auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR bestimmt.

In Konzentrationen von 1, 10 und 100 μM H_2O_2 ließ sich kein Einfluss auf den Gehalt an phosphoryliertem EGFR feststellen (Abb. 55). Während durch Apfelpolyphenole generierte H_2O_2 -Konzentrationen von ca. 1 μM bereits zelluläre Effekte zeigten (Vergleich Abb. 50 bis Abb. 53), bestätigte sich dies für die direkte Zellinkubation mit H_2O_2 nicht. Das bedeutet, dass durch exogen zugesetztes H_2O_2 vollkommen andere Effekte zu erwarten sind, als durch Konzentrationen, die durch Apfelpolyphenole im Zellkulturmedium gebildet werden.

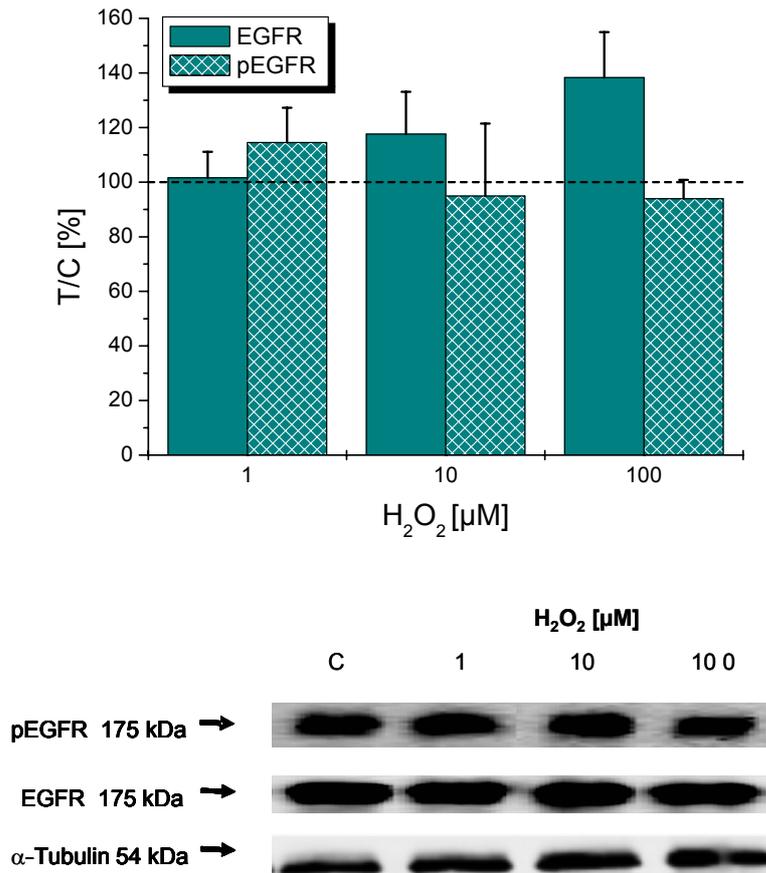
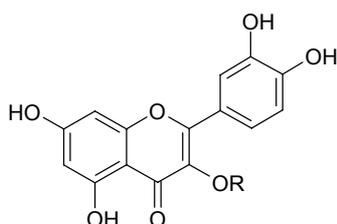


Abb. 55 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch H_2O_2 ; 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO); MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten

Unter Umständen ist dies aber auch auf die Instabilität der licht- und wärmeempfindlichen H_2O_2 -Lösung zurückzuführen, die eine vergleichende Untersuchung mit den im Zellkulturmedium entstehenden H_2O_2 -Konzentrationen nicht möglich macht. Da es im Konzentrationsbereich von 1 bis 100 μM H_2O_2 zu einem Anstieg des Gesamtproteingehaltes des EGFR kommt, bleibt fraglich, inwieweit H_2O_2 Einfluss auf den endogenen EGFR-Phosphorylierungsstatus ausübt.

4.3.5 Einfluss von Quercetinglykosiden auf die EGFR-Aktivität im zellfreien und zellulären Testsystem

Der Apfeltrestereextrakt AE03B enthält im Vergleich zum Apfelsaftextrakt AE02 einen erhöhten Anteil an Quercetinglykosiden (116,2 mg/g bzw. 8,9 mg/g), so dass sich die Frage stellte, inwiefern diese Inhaltsstoffe zum inhibierenden Potential des AE03B beitragen. Daher wurde eine AE03B-äquimolare Mischung erhältlichlicher Quercetinglykoside (Abb. 56) in die Untersuchungen miteinbezogen.



Flavonole	R
Quercetin	H
Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	β -D-glc
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	β -D-gal
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	β -L-rha
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	β -L-rha- β -glc

Abb. 56 Quercetin und ausgewählte Quercetinglykoside

Die Mischung entsprach in ihrer höchsten Konzentration (90 μ M) einer AE03B-Konzentration von 500 μ g/ml und setzte sich aus den folgenden Quercetinglykosiden zusammen: Quercetin-3-glukosid (13 μ M), Quercetin-3-galaktosid (9 μ M), Quercetin-3-rhamnosid (28 μ M) und Quercetin-3-rutinosid (40 μ M).

Die äquimolare Mischung an Quercetinglykosiden führte weder in Kurzzeit- (45 min; Abb. 57A) noch in Langzeitexperimenten (72 h; ohne Abb.) zur Bildung relevanter H₂O₂-Konzentrationen im Zellkulturmedium im Vergleich zur Kontrolle [Fridrich et al., 2007a]. In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde ebenfalls kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet.

In wachstumshemmenden AE03B-Konzentrationen zeigte die Quercetinglykosidmischung keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen (Abb. 57C) [Fridrich et al., 2007a]. Das Ergebnis steht im Einklang mit Daten vorausgegangener Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass Einzelverbindungen von Quercetinglykosiden (Quercetin-3-glukosid, Quercetin-3-galaktosid, Quercetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-rutinosid) marginale bis keine wachstumshemmende(n) Effekte vermitteln [Kern et al., 2005].

Bis zu einer AE03B-Konzentration von 500 µg/ml zeigte die Mischung an Quercetinglykosiden ebenfalls keinen Hemmeffekt auf die PTK-Aktivität des EGFR im isolierten Testsystem (Abb. 57B), während einzelne Quercetinglykosidverbindungen (Quercetin-3-glukosid und Quercetin-3-galaktosid) als potente Inhibitoren charakterisiert wurden [Kern et al., 2005]. Somit scheinen sich die inhibierenden Eigenschaften einzelner Quercetinglykosidverbindungen in der eingesetzten Mischung zu kompensieren, so dass ein Hemmeffekt ausbleibt.

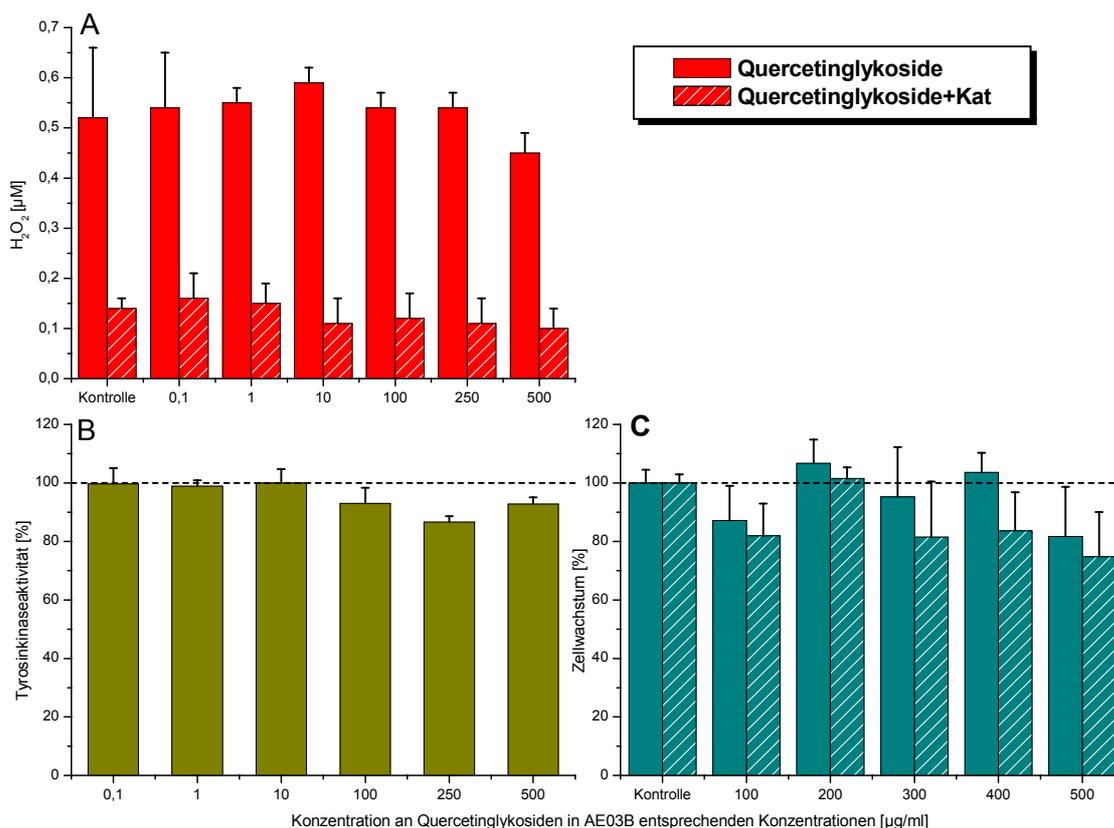


Abb. 57 Effekte der AE03B-äquimolaren Quercetinglykosidmischung A) H₂O₂-Akkumulation im Zellkulturmedium (DMEM, 4500 mg/l Glukose) nach 45 min serumfreier Substanzinkubation mit und ohne Katalase (100 U/ml); Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit (Invitrogen); MW ± SD von n=2 in einer Doppelbestimmung. B) Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA; MW± SD von 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung. C) Wachstumshemmung von HT29-Zellen mit und ohne Katalase (100 U/ml); 72 h serumhaltige Inkubation; SRB-Test; MW ± SD von 5 unabhängigen Untersuchungen in einer Vierfachbestimmung.

Auch in Zellkulturexperimenten wurde die Quercetinglykosidmischung weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Katalase als Inhibitor der EGFR-Autophosphorylierung in HT29-Zellen identifiziert (Abb. 58A+B) [Fridrich et al., 2007a], wie die Daten des SRB-Tests bereits vermuten ließen. Anhand dieser Untersuchungen ist auszuschließen, dass die AE03B-äquimolare Quercetinglykosidmischung einen Beitrag zu den inhibierenden Effekten des Apfeltresterextraktes leis-

tet. Somit muss das wachstums- und EGFR-hemmende Potential des AE03B auf andere Inhaltsstoffe zurückzuführen sein.

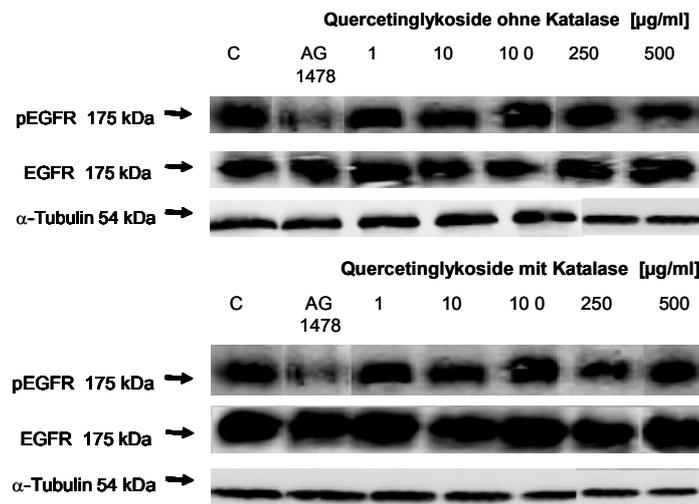
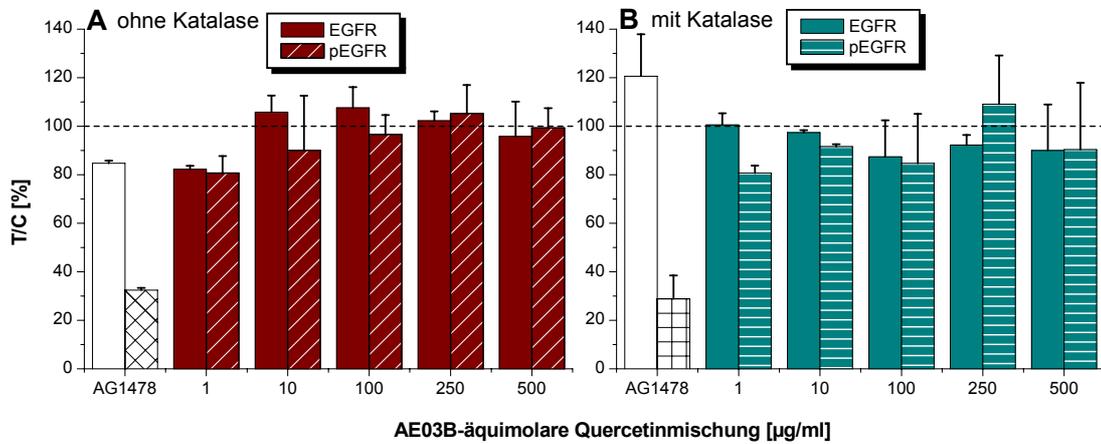


Abb. 58 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch eine AE03B-äquimolaren Quercetinglykosidmischung; 45 min serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; C: Kontrolle (1 % DMSO), AG1478 (Tyrophostin): EGFR-spezifischer Hemmstoff; MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten; A) ohne Katalase und B) mit Katalase (100 U/ml)

4.3.6 Diskussion Apfelextrakte

Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, dass die Apfelextrakte AE02 und AE03B das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 *in vitro* potent hemmen. Dies steht in Einklang mit bereits publizierten Daten, die Apfelpolyphenolen wachstumshemmende Eigenschaften zuschreiben [Verriah et al., 2006; Kern et al., 2005; Gossé et al., 2005; Liu et al., 2003; Wolfe et al., 2003; Sun et al., 2002; Eberhardt et al., 2000].

Im Vergleich zum Saftextrakt AE02 führte die Herstellung des Tresterextraktes AE03B zu substantiellen Unterschieden im Polyphenolmuster (Tab. 2). Insbesondere wurde eine Abnahme an

Cumaroylchinasäure und Chlorogensäure beobachtet, während sich Quercetinglykoside deutlich im AE03B anreicherten (Tab. 2). Quercetin-3-galaktosid und das Quercetin-3-glukosid wurden bereits als Inhibitoren der PTK-Aktivität des EGFR im zellfreien Testsystem beschrieben [Kern et al. 2005]. Dies führte zu der Frage, inwiefern Quercetinglykoside zu den zellulären Effekten des AE03B beitragen. Aufgründessen wurde eine AE03B-äquimolare Mischung aus erhältlichen Quercetinglykosiden (Quercetin-3-glukosid, Quercetin-3-galaktosid, Quercetin-3-rhamnosid und Quercetin-3-rutinosid) hergestellt und in die Untersuchungen miteinbezogen.

Aktuelle Studien zeigten, dass Apfelpolyphenole in Zellkulturexperimenten zur Akkumulation von H_2O_2 im Medium führen, was vermutlich die Bildung experimenteller Artefakte zur Folge hat [Verriah et al., 2006; Liu et al., 2003; Long et al., 2002; Lapidot et al., 2002]. H_2O_2 ist ein Nebenprodukt des zellulären Stoffwechsels aerober Organismen und in der Lage, zelluläre Strukturen oxidativ zu schädigen und deren Funktionalität einzuschränken [Jung und Grune, 2008]. In Gegenwart von Katalase disproportioniert H_2O_2 in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O). Somit stellte sich die Frage, inwieweit bereits beobachtete zelluläre Effekte in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) moduliert werden und möglicherweise auf eine H_2O_2 -Bildung zurückzuführen sind. Nach 45 min serumfreier Substanzinkubation von HT29-Zellen mit AE02, AE03B oder AE05 wurde die Bildung von H_2O_2 in Extraktkonzentrationen $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ im Zellkulturmedium beobachtet (Abb. 43A-C). Dabei lagen die H_2O_2 -generierenden Eigenschaften des AE03B signifikant über denen des AE02 und des AE05. In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde die Bildung von H_2O_2 effizient bis auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle unterdrückt. Nach 72 h Inkubation mit AE02, AE03B oder AE05 wurden keine substantiellen Konzentrationen an H_2O_2 detektiert, unabhängig davon, ob Katalase zugesetzt wurde oder nicht. Die Ergebnisse der Untersuchung der AE03B-äquimolaren Quercetinglykosidmischung zeigten, dass diese Inhaltsstoffe nicht zu den H_2O_2 -generierenden Eigenschaften des AE03B beitragen (Abb. 57A). Im Gegensatz dazu ist nach 45 min Inkubation mit dem Aglykon Quercetin ($70 \mu\text{M}$) ein Anstieg der H_2O_2 -Konzentration auf $2,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ H_2O_2 im Zellkulturmedium zu beobachten [AK Prof. Marko, unveröffentlichte Daten].

Der AE02 führte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Katalase (100 U/ml) zu wachstumshemmenden Effekten (Abb. 44; Tab. 2). Die wachstumshemmenden Eigenschaften des AE03B sind jedoch in Gegenwart von Katalase deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 45). Im Vergleich der Extrakte zeichnete sich der AE02 durch ein signifikant höheres wachstumshemmendes Potential als der AE03B aus (Tab. 2). Die AE03B-äquimolare Quercetinglykosidmischung beeinflusste das Wachstum von HT29-Zellen nicht. Somit lässt das Ergebnis vermuten, dass diese Inhaltsstoffe keinen entscheidenden Einfluss auf die wachstumshemmenden Eigen-

schaften des AE03B haben (Abb. 56C). Auch Kern et al. (2005) publizierten bereits, dass einzelne Quercetinglykoside (Quercetin-3-glukosid, Quercetin-3-galaktosid, Quercetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-rutinosid; Abb. 57) keine substantiellen wachstumshemmenden Effekte vermitteln. Der Apfelsaftextrakt AE05 konnte das Zellwachstum zwar signifikant, jedoch nicht bis auf den 50 %-Wert der Lösungsmittelkontrolle unterdrücken (Abb. 46). Weiterhin wurden sortenreine Apfelextrakte in die Untersuchungen miteinbezogen, deren Apfelsorten Bestandteile des AE02 und/oder des AE05 sind. Auch diese sortenreinen Apfelextrakte konnten in Konzentrationen bis zu 500 µg/ml nur marginal wachstumshemmende Effekte vermitteln (Abb. 46). Im Vergleich verschiedener Extrakte zeigte der AE02 mit Abstand das stärkste wachstumshemmende Potenzial, während der AE05 und die sortenreinen Apfelextrakte bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml das Zellwachstum nur marginal bzw. kaum unter den 50 %-Wert der Lösungsmittelkontrolle unterdrückten (Tab. 2). Somit ist ein Beitrag der untersuchten sortenreinen Apfelextrakte zu den potenten wachstumshemmenden Eigenschaften des AE02 auszuschließen.

Zur Untersuchung der zellulären Mechanismen wurde zunächst der Einfluss der Extrakte auf die PTK-Aktivität des EGFR im zellfreien System bestimmt. Im Vergleich zu den Ergebnissen des SRB-Tests hemmte der AE03B die Aktivität des isolierten EGFR wesentlich potenter als der AE02 (Tab. 3) [Fridrich et al., 2007a; Kern et al., 2005]. Die eingesetzte Quercetinglykosidmischung zeigte hingegen in AE03B-hemmenden Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation (Abb. 56C) [Fridrich et al., 2007a], während Quercetin-3-glukosid und Quercetin-3-galaktosid als Einzelsubstanzen die EGFR-Aktivität potent hemmten [Kern et al., 2005]. Somit scheinen sich die hemmenden Effekte der Einzelsubstanzen innerhalb der Quercetinglykosidmischung aufzuheben. Im Vergleich zu den bisher untersuchten Apfelextrakten ist die Hemmwirkung des AE05 auf die PTK-Aktivität des EGFR mit einem IC₅₀-Wert von $0,88 \pm 0,06$ µg/ml als hoch potent einzustufen (Tab. 3). Der Apfelextrakt AE02 zeigte hingegen einen um Faktor 10 verringerten Hemmeffekt auf die Aktivität des isolierten EGFR.

Die charakteristischen Apfelpolyphenole 3-Hydroxyphloridzin und Phloretin-2-xyloglykosid wurden als potente Inhibitoren der EGF-Rezeptorpräparation identifiziert. Im Vergleich zum Aglykon Phloretin wurde die Hemmwirkung des Phloretin-2-xyloglukosids auf die PTK-Aktivität des EGFR um den Faktor 80 und die des 3-Hydroxyphloridzins um den Faktor 9 erhöht (Abb. 49). Phloridzin (Phloretin-2-glukosid) zeigte mit Abstand den schwächsten Hemmeffekt auf den isolierten Rezeptor (Tab. 4) [Kern et al., 2005]. Demnach scheint im Vergleich zum Phloridzin eine zusätzliche Hydroxygruppe am B-Ring oder eine Glykosylierung mit Xyloglukosid statt mit Glukose zu einer verbesserten Hemmwirkung zu führen. Aufgrund der potenten Hemmung des isolierten EGFR durch 3-Hydroxyphloridzin und Phloretin-2-xyloglukosid sollte in weiterführenden

den Untersuchungen der Fragestellung nachgegangen werden, ob diese beiden Verbindungen auch im zellulären System aktiv sind, was aufgrund der begrenzten Stoffmenge nicht möglich war.

Im zellulären Testsystem spiegelt der Phosphorylierungsstatus die Rezeptoraktivität wider, die entscheidend ist für die Interaktion der PTK-Domäne mit nachgeschalteten Elementen der MAPK-Kaskade ist [Boonstra et al., 2005; Fan et al., 2005; Liang et al., 1997]. Die Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung wurde bereits für zahlreiche Flavonoide wie beispielsweise das Grünteechatechin (-)-Epigallocatechin-3-gallat, das Flavonol Quercetin und das Flavon Luteolin publiziert [Fan et al., 2005; Boonstra et al., 2005; Lee et al., 2002].

Nach Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit dem polyphenolreichen Apfelsaftextrakt AE02 wurde die EGFR-Autophosphorylierung bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml potent gehemmt (Abb. 51). Dieses Ergebnis stimmte mit den PTK-hemmenden Konzentrationen des Apfelsaftextraktes im EGFR-ELISA überein (Tab. 3). Allerdings führten Konzentrationen ≥ 100 µg/ml AE02 zur Bildung substantieller Mengen an H₂O₂, was wiederum einen Wiederanstieg des Phosphorylierungsstatus in Konzentrationen ≥ 250 µg/ml AE02 bewirkte. Um die H₂O₂-Akkumulation im Zellkulturmedium zu unterdrücken, wurde in weiteren Untersuchungen Katalase (100 U/ml) zugesetzt. In Gegenwart von Katalase wurde zwar in Konzentrationen bis 500 µg/ml eine schwächere Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung beobachtet, jedoch blieb ein Wiederanstieg aus (Abb. 52). Im Vergleich zum AE02 zeigte der AE03B ohne den Zusatz von Katalase nur marginale Hemmeffekte auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR, wobei auch hier ein Wiederanstieg des phosphorylierten Rezeptors in Konzentrationen ≥ 250 µg/ml beobachtet wurde (Abb. 53). In Gegenwart von Katalase kam es jedoch zu einer potenten Hemmwirkung (Abb. 53). Somit gilt für beide Extrakte, dass ein Zusatz von Katalase einen Wiederanstieg des phosphorylierten EGFR in Konzentrationen ≥ 250 µg/ml verhindert. Durch Zusatz von Katalase wurde gezeigt, dass die Apfelpolyphenole selbst potente Hemmstoffe des EGFR darstellen, H₂O₂ allerdings die zellulären Endpunkte modifizieren und so zur Artefaktbildung führen kann. Die Quercetinglykosidmischung blieb unabhängig vom Katalasezusatz ohne Einfluss auf die Rezeptorautophosphorylierung (Abb. 58). Für den Apfelsaftextrakt AE05 wurde in Gegenwart von Katalase zwar eine Hemmwirkung des Phosphorylierungsstatus bestimmt, jedoch ist diese Hemmung deutlich marginaler als die des AE02 oder des AE03B (Abb. 54). Zusammenfassend zeigte sich im Vergleich der Extrakte, dass der AE02 mit Abstand das stärkste wachstumshemmende Potenzial besitzt. Auch die isolierte EGF-Rezeptorpräparation wurde durch die Apfelextrakte potent gehemmt: AE05 > AE03B >> AE02. In Gegenwart von Katalase spiegelte sich die potentere Hemmwirkung des AE03B, im Vergleich zum AE02 auch auf die Auto-

phosphorylierung des EGFR wider. Der „geplante Masterextrakt“ AE05, der in seinen Eigenschaften dem AE02 entsprechen sollte, wies im zellulären System marginale Hemmeffekte auf.

4.4 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung des AE04

Um die potentiell und präventiv wirksamen Inhaltsstoffe zu identifizieren, wurde eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE04 durchgeführt. Der AE04, der als Hauptkomponenten 5-Kaffeoylchinasäure (Chlorogensäure), 4-Cumaroylchinasäure, Phloretinxyloglykosid und Phloridzin enthält (Tab. 2), wurde bereits als hochpotenter Hemmstoff der isolierten EGF-Rezeptorpräparation charakterisiert ($IC_{50} = 0,30 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$) [Dissertation Melanie Kern, 2006]. Im Arbeitskreis von Professor Schreier (Universität Würzburg) wurde der AE04 mittels Chromatographie an Sephadex LH-20 (Säulendimension 2000 x 25 mm) aufgereinigt und vorfraktioniert. Anhand einer dünnschichtchromatographischen Analyse wurde eine Einteilung in acht Grundfraktionen S.1 bis S.8 vorgenommen. Nach abgeschlossener Trennung erfolgte die Regenerierung des Säulenmaterials, wobei stark unpolare Substanzen eluiert wurden (Fraktion S.9). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die neun Grundfraktionen in Wasser aufgenommen. Dabei kristallisierte in Fraktion S.6, S.7 und S.8 ein Niederschlag aus, der nach Abtrennung und Waschung zusätzlich gewonnen wurde.

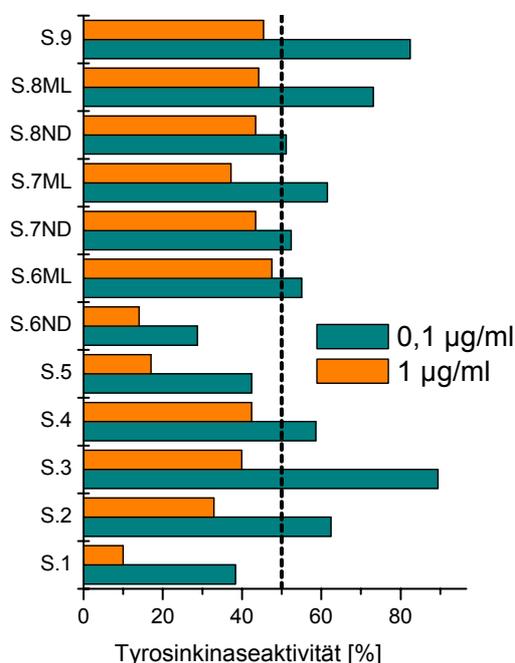


Abb. 59 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA nach Inkubation mit den AE04-Grundfraktionen S.1 bis S.9; 1 Experiment in einer Dreifachbestimmung (ND: Niederschlag; ML: Mutterlauge)

Fraktion S.9 war vollständig wasserunlöslich (Analytik Tab. 10). Die Fraktionen wurden hinsichtlich ihres Hemmeffektes auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation im ELISA Testsystem untersucht.

Die zu untersuchenden Fraktionen wurden in einem ersten orientierenden Experiment in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml getestet. Als besonders potente Fraktionen traten dabei die Fraktion S.1, S.5 und S.6ND hervor (Abb. 59). In Konzentrationen von 0,1 µg/ml wurde die PTK-Aktivität des EGFR durch die Fraktionen zu 60-70 % gehemmt, während bei 1 µg/ml die Hemmung bereits > 80 % war. Auffällig ist, dass die Fraktionen S.1, S.5 und S.6ND mit einem IC₅₀-Wert von < 0,1 µg/ml einen stärkeren Hemmeffekt auf die Tyrosinkinaseaktivität als der Gesamtextrakt zeigten (AE04: IC₅₀ = 0.30 ± 0.04 µg/ml). Charakteristisch für diese drei Fraktionen ist ein hoher Gehalt an polymeren Procyanidinen 650 – 940 mg/g (Tab. 10). Da Fraktion S.5 zusätzlich eine starke Inhibierung der Cyclooxygenase 1 aufwies [BMBF-Zwischenbericht, Dr. Gerhäuser, DKFZ Heidelberg], wurde diese Fraktion mittels Flash-Chromatographie an einer Octadecylphase (C18) weiter aufgetrennt. Dabei wurden zehn Subfraktionen (S.5.1 - S.5.10; Analytik Tab. 11) erhalten, deren Hemmeffekte auf die PTK-Aktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation ebenfalls getestet wurden.

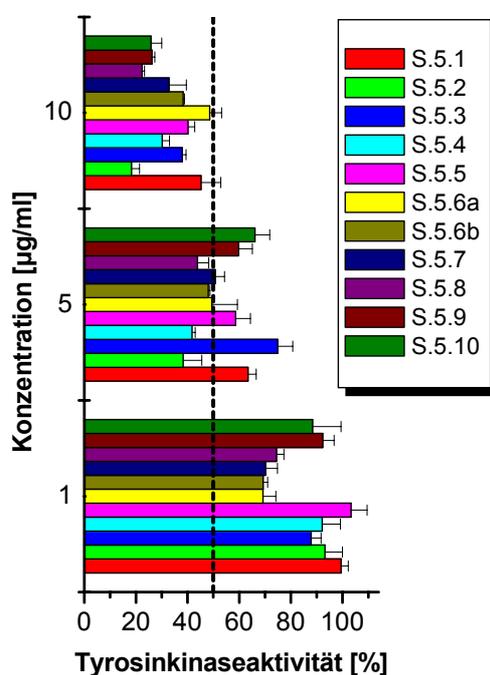


Abb. 60 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA nach Inkubation mit den AE04-Subfraktionen S.5.1 bis S.5.10; MW ± SD von 2 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung

Die Subfraktionen S.5.1 bis S.5.10 unterdrückten in Konzentrationen von 10 µg/ml die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR um 50 % (Abb. 60). Im Vergleich zur Grundfraktion S.5 deren IC₅₀-Wert < 0,1 µg/ml lag, zeigten die Subfraktionen S.5.1 – S.5.10 einen um Faktor 100 schwächeren Hemmeffekt auf den isolierten Rezeptor. Möglicherweise ist die abgeschwächte Hemmwirkung in den Subfraktionen darauf zurückzuführen, dass es sich weitestgehend um Einzelsubstanzen handelte, deren inhibierendes Potential nicht ausreicht, um eine potente Hemmung der EGFR-Aktivität hervorzurufen. Anscheinend vermag erst eine komplexe Mischung aus Polyphenolen die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR potent zu unterdrücken. So besteht die Grundfraktion S.5 aus einer Mischung aus (-)-Epicatechin, Phloretin, Phloretinglykosiden, Quercetin, Quercetinglykosiden sowie dimeren und polymeren Procyanidinen (Tab. 11) und ähnelt damit dem Apfelsaftextrakt AE04. Vermutlich kommt es in einem komplexen Polyphenolgemisch zu additiven und/oder synergistischen Hemmeffekten.

Aus Subfraktion S.5.7 gelang die Isolierung von drei Reinsubstanzen. Dabei handelte es sich um 3-Hydroxyphloridzin, Quercetin-3-*O*-β-D-galaktosid und Quercetin-3-*O*-β-D-glukosid [BMBF-Zwischenbericht, Prof. Schreier, Universität Würzburg]. Für diese drei Reinsubstanzen wurden IC₅₀-Werte im Konzentrationsbereich von 5-7 µM bestimmt [Quercetinglykoside: Kern et al., 2005]. Da für die Subfraktion S.5.7 jedoch keine Quantifizierung vorliegt, kann keine Aussage über den Beitrag der einzelnen Substanzen zum Hemmeffekt der Subfraktion (IC₅₀-Wert: ~ 5 µg/ml) gemacht werden.

Ferner wurden die Grundfraktionen S.1 – S.9 des AE04 als besonders potente Inhibitoren der isolierten EGF-Rezeptorpräparation identifiziert (Abb. 59) und mit auffallend hohen Konzentrationen an oligomeren Procyanidinen bestimmt (Tab. 10). Im Folgenden sollte daher geklärt werden, inwieweit die Procyanidine des AE04 und deren Polymerisationsgrad einen Einfluss auf die Aktivität des EGFR haben. Des Weiteren ist bereits bekannt, dass oligomere Procyanidine abhängig von ihrem Oligomerisierungsgrad potente Hemmstoffe des EGFR sowohl im isolierten Testsystem als auch in HT29-Zellen darstellen [Fridrich et al., 2007b]. Zur Trennung der Procyanidine nach ihrem Oligomerisierungsgrad wurde der Apfelsaftextrakt AE04 an Kieselgel aufgereinigt, wobei sich der Gradient an einer Methode von Sudjaroen et al. (2005) orientierte. Leider sind die glykosylierten Polyphenole sehr spät eluiert, so dass es Überlagerungen mit den Procyanidinen gab [persönliche Mitteilung, Wolfgang Hümmer]. Insgesamt wurden fünf Fraktionen gewonnen, deren Oligomerisierungsgrad von Fraktion F1 (procyanidinfrei) zu Fraktion F5 (Oktaomer) anstieg (Tab. 5) [persönliche Mitteilung, Wolfgang Hümmer].

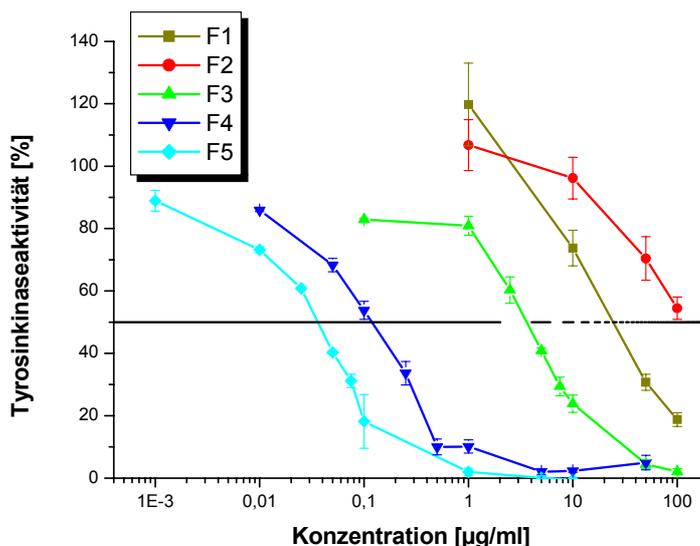


Abb. 61 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA nach Inkubation mit den AE04 Fraktionen F1 bis F5; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten

Abb. 61 zeigt, dass die Hemmwirkung der Fraktionen auf die PTK-Aktivität des EGFR mit steigendem Oligomerisierungsgrad der Procyanidine zunimmt: $F5 > F4 > F3 \gg F1 \gg F2$ (Tab. 5).

Tab. 5 Hemmung der EGFR-Aktivität durch die AE04-Fraktionen F1-F5 im ELISA

AE04-Fraktionen	IC ₅₀ -Werte [µg/ml]
F1	39,5 \pm 18,0
F2	> 100
F3	4,0 \pm 1,2
F4	0,15 \pm 0,03
F5	0,04 \pm 0,01

Für Fraktion F1, die procyanidinfrei ist und in der ausschließlich Chlorogensäure, p-Cumarsäure und 4-Cumaroylchinasäure zu finden sind (Tab. 12), wurde ein IC₅₀-Wert von ca. 40 µg/ml bestimmt. Jedoch ist bereits bekannt, dass von Chlorogensäure und 4-Cumaroylchinasäure nur eine marginale Hemmung auf die isolierte Rezeptorpräparation ausgeht, da die IC₅₀-Werte > 300 µM liegen [Kern et al., 2005]. Unter Berücksichtigung der Molarität liegen in Fraktion F1 1,3 µM Chlorogensäure, 1,6 µM p-Cumarsäure und 0,2 µM 4-Cumaroylchinasäure vor. Somit wäre davon auszugehen gewesen, dass keine Hemmwirkung durch die Fraktion erfolgt. Da jedoch ein Hemmeffekt vorliegt, muss dieser vermutlich auf noch unbekannte Inhaltsstoffe zurückzuführen sein. Möglicherweise kommt es aber auch zu synergistischen Effekten. Fraktion F2 enthielt im Vergleich zu F3-F5 nur einen sehr geringen Anteil an Procyanidinen (F2: 70 mg/g; F3-F5: 300-

1000 mg/g), der sich auch in der Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR widerspiegelte. Fraktion 5, die ausschließlich aus polymeren Procyanidinen besteht, zeigte das stärkste inhibierende Potential auf die isolierte Rezeptorpräparation. Dies stimmt auch mit bereits publizierten Daten überein, in denen gezeigt werden konnte, dass der Hemmeffekt von Procyanidinen auf die isolierte EGF Rezeptorpräparation vom Monomer zum Tetramer ansteigt [Fridrich et al., 2007b]. Ferner wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die im ELISA als hochpotent identifizierten Fraktionen den Status der Phosphorylierung des EGFR, als Maß für dessen Rezeptoraktivität, in intakten Zellen modulieren können. Zur Unterdrückung der Bildung von H₂O₂ wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) mit den einzelnen Fraktionen inkubiert.

In einer ersten orientierenden Messung zeigte die procyanidinfreie Fraktion F1 mit Abstand die potenteste Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Abb. 62A+B). Während Fraktion F2 noch einen marginalen Hemmeffekt vermittelte, waren die Fraktionen F3 bis F5 in Konzentrationen von 100 µg/ml weitestgehend unwirksam (Abb. 62B+C). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Hemmwirkung in der Zelle, im Gegensatz zur isolierten Rezeptorpräparation, aufgrund des Molekulargewichtes der Procyanidine limitiert zu sein scheint. Dies korreliert mit bereits publizierten Daten über isolierte Procyanidine, in denen gezeigt wurde, dass das Procyanidintrimer im intakten Zellsystem einen effizienteren Hemmstoff der EGFR-Autophosphorylierung als das Procyanidintetramer darstellt [Fridrich et al., 2007b]. Für Fraktion F1 und F2 wurde exemplarisch der Effekt auf den Gesamtproteingehalt bestimmt, der jedoch im Rahmen der Fehlertoleranz unbeeinflusst blieb.

Um die Ergebnisse zu vervollständigen und abzusichern, wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Schreier ein weiterer Teil der Fraktionen F2-F5 zur Verfügung gestellt. Aufgrund von Problemen hinsichtlich des Phospho-EGFR-Antikörpers, der nicht mehr ausreichend sensitiv war, die Phosphorylierungsstelle Tyr1173 in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 zu detektieren, wurde versuchsweise die humane Vulvakarzinomzelllinie A431 eingesetzt, die charakteristisch für die Überexpression des EGFR ist.

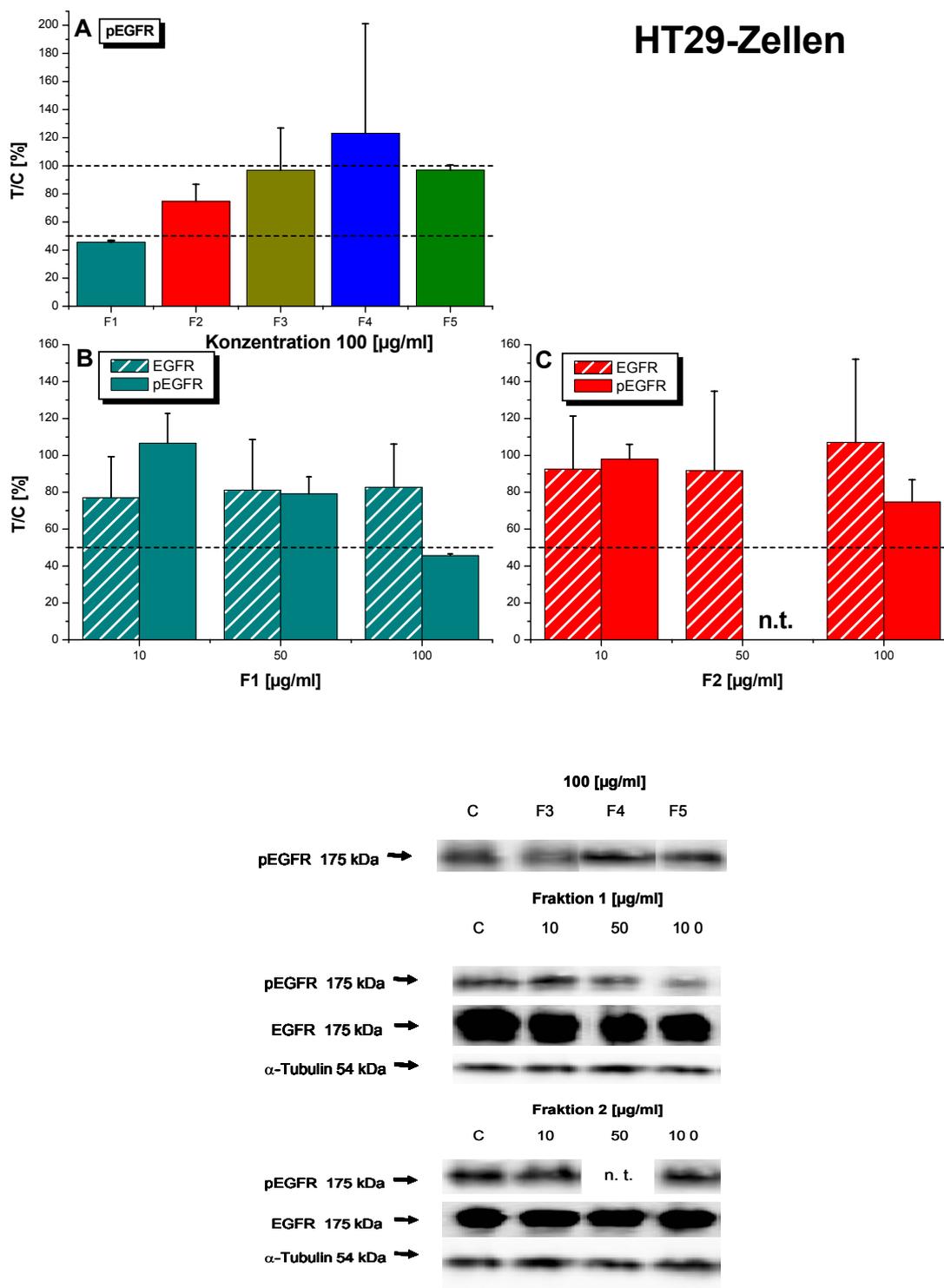


Abb. 62 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten HT29-Zellen durch die AE04-Fraktionen F1-F5 in Gegenwart von Katalase (100 U/ml); 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; MW ± SD von 2 unabhängigen Experimenten, A) Fraktionen F1-F5, B) Fraktion F1, C) Fraktion F2; n.t. nicht getestet; C, Kontrolle (1 % DMSO)

In A431-Zellen wurde in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) eine potente Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung durch Fraktion F5 hervorgerufen (Abb. 63). Auch durch Fraktion F4 wur-

de der Phosphorylierungsstatus zu 50 % unterdrückt. Fraktion F2 und F3 blieben weitestgehend unwirksam und zeigten damit vergleichende Effekte in A431- und HT29-Zellen. Inwieweit die unterschiedlichen Hemmeffekte auf die Zelllinie oder möglicherweise auf eine Veränderung im Polyphenolmuster der Fraktionen durch Lagerung und unhomogene Verteilung zurückzuführen sind, muss in weiterführenden Untersuchungen noch geklärt werden.

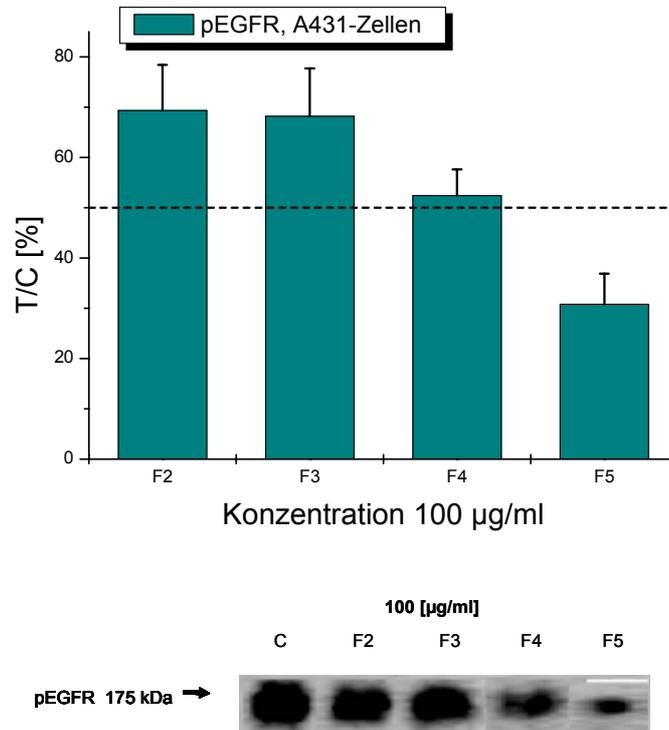


Abb. 63 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten A431-Zellen durch die AE04-Fraktionen F2-F5 in Gegenwart von Katalase (100 U/ml); 45 min, serumfreie Inkubation; Western Blot Analyse; MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten; C: Kontrolle (1 % DMSO)

Abhängig vom Oligomerisierungsgrad der Procyanidine beobachteten auch Miura et al. (2008) in *in vitro* und *in vivo* Experimenten, dass eine hoch potente Wachstumshemmung von Mäusetumorzellen durch Procyanidinpentamere und höher oligomere Procyanidine auftritt.

Die getesteten procyanidinreichen Fraktionen lassen vermuten, dass oligomere Procyanidine zu den EGFR-inhibierenden Eigenschaften des Apfelsaftextraktes AE04 beitragen. Auch wenn im Rahmen der analytischen Untersuchungen noch keine konkreten Aussagen über den Oligomerisierungsgrad der einzelnen Fraktionen gemacht werden können, so scheinen sich jedoch im Besonderen höher oligomere Procyanidine als hoch potente Inhibitoren der isolierten EGF-Rezeptorpräparation herauszustellen. Allerdings scheint die Hemmwirkung hinsichtlich des Molekulargewichtes der Verbindungen im zellulären System begrenzt zu sein und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.5 Modulation der DNA-Methylierung durch Apfeltresterextrakt

Zahlreiche Studien zeigen, dass gerade bei der Kolonkanzerogenese epigenetische Prozesse wie die DNA-Methylierung eine nicht unerhebliche Rolle spielen [Cappell, 2007; Lesche und Eckhardt, 2007; Karoui et al., 2007]. Vielfach sind in Tumoren proliferationsassoziierte Gene zwar noch intakt, aber durch eine sogenannte Promotormethylierung stillgelegt. Im Besonderen scheinen dabei Polyphenole in der Lage zu sein, diese Hypermethylierungen aufzuheben und stillgelegte Gene zu reaktivieren [Fang et al., 2007; Fini et al., 2007; Lee und Zhu, 2006]. Fini et al. (2007) konnten das demethylierende Potential bereits für einen polyphenolreichen Apfelextrakt in *in vitro* Untersuchungen nachweisen.

4.5.1 Methylierungsspezifische PCR und Transkriptionsanalyse des p16^{INK4a}-Gens

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Einfluss des Apfeltresterextraktes AE03B auf die Promotormethylierung des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht werden. p16^{INK4a} ist ein Hemmstoff der cyclinabhängigen Kinasen 4 (CDK4) und 6 (CDK6) und stellt eine Art „molekulare Bremse“ im Zellzyklus dar, durch dessen Verlust es zu einer erhöhten Zellproliferation kommt. Im Rahmen der Untersuchung wurde eine methylierungsspezifische PCR (MSP-PCR) in Form einer „nested“ Zweistufen-PCR nach Lee & Zhu (2005) etabliert. Als Positivkontrolle diente der DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-CdR; Abb. 64) in einer Konzentration von 15 µM.

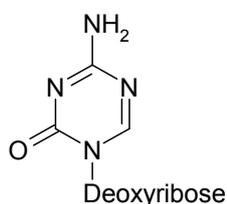


Abb. 64 Struktur des DNA-Methyltransferaseinhibitors 5-Aza-2'-deoxycytidin

Mit einer Zunahme von nichtmethylierten DNA-Fragmenten im p16^{INK4a}-Genpromotor ist ein Anstieg von p16^{INK4a}-Transkripten zu erwarten, die zusätzlich mittels quantitativer PCR aus parallel isolierter RNA überprüft werden sollten. Die genomische DNA und die Gesamt-RNA wurden mittels des AllPrep DNA/RNA Mini Kits (Qiagen) aus einem gemeinsamen Inkubationsansatz von HT29-Zellen isoliert. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA einer Bisulfitbehandlung (DNA Methylation Gold Kit, Zymo Research) unterzogen, um methylierte Cytosine in Uracil zu konvertieren. Durch die folgende MSP-PCR wurde im ersten Schritt ein DNA-Fragment der Größe von 208 bp erhalten, das dann als Matritze zur Amplifikation der methylierten (M) und nichtmethylierten (N) DNA-Fragmente (81 bp) eingesetzt wurde (Abb. 65). Die Methode wurde unter Berücksichtigung eines internen Kontrollfragments (IC) von 155 bp durchgeführt.

Aufgrund der zwei PCR-Schritte wurde die Produktspezifität der Reaktion deutlich gesteigert.

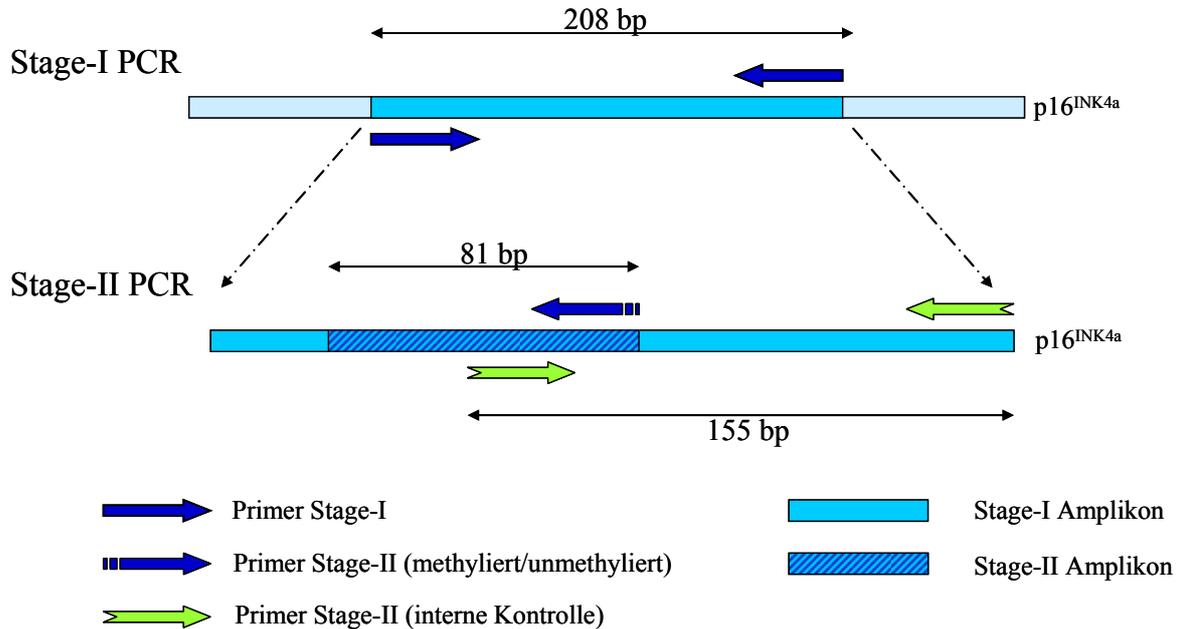


Abb. 65 Methylierungsspezifische PCR (MSP-PCR) in Form einer „nested“ Zweistufen-PCR nach Lee & Zhu (2005)

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels der LAS 3000 (Raytest) qualitativ ausgewertet. Zur Überprüfung der MSP-PCR wurde mit Beginn der Bisulfitbehandlung zu jeder Untersuchungsreihe eine H₂O_{DEPC}-Kontrolle mitgeführt. In dieser Probe sollte kein Amplifikat vorhanden sein, sofern keine Verunreinigung mit DNA vorliegt. Ein zu detektierendes DNA-Fragment in der H₂O_{DEPC}-Kontrolle deutet auf eine Kontamination innerhalb des Experimentes hin und führt zu einem nicht (bzw. begrenzt auswertbaren) Ergebnis.

Zur Quantifizierung der Transkripte des p16^{INK4a}-Gens wurde die Gesamt-RNA mit Oligo-dt-Primern und einer Reversen Transkriptase in die komplementäre cDNA umgeschrieben (Omni-script RT Kit, Qiagen). Die erhaltene cDNA diente anschließend als Matritze in der Real-Time-PCR, wo Amplifizierung und Quantifizierung parallel stattfinden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden. Dabei stieg mit der Menge der PCR-Produkte die gemessene Fluoreszenz proportional an. Bei der hier durchgeführten Quantifizierung handelte es sich um eine relative Quantifizierung bezogen auf das endogene „housekeeping“ Gen β -Aktin. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Polyphenole unter Zellkulturbedingungen H₂O₂ im Medium generieren und so zu experimentellen Artefakten führen können [Kern et al., 2007b; Fridrich et al., 2007; Hou et al., 2005; Dashwood et al., 2002; Lapidot et al., 2002; Halliwell et al.,

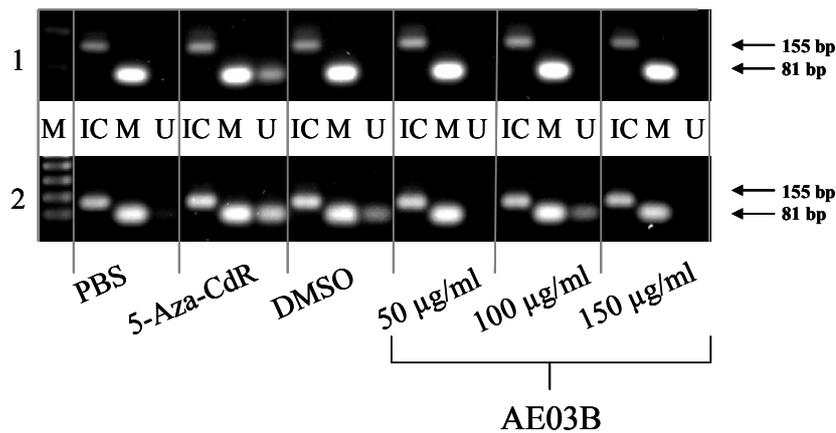
2000]. Auch der zu untersuchende Apfeltresterextrakt AE03B bildete im Zellkulturmedium substantielle Mengen an H_2O_2 (Abb. 43B). Somit stellte sich weiterhin die Frage, ob und inwieweit eine H_2O_2 -Bildung auch Einfluss auf die DNA-Methylierung hat. Durch einen Zusatz von Katalase ist es möglich, die Bildung im Medium effizient zu unterdrücken, da H_2O_2 zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) disproportioniert wird [Veeriah et al., 2006; Nakagawa et al., 2004; Kanner et al., 1987]. Infolgedessen wurden die Untersuchungen mit und ohne Zusatz von Katalase (100 U/ml Katalase) durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einfluss des Apfeltresterextraktes AE03B auf die Promotormethylierung des Tumorsuppressorgens $p16^{INK4a}$ und auf die entsprechende RNA-Transkripte wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 für 24 h substanzinkubiert.

Der Apfeltresterextrakt AE03B bewirkte unabhängig von einem Katalasezusatz in Konzentrationen $\leq 150 \mu\text{g/ml}$ keine Erhöhung der unmethylierten DNA-Fragmente in der Promotorregion des tumorspezifischen $p16^{INK4a}$ -Gens in HT29-Zellen (Abb. 66A+B). Ohne einen Zusatz von Katalase war über den getesteten Konzentrationsbereich keine Zunahme der unmethylierten DNA-Banden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu detektieren (Abb. 66A). Eine Abnahme der unmethylierten Bande durch 50 $\mu\text{g/ml}$ und 150 $\mu\text{g/ml}$ AE03B (Abb. 66A; Gel 2) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ist möglicherweise auf intrazelluläre Schwankungen des Methylierungsstatus zurückzuführen. Die Positivkontrolle 5-Aza-CdR erhöhte im Vergleich zu ihrer Lösungsmittelkontrolle (PBS) deutlich die Intensität der unmethylierten DNA-Bande (Abb. 66A). Der Methylierungsstatus der methylierten Banden wird weder durch 5-Aza-CdR noch durch AE03B moduliert.

In Gegenwart von Katalase wurde hingegen durch AE03B eine Abnahme der unmethylierten DNA-Banden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet. Die Abnahme ist besonders deutlich in Gel 2 in den Konzentrationen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ AE03B zu erkennen (Abb. 66B). Möglicherweise ist dies auch durch intrazelluläre Schwankungen bedingt, da die DNA-Methylierung im zellulären System einen dynamischen Prozess darstellt.

A) ohne Katalase



B) mit Katalase

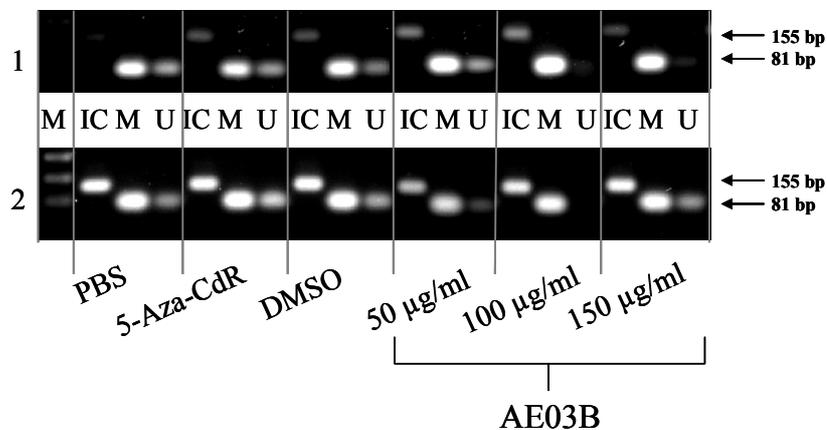


Abb. 66 Modulation des Methylierungsstatus von p16^{INK4a} in HT29-Zellen durch AE03B nach 24 h Inkubation A) ohne Katalase und B) mit Katalase (100 U/ml); methylierungsspezifische PCR; 5-Aza-CdR (15 µM), Inhibitor der DNA-Methyltransferase; 3 unabhängige Experimente (abgebildet sind 2 repräsentative Gele); IC, interne Kontrolle; M, methyliert; U, unmethyliert [Volker Blust, Diplomarbeit 2008]

Die Positivkontrolle 5-Aza-CdR zeigte in einer Konzentration von 15 µM nur eine marginale Zunahme der unmethylierten Bande im Vergleich zu ihrer PBS-Kontrolle (Abb. 66B). Der Methylierungsstatus der methylierten Banden erfährt weder durch 5-Aza-CdR noch durch AE03B eine Veränderung. Auffällig ist, dass eine Erhöhung der unmethylierten Bande in den PBS behandelten Zellen ohne Katalasezusatz intensiver ausfiel, als in Gegenwart von Katalase. Das interne Kontrollfragment sollte in den Proben der einzelnen Experimente stets gleich stark exprimiert werden. In Abb. 66B (Gel 1) ist dies nicht der Fall, so dass das Gel nur begrenzt auswertbar ist. Da kein Einfluss auf die nichtmethylierten DNA-Fragmente im p16^{INK4a}-Genpromotor zu beobachten war, ist auch kein Anstieg von p16^{INK4a}-Transkripten zu erwarten, die im Folgenden mittels quantitativer PCR aus parallel isolierter RNA überprüft werden.

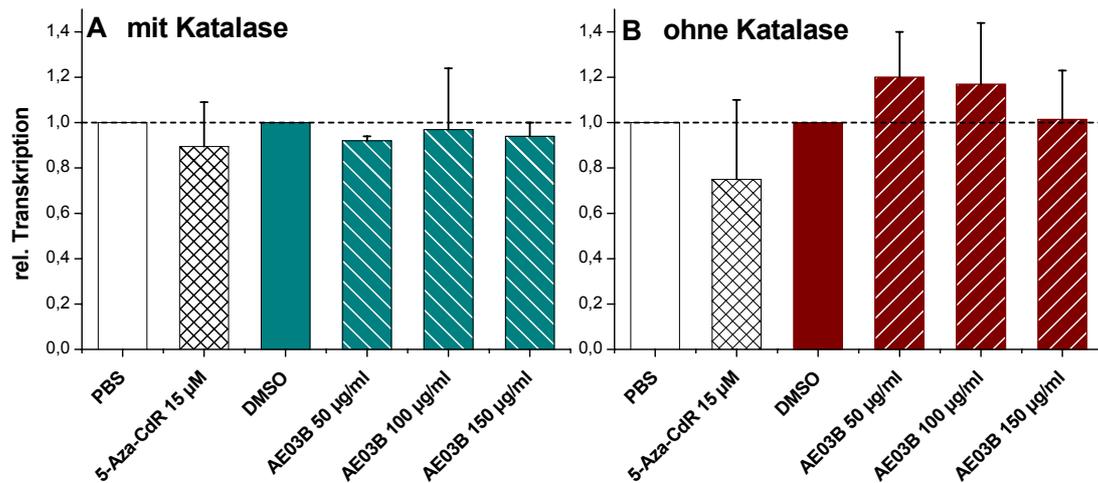


Abb. 67 Modulation der Transkription von p16^{INK4a} in HT29-Zellen durch AE03B nach 24 h Inkubation A) mit Katalase (100 U/ml) und B) ohne Katalase; quantitative PCR; 5-Aza-CdR (15 μM), Inhibitor der DNA-Methyltransferase; MW ± SD von 2 unabhängigen Experimenten; IC, interne Kontrolle; M, methyliert; U, unmethyliert

Analog zur MSP-PCR wurde auch in der quantitativen PCR über den getesteten Konzentrationsbereich kein Einfluss auf die Transkription von p16^{INK4a} nachgewiesen (Abb. 67). Sowohl mit als auch ohne Katalasezusatz manifestierte sich diese Beobachtung in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Abb. 67A+B). Auch die Positivkontrolle 5-Aza-CdR zeigte keine Veränderung der p16^{INK4a}-Transkripte im Vergleich zur PBS-Kontrolle.

4.5.2 Diskussion p16^{INK4a}-Gen

Das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} zählt zu den proliferationsassoziierten Genen, die mit Hypermethylierungen und dem Verlust ihrer Genexpression in humanen Neoplasien assoziiert werden [Herman et al., 2004; Baylin et al., 1998; Gonzalez-Zulutea et al., 1995]. In der methylierungsspezifischen PCR (MSP-PCR) wurde der Einfluss des Apfeltresterextraktes AE03B auf den Methylierungsstatus der Promotorregion des p16^{INK4a}-Gens in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Da für den AE03B bereits H₂O₂-generierende Eigenschaften im Zellkulturmedium von HT29-Zellen beschrieben sind, wurden die nachfolgenden Untersuchungen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um experimentelle Artefakte infolge einer H₂O₂-Bildung auszuschließen.

Nach einer Substanzinkubation von 24 h zeigte der AE03B keinen Einfluss auf die DNA-Methylierung in der Promotorregion des p16^{INK4a}-Gens. Sowohl mit als auch ohne Zusatz von Katalase blieben demethylierende Effekte aus (Abb. 66A+B). Erwartungsgemäß wurde auch in der quantitativen PCR keine Modulation von Gentranskripten der parallel isolierten RNA durch AE03B be-

stimmt (Abb. 67A+B). Da die genomische DNA und die Gesamt-RNA aus einem Inkubationsansatz aufgereinigt wurden, ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Widererwartend wurde aber auch für die Positivkontrolle 5-Aza-CdR kein Anstieg der Gentranskripte nachgewiesen (Abb. 67A+B). Das Ergebnis ist auffallend, da 5-Aza-CdR in der MSP-PCR deutlich demethylierende Effekte zeigte, die sich auch auf Ebene der Gentranskription hätten widerspiegeln müssen (Abb. 66A+B). In der Literatur beschriebene Studien zur Modulation des DNA-Methylierungsstatus tumorassoziierter Gene führten durch Inkubation mit 5-Aza-CdR auch auf RNA-Ebene zu veränderten Gentranskripten [Fini et al., 2007; Goffin und Eisenhauer, 2002; Zhu et al., 2001].

Im Rahmen weiterer Untersuchungen zeigte u. a. der charakteristische Apfelinhaltsstoff Chlorogensäure in Gegenwart von Katalase eine deutliche Zunahme an unmethylierten DNA-Fragmenten im Bezug auf die Kontrolle [Diplomarbeit Volker Blust, 2008]. Als Inhaltsstoff des AE03B ist die Chlorogensäure jedoch im Vergleich zu sonstigen Apfelextrakten nur in geringen Konzentrationen vertreten (Abb. 17, Tab. 9). Möglicherweise ist der Gehalt an Chlorogensäure im AE03B zu gering, um demethylierende Effekte auszulösen oder die demethylierende Wirkung der Chlorogensäure wird innerhalb des Extraktes kompensiert. Mit der Zunahme von nichtmethylierten DNA-Fragmenten in der Promoterregion des p16^{INK4a}-Gens ist ein Anstieg von p16^{INK4a}-Transkripten in der parallel isolierten RNA zu erwarten. Widererwartend blieb jedoch hier ein Anstieg von Gentranskripten aus [Diplomarbeit Volker Blust, 2008].

Fini et al. (2007) zeigten bereits, dass durch einen Apfelextrakt (APE) aus Annurca Äpfeln die Hypermethylierung in der Promotorregion der Gene p16^{INK4a}, p14^{ARF} und hMLH1 aufgehoben wurde und es zur Reaktivierung der Genexpression kam. Vergleichbare Effekte wurden für 5-Aza-CdR in einer Konzentration von 5 µM nachgewiesen (96 h, tägliche Nachinkubation). Im Unterschied zu unseren Untersuchungen verwendeten Fini et al. (2007) die humanen Kolonkarzinomzelllinien RKO, SW48 und SW480 und inkubierten diese mit 2 µM APE für 96 h (4 Tage, Nachinkubation jeden 2. Tag). Dabei setzten sich 2 µM APE aus 0,43 µM Chlorogensäure, 0,1 µM Kaffeesäure, 0,7 µM Catechin, 0,63 µM Epicatechin und 0,07 µM Phloridzin zusammen.

Generell fallen die langen Inkubationszeiten von 96 h und die relativ niedrigen Konzentrationen an APE auf. Im Vergleich zu unseren Untersuchungen handelte es sich um eine um den Faktor 10³ niedrigere Substanzkonzentration und um eine 3x so lange Inkubationszeit. Auch Lee und Zhu (2006) detektierten erst nach einer Inkubation von 8 Tagen (inwieweit eine Nachinkubation erfolgte, bleibt unklar) eine Reaktivierung des p16^{INK4a}-Gens in der humanen Brustkarzinomzelllinie MCF7 durch Chlorogensäure (1, 5, 20 und 50 µM).

Aufgrund der Studien von Fini et al. (2007) und Lee und Zhu (2006) lässt sich vermuten, dass die von uns gewählte Inkubationsdauer von 24 h nicht ausreichte, um demethylierende Effekte detektieren zu können. Prinzipiell kann es nur dann zu einer demethylierenden Wirkung kommen, wenn sich die Zelle hinreichend oft teilt, was durch eine längere Inkubationszeit positiv beeinflusst wird. Grundsätzlich besitzt der parentale DNA-Strang nach der Zellteilung noch das ursprüngliche Methylierungsmuster, während der neu-synthetisierte Strang noch frei von DNA-Methylierungen ist. Sofern nach der DNA-Replikation der Gehalt an DNA-Methyltransferasen (DNMT) sehr gering oder die Enzymaktivität herunterreguliert ist, wird das Methylierungsmuster nicht oder nur unvollständig ergänzt. D. h. je mehr Zellteilungen erfolgen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Methylierungsmuster stillgelegter Gene infolge demethylierender Agenzien aufgehoben werden kann und es zur Reaktivierung der Genexpression kommt.

Möglicherweise spielen aber auch die eingesetzten Extraktkonzentrationen eine entscheidende Rolle, da Fini et al. (2007) bereits in sehr geringen Konzentrationen (2 μM APE) demethylierende Effekte zeigen konnten, während in unseren Untersuchungen die um Faktor 10^3 erhöhten Konzentrationen keine bzw. nur marginale Effekte in der Promotorregion des p16^{INK4a}-Gens auslösten. Unter Umständen überlagern sich in einer komplexen Polyphenolmischung auch die Effekte in hohen Konzentrationen und heben sich gegenseitig auf.

Die demethylierende Eigenschaft der Polyphenole wird grundsätzlich auf den negativen Rückkopplungsmechanismus der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zurückgeführt [Fini et al., 2007; Lee und Zhu, 2006]. Dabei setzt die COMT spezifisch Verbindungen mit Catecholstruktur um, indem sie eine der benachbarten Hydroxygruppen methyliert. Als Methyl donor dient S-Adenosylmethionin (SAM), das nach Abgabe der Methylgruppe in S-Adenosylhomocystein (SAH) übergeht. SAM wird jedoch auch von den DNMT als Methylquelle genutzt. Im Gegensatz zur COMT wirkt SAH aber bei den DNMT als spezifischer Inhibitor. Lee und Zhu (2006) zeigten bereits, dass SAH in der Lage ist, die DNMT mit einem IC_{50} -Wert von $< 0,1 \mu\text{M}$ zu inhibieren.

Obleich durch die demethylierende Wirkung der Positivkontrolle 5-Aza-CdR auch ein Anstieg der RNA-Transkripte des p16^{INK4a}-Gens zu erwarten gewesen wäre, blieb die Gentranskription unbeeinflusst. Vermutlich ist die Ursache hierfür auch in der Inkubationszeit von 24 h zu suchen, die nicht ausreichte, um einen demethylierenden Effekt auch auf Ebene der Gentranskription infolge einer Genreaktivierung detektieren zu können. In der Literatur wurden vergleichbare Studien mit Inkubationszeiten von bis zu 9 Tagen mit Polyphenolen durchgeführt, die zur Abnahme der Hypermethylierung und zur Zunahme von RNA-Transkripten führten [Fini et al., 2007; Chuang et al., 2005; Bender et al., 1998].

Generell stehen weitere Untersuchungen aus, in denen die Ergebnisse abgesichert und reproduziert werden müssen. Ein möglicher Ansatz zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wäre eine Synchronisation der Zellen oder wesentlich längere Inkubationszeiten. Da die DNA-Methylierung durch DNMT nach Replikation der DNA erfolgt, die Zellen sich jedoch in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden können, werden vermutlich abhängig von der Anzahl der Zellteilungen Unterschiede an demethylierenden Effekten innerhalb einer Substanzkonzentration beobachtet. Durch eine Synchronisation der Zellen würde die Substanzinkubation unter annähernd gleichen Bedingungen erfolgen. Alternativ würde eine verlängerte Inkubationszeit von 8 bis 10 Tagen die Unterschiede in der Anzahl von Zellteilungen minimieren, so dass eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wäre, im Gegensatz zu kürzeren Inkubationszeiten (24 h), bei denen die Zahl der Zellteilungen wesentlich stärker ins Gewicht fällt. Da p16^{INK4a} eine entscheidende Rolle für den Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase spielt, bietet sich ergänzend zu den vorliegenden Ergebnissen eine Untersuchung des Zellzyklus an, um zu detektieren, ob im Falle eines demethylierenden Effektes eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase erfolgt.

4.6 Flavonoidabbauprodukte durch die mikrobielle Darmflora

4.6.1 Hemmung des Zellwachstums (SRB-Test)

Die zellulären Effekte von Flavonoiden stehen im Fokus zahlreicher Studien, während die biologische Relevanz gebildeter Abbauprodukte und deren Beitrag zu bereits beobachteten zellulären Effekten wenig berücksichtigt wird. Flavonoide unterschiedlicher Substanzklassen sind bereits als potente Inhibitoren des Wachstums humaner Tumorkarzinomzelllinien *in vitro* beschrieben. Allerdings finden sich kaum Studien zur chemischen Stabilität der Flavonoiden unter Zellkulturbedingungen und zur Bildung entsprechender Abbauprodukte, obwohl die begrenzte Stabilität von Anthocyanidinen bereits postuliert wird [Kern et al., 2007b; Fleschhut et al., 2006; Keppler et al., 2005; Seeram et al., 2001]. Unter Zellkulturbedingungen detektierten Kern et al. (2007b) bereits nach einer 30 minütigen Substanzinkubation einen Abbau von Anthocyanidinen zu korrespondierenden Phenolsäuren. Jedoch kommt es nicht nur *in vitro* zu einem Abbau der Verbindungen, sondern auch unter *in vivo* Bedingungen stellen Anthocyanidine Substrate für den mikrobiellen Abbau durch die humane intestinale Mikroflora dar. Infolgedessen kommt es zur Bildung einer korrespondierenden Benzoesäure (B-Ring) und eines Phloroglucinolaldehyds (A-Ring) [Fleschhut et al., 2006; Keppler et al., 2005; Seeram et al., 2001]. Für das Anthocyanidin Delphinidin wird ein mikrobieller Abbau zu Gallussäure und Phloroglucinolaldehyd beschrieben (Abb. 68) [Fleschhut et al., 2006; Keppler et al., 2005].

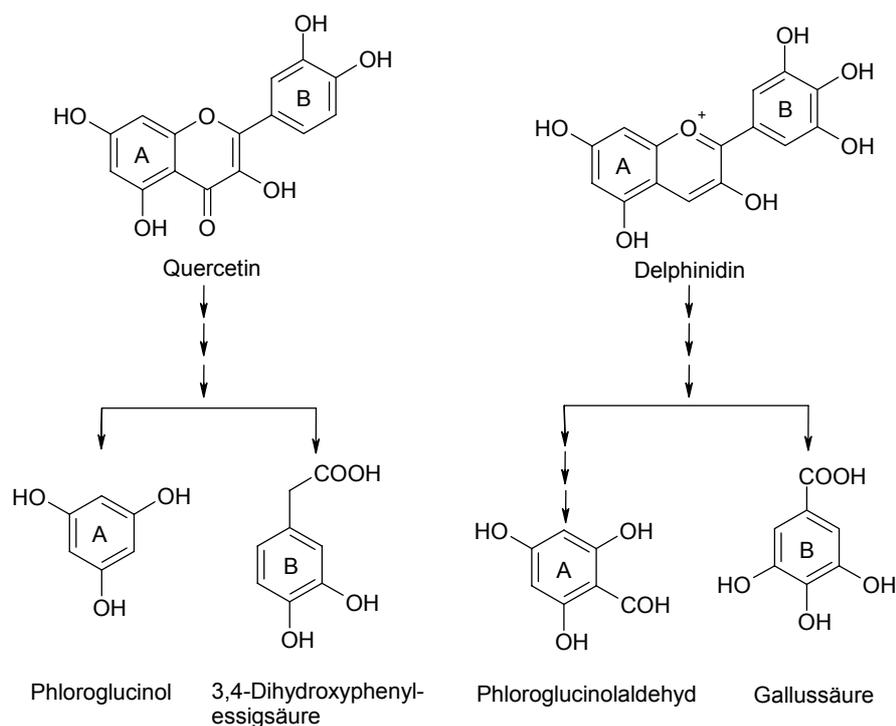


Abb. 68 Schematische Darstellung der Abbauewege von Quercetin [Braune et al., 2001] und Delphinidin [Fleschhut et al., 2005]

Ebenso sind intestinale Mikroorganismen in der Lage, Flavonole abzubauen. Durch Inkubation von Quercetin mit humanen Mikroorganismen z. B. *Eubacterium ramulus* entsteht aus dem B-Ring 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure und aus dem A-Ring Phloroglucinol (Abb. 68) [Hein et al., 2008; Blaut et al., 2003; Aura et al., 2002].

Die wachstumshemmenden Eigenschaften des Anthocyanidins Delphinidin und das Flavonols Quercetin auf die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 sind bereits von Marko et al. (2004) bzw. Kern et al. (2005) beschrieben worden. Auch die Abbauprodukte Gallussäure und 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure wurden als Inhibitoren des Wachstums von HT29-Zellen identifiziert [Dissertation Melanie Kern, 2006]. Weiterhin ist bereits bekannt, dass Delphinidin und Quercetin sowie ihre Abbauprodukte substantielle Mengen an H_2O_2 unter Zellkulturbedingungen generieren [Kern et al., 2007b; Esselen et al., MNF eingereicht]. Somit stellte sich die Frage, inwiefern die Bildung von H_2O_2 Einfluss auf die wachstumshemmenden Eigenschaften der Ausgangsverbindungen und deren Abbauprodukte nimmt. Zur Unterdrückung der H_2O_2 -Bildung im Zellkulturmedium wurde Katalase (100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (250 μ M) zugesetzt. Mittels des Sulforhodamin B (SRB)-Tests wurde der Einfluss der Verbindungen auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 72 h Substanzinkubation bestimmt.

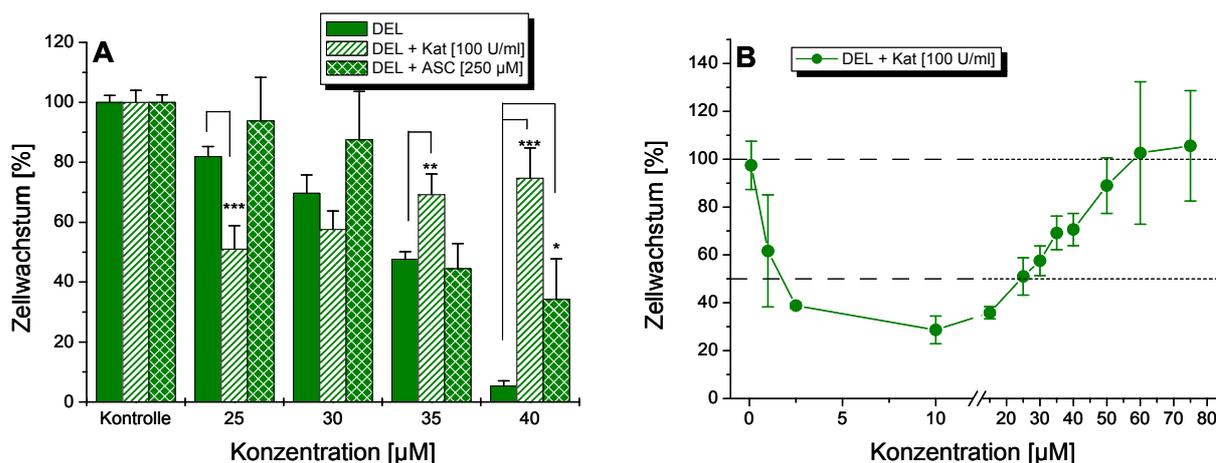


Abb. 69 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch (A) Delphinidin (DEL) mit oder ohne Katalase (KAT, 100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (ASC, 250 μM) und (B) DEL in Gegenwart von Katalase in einer detaillierten Untersuchung; 72 h, serumhaltige Inkubation; Sulforhodamin B (SRB)-Test; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

Marko et al. (2004) zeigten bereits, dass das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit einem IC_{50} -Wert von $35 \pm 15 \mu\text{M}$ Delphinidin gehemmt wird (Tab. 6). In Gegenwart von Ascorbinsäure (250 μM) wurde bis zu einer Konzentration von 35 μM Delphinidin kein signifikanter Einfluss auf die Hemmung des Zellwachstums – im Vergleich zur Delphinidinprobe ohne Zusatz – detektiert (Abb. 69A). Allerdings zeigte sich in höheren Delphinidinkonzentrationen (40 μM) durch Zugabe von Ascorbinsäure eine signifikante Verringerung der wachstumshemmenden Eigenschaften um 15 % (Abb. 69A; Tab. 6). Im Gegensatz dazu verbessert sich in Gegenwart von Katalase die Wachstumshemmung von 25 μM Delphinidin signifikant (Abb. 69A). Unerwarteterweise kam es aber in höheren Delphinidinkonzentrationen zu einem Wiederanstieg der Zellproliferation (Abb. 69). Als Konsequenz der wachstumsmodulierenden Effekte von Delphinidin in Gegenwart von Katalase wurde der Konzentrationsbereich erweitert. Durch einen Zusatz von Katalase wurde eine substantielle Wachstumshemmung von 40 % bereits in Konzentrationen von 1 μM Delphinidin beobachtet (Abb. 69). Diese Hemmwirkung besitzt jedoch ein Optimum bei 10 μM Delphinidin. Inkubationen in Delphinidinkonzentrationen $\geq 20 \mu\text{M}$ führten zu einem Wiederanstieg des Lebendproteins im SRB-Test (Abb. 69B). Durch eine Delphinidinkonzentration von 60 μM wurden die wachstumshemmenden Effekte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vollständig aufgehoben wurden (Vergleich Abb. 69A+B).

Tab. 6 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Delphinidin oder Gallussäure mit und ohne Katalase (100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (250 µM); 72 h, serumhaltige Inkubation; Sulforhodamin B (SRB)-Test; §Marko et al., 2004; #Kern et al., 2007b; ^anicht kalkulierter U-Kurvenverlauf

Substanz	Wachstumshemmung: IC ₅₀ -Werte [µM]		
	ohne Zusatz	mit Katalase (100 U/ml)	mit Ascorbinsäure (250 µM)
Delphinidin	35 ± 5 §	- ^a	36 ± 11
Gallussäure	42 ± 8 #	49 ± 1	48 ± 7

Im Hinblick auf die substantiellen Effekte von Katalase oder Ascorbinsäure auf die wachstumshemmenden Eigenschaften von Delphinidin, wurde auch der Einfluss des Abbauproduktes Gallussäure auf das Zellwachstum in Gegenwart der beiden Verbindungen untersucht.

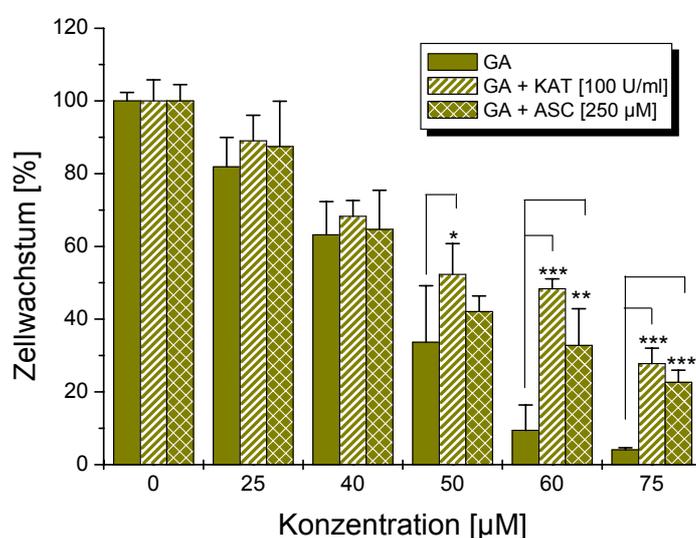


Abb. 70 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Gallussäure (GA) mit und ohne Katalase (KAT, 100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (ASC, 250 µM); 72 h serumhaltige Inkubation; Sulforhodamin B Test; MW ± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung; *: p<0,05; **: p<0,01;***:p<0,001

Als Abbauprodukt des Delphinidins vermittelte Gallussäure substantielle wachstumshemmende Effekte (Kern et al., 2007b; Tab. 6). Bis zu einer Konzentration von 40 µM hatte weder ein Zusatz von Katalase noch von Ascorbinsäure Einfluss auf die wachstumshemmenden Eigenschaften von Gallussäure (Abb. 70). Erst ab einer Konzentration von 50 µM Gallussäure kam es in Gegenwart von Katalase zu einer leichten aber signifikanten Abnahme der Wachstumshemmung, während sich die IC₅₀-Werte jedoch im vergleichbaren Konzentrationsbereich bewegten (Tab. 6). Erst ein Zusatz von Katalase oder Ascorbinsäure zu ≥ 60 µM Gallussäure führte zu einem signifikanten Verlust der Hemmwirkung auf das Zellwachstum (Abb. 70).

Auch für das Flavonol Quercetin und sein mikrobiell beschriebenes Abbauprodukt 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure wurde in den folgenden Untersuchungen die wachstumshemmenden Effekte in Gegenwart von Katalase und Ascorbinsäure bestimmt.

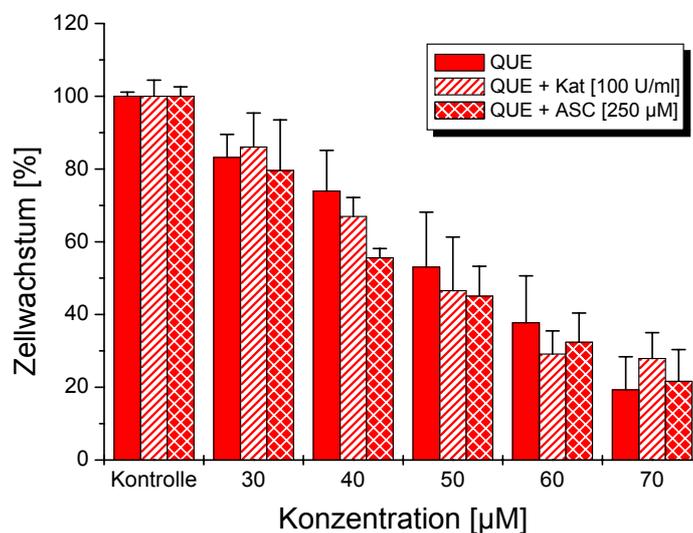


Abb. 71 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Quercetin (QUE) mit und ohne Katalase (KAT, 100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (ASC, 250 µM); 72 h serumhaltige Inkubation; Sulforhodamin B (SRB)-Test; MW ± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung

Das Flavonol Quercetin zeigte potente inhibierende Effekte auf das Wachstum von HT29-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 52 ± 11 µM [Kern et al., 2005]. Durch Zusatz von Katalase (100 U/ml) wurden keine signifikanten Veränderungen der wachstumshemmenden Eigenschaften von Quercetin beobachtet (Abb. 71; Tab. 7). Auch in Gegenwart von Ascorbinsäure (250 µM) blieb die durch Quercetin vermittelte Wachstumshemmung (Abb. 71; Tab. 7) unverändert. Die Hemmung des Zellwachstums durch Zusatz von Ascorbinsäure zu 40 µM Quercetin führte jedoch zu keiner substantiellen Verbesserung der wachstumshemmenden Eigenschaften.

Tab. 7 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Quercetin oder HPA (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure) mit und ohne Katalase (100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (250 µM); 72 h, serumhaltige Inkubation; Sulforhodamin B Test; §Dissertation Melanie Kern, 2006; #Kern et al., 2005

Substanz	Wachstumshemmung: IC ₅₀ -Werte [µM]		
	ohne Zusatz	mit Katalase (100 U/ml)	mit Ascorbinsäure (250 µM)
Quercetin	52 ± 11 #	49 ± 1	48 ± 7
HPA	58 ± 8 §	68 ± 27	81 ± 10

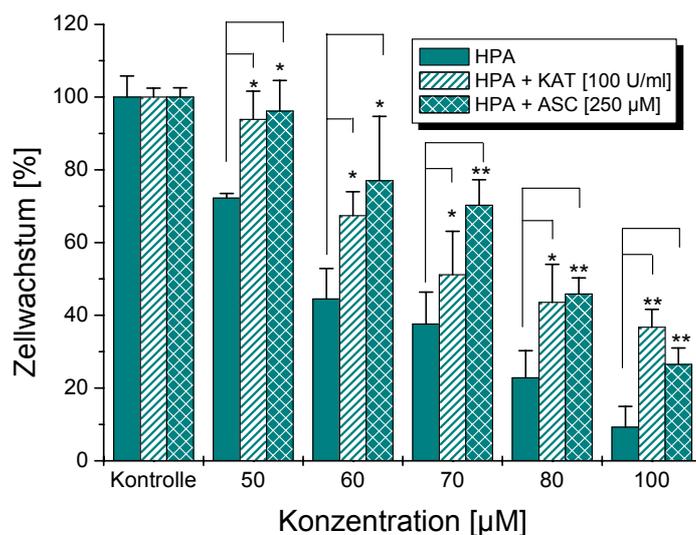


Abb. 72 Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (HPA) mit oder ohne Katalase (KAT, 100 U/ml) bzw. Ascorbinsäure (ASC, 250 µM); 72 h, serumhaltige Inkubation; Sulforhodamin B (SRB)-Test; MW ± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung; *: p<0,05; **: p<0,01

Die aus dem B-Ring von Quercetin resultierende 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid wurde ebenfalls als potenter Inhibitor des Wachstums von HT29-Zellen identifiziert (Dissertation Melanie Kern, 2006; Abb. 72). In Gegenwart von Katalase (100 U/ml) oder Ascorbinsäure (250 µM) wurden die wachstumshemmenden Effekte von 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid bereits ab einer Konzentration von 50 µM signifikant verringert (Abb. 72). Mit steigender Konzentration an Quercetin nahm auch der Einfluss von Katalase bzw. Ascorbinsäure auf die Wachstumshemmung zu und führte zu einer signifikanten Verminderung (Tab. 7).

4.6.2 Diskussion

Delphinidin und Quercetin sowie deren Abbauprodukte Gallussäure und 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid wurden bereits *in vitro* als potente Inhibitoren des Wachstums der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 identifiziert [Kern et al., 2007b; Marko et al., 2004; Dissertation Melanie Kern, 2006]. Dabei erwiesen sich die wachstumshemmenden Effekte der postulierten Abbauprodukte als vergleichbar mit denen der Ausgangssubstanzen (Tab. 6, Tab. 7). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Abbauprodukte zu den wachstumshemmenden Eigenschaften der Ausgangssubstanzen beitragen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Polyphenole unter Zellkulturbedingungen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) im Medium generieren und zu experimentellen Artefakten führen können [Wee et al., 2003; Hou et al., 2005; Dashwood et al., 2002; Roques et al., 2002; Lona et al., 2000, Halliwell et al., 2000]. Kern et al. (2007b) wiesen nach Kurzzeitinkubation von HT29-Zellen mit Delphinidin

bzw. Gallussäure die Bildung substantieller Mengen an H_2O_2 im Zellkulturmedium nach. Auch für das Flavonol Quercetin wurde bereits die Bildung von H_2O_2 im Zellkulturmedium nachgewiesen [Esselen et al., MNF eingereicht]. Nach 72 h Zellinkubation akkumulierte kein H_2O_2 mehr im Zellkulturmedium, unabhängig von der eingesetzten Verbindung oder der Gegenwart von Katalase bzw. Ascorbinsäure [Kern et al., 2007b; Dr. Melanie Esselen, unveröffentlichte Daten]. Somit stellte sich die Frage, inwieweit eine Modulation der zellulären Effekte in Gegenwart von Katalase oder Ascorbinsäure zu erwarten ist [Verriah et al., 2006; Wee et al., 2003; Roques et al., 2002]. Durch einen Zusatz von Katalase (100 U/ml) oder Ascorbinsäure (250 μM) ist es möglich, die Bildung von H_2O_2 im Zellkulturmedium bis auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle zu unterdrücken [Kern et al., 2007b; Verriah et al., 2006].

Im Sulforhodamin B (SRB)-Test führte die Gegenwart von Katalase oder Ascorbinsäure zu einer Modulationen der wachstumshemmenden Eigenschaften von Delphinidin und Gallussäure (Abb. 69, Abb. 70). Für das Abbauprodukt Gallussäure verringerte ein Zusatz an Katalase oder Ascorbinsäure die wachstumshemmenden Effekte der Verbindung in Konzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ (Abb. 70). Allerdings lagen die IC_{50} -Werte im vergleichbaren Konzentrationsbereich (Tab. 6). In Gegenwart von 40 μM Delphinidin führte ein Zusatz von Ascorbinsäure zu einer signifikanten Veränderung der Hemmung des Delphinidins auf das Wachstum von HT29-Zellen (Abb. 69, Tab. 6). Unerwarteterweise zeigte die Inkubation von HT29-Zellen mit Delphinidin in Gegenwart von Katalase einen U-förmigen Kurvenverlauf hinsichtlich der wachstumshemmenden Eigenschaften (Abb. 69). Während in Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ Delphinidin eine potente Wachstumshemmung vermittelt wurde, kam es in Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{M}$ Delphinidin zu einem Wiederanstieg der Zellproliferation. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Überlagerung des anfänglich wachstumshemmenden Effektes durch einen weiteren bisher noch unbekanntem wachstumstimulierenden Mechanismus.

Obwohl H_2O_2 einen Beitrag zur Wachstumshemmung leistet, vermittelten Delphinidin und Gallussäure auch in Gegenwart von Katalase oder Ascorbinsäure substantielle Hemmeffekte, so dass die Wirkung auf das Zellwachstum infolge einer H_2O_2 -Bildung kein experimentelles Artefakt darstellt. Die Hemmung des Zellwachstums von humanen Tumorzellen durch Delphinidin und Gallussäure ist in der Literatur bereits beschrieben [Hsu et al., 2007; Agarwal et al., 2006; Marko et al., 2004; Meiers et al., 2001].

Da postuliert wird, dass der Abbau der Anthocyanidine stets zu einer korrespondierenden Benzoesäure und einem Phloroglucinolaldehyd führt (Abb. 68) [Keppler und Humpf, 2005; Seeram et al., 2001], kann auch ein Beitrag des Aldehyds zu den wachstumshemmenden Eigenschaften der Ausgangsverbindung nicht ausgeschlossen werden. Sollte der Phloroglucinolaldehyd für die

Hemmung des Zellwachstums mitverantwortlich sein, müssten die wachstumshemmenden Effekte des Delphinidins die des Abbauproduktes Gallussäure übersteigen. Da jedoch Delphinidin und Gallussäure eine Hemmwirkung im vergleichbaren Konzentrationsbereich zeigten, scheint dies nicht zu zutreffen. Nach Fleschhut et al. (2006) wird unabhängig vom Substitutionsmuster des B-Rings der Anthocyanidine immer derselbe Aldehyd gebildet. Sofern von einem Effekt des Aldehyds ausgegangen wird, müsste eine vergleichbare Hemmwirkung der Ausgangsverbindungen vorliegen, was zwar nicht der Fall ist, aber aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen und Zeiten der gebildeten Abbauprodukte nur unzureichend beurteilt werden kann [Kern et al., 2007b].

Da über einen Beitrag des Phloroglucinolaldehyds zu den wachstumshemmenden Eigenschaften des Delphinidins nur spekuliert werden kann, sollte in weiterführenden Untersuchungen die biologische Wirkung des Aldehyds bestimmt werden.

Im Hinblick auf die Abbaugeschwindigkeit des Delphinidins im DMEM-Zellkulturmedium zeigten Kern et al. (2007b), dass bereits 30 min nach Inkubation kein Delphinidin mehr zu detektieren war. Das Abbauprodukt Gallussäure erreichte nach 1 h sein Maximum, wobei jedoch nur 20 % der eingesetzten Delphinidinkonzentration zu Gallussäure abgebaut wurden und auch Gallussäure nach 24 h nicht mehr im Zellkulturmedium bestimmbar war [Kern et al., 2007b]. Aufgrund der begrenzten Stabilität und der geringen Konzentration des gebildeten Abbauproduktes scheint ein additiver Beitrag zu den wachstumshemmenden Effekten des Delphinidins marginal zu sein, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Wirkmechanismen von Delphinidin und Gallussäure zur Hemmung des Zellwachstums scheinen jedoch unterschiedlich zu sein, da es sich im Falle von Delphinidin vermutlich um eine EGFR-vermittelte Hemmung des Zellwachstums handelt [Meiers et al., 2001; Fridrich et al., 2008b], während Gallussäure die Aktivität des isolierten Rezeptors nur marginal beeinflusste [Kern et al., 2007b]. Agarwal et al. (2006) vermuten, dass es durch Gallussäure zu einer inaktivierenden Phosphorylierung von cdc25A/cdc25C-cdc2 über die Aktivierung von ATM-Chk2 (ataxia telangiectasia mutated - checkpoint kinase 2) kommt, was zum Zellzyklusarrest und zur Induktion von Apoptose führt. Hsu et al. (2007) postulieren hingegen, dass Gallussäure Apoptose über einen Fas- und mitochondrialvermittelten Signalweg induziert.

Die wachstumshemmenden Eigenschaften des Flavonols Quercetin blieben in Gegenwart von Katalase oder Ascorbinsäure weitestgehend unverändert (Abb. 71, Tab. 7). Die durch das Abbauprodukt 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure vermittelte Wachstumshemmung wurde hingegen durch einen Zusatz von Katalase oder Ascorbinsäure in Konzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ signifikant verringert (Abb. 72) und führte zu höheren IC_{50} -Werten im Vergleich zum Quercetin ohne Zusatz (Tab. 7).

Die Bildung von H_2O_2 scheint einen Beitrag zur Wachstumshemmung der 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure zu leisten, dennoch vermittelt diese auch in Gegenwart von Katalase oder Ascorbinsäure substantielle Hemmeffekte, so dass die Hemmung des Zellwachstums kein experimentelles Artefakt darstellt. Auch die durch Quercetin bzw. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure vermittelte Wachstumshemmung von humanen Tumorzellen ist bereits beschrieben [Gao et al., 2006; Kern et al., 2005; Raspaglio et al., 2003; Nagao et al., 2001]. Das aus dem A-Ring des Quercetins resultierende Phloroglucinol (Abb. 68) wurde nur als marginaler Inhibitor des Wachstums von HT29-Zellen identifiziert [Dissertation Melanie Kern, 2007] und ist in Gegenwart von Katalase oder Ascorbinsäure aufgrund des geringfügigen Hemmeffektes nicht weiter untersucht worden. Während der Wirkmechanismus von Quercetin u. a. EGFR-vermittelt zu sein scheint [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2008b], ist die Hemmwirkung auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation durch 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure nur marginal [Dissertation Melanie Kern, 2006].

Allerdings beobachteten Esselen et al. (MNF eingereicht), dass die unter mikrobiellen Bedingungen postulierten Quercetinabbauprodukte unter Zellkulturbedingungen nicht gebildet werden und somit nur *in vivo* eine Rolle zu spielen scheinen. Ferner wurde festgestellt, dass Quercetin in Gegenwart von Katalase im Zellkulturmedium stabilisiert wird (nach 3 h noch 70 % Quercetin), während Quercetin ohne einen Zusatz bereits nach 24 h nicht mehr nachweisbar war. Als Metabolit des Quercetins wurde unter Zellkulturbestimmungen ein Quercetinglukuronid identifiziert, dessen Beitrag zu den wachstumshemmenden Eigenschaften des Quercetins *in vitro* jedoch noch nicht verifiziert wurde [Esselen et al., MNF eingereicht].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es unwahrscheinlich ist, dass ausschließlich die Abbauprodukte Gallussäure und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure für die wachstumshemmenden Eigenschaften der Ausgangsverbindungen Delphinidin und Quercetin unter Zellkulturbedingungen verantwortlich sind. Im Besonderen da für Gallussäure bereits eine geringe chemische Stabilität im Zellkulturmedium nachgewiesen wurde. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Abbauprodukte einen Beitrag zur Wachstumshemmung der Ausgangsverbindungen leisten.

4.7 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Nach Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 für 45 min wurden für die Apfel-extrakte AE02, AE03B und AE05 in Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ die Bildung substantieller Mengen an Wasserstoffperoxid (H_2O_2) nachgewiesen. Im Vergleich zum AE02 und AE05 erreichte der Apfeltresterextrakt AE03B signifikant höhere H_2O_2 -Konzentrationen und überstieg somit die H_2O_2 -generierenden Eigenschaften der beiden Apfelsaftextrakte. In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde die Akkumulation von H_2O_2 durch die Apfelextrakte im Zellkulturmedium bis auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle effizient unterdrückt. Auch Lapidot et al.

(2002) berichteten, dass durch Reaktion von Apfelpolyphenolen mit noch nicht identifizierten Mediumbestandteilen H₂O₂ in einem noch unbekanntem Mechanismus entsteht. Weiteren Studien ist zu entnehmen, dass Polyphenole verschiedener Substanzklassen unter Zellkulturbedingungen H₂O₂ im Medium generieren und zu experimentellen Artefakten führen [Kern et al., 2007b; Hou et al., 2005; Dashwood et al., 2002; Halliwell et al., 2000].

Weiterhin wurden die Apfelextrakte AE02 und AE03B als potente Inhibitoren des Wachstums der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 identifiziert [Fridrich et al., 2007a; Kern et al., 2005] und zeigten auch in Gegenwart von 100 U/ml Katalase wachstumshemmende Effekte. Hierbei überstieg die Hemmwirkung des AE02 deutlich die des AE03B. Obwohl H₂O₂ einen Beitrag zur Wachstumshemmung leistet, vermitteln die Apfelextrakte aber auch in Gegenwart von Katalase substantielle wachstumshemmende Effekte, so dass die Hemmung des Zellwachstums infolge einer H₂O₂-Bildung kein experimentelles Artefakt darstellt.

Tab. 8 Wachstumshemmende Eigenschaften von Apfelextrakten und einer Quercetinglykosidmischung (QG) im Sulforhodamin B (SRB)-Test (HT29-Zellen, 72 h serumhaltige Inkubation) mit und ohne Katalase (100 U/ml) und Hemmung der EGFR-Aktivität im ELISA im Vergleich zu den Effekten auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen. [§]Kern et al., 2005; [§]Fridrich et al., 2007a; [#]nicht kalkulierter U-Kurvenverlauf; ^{-a}: keine signifikante Hemmung bis zu 500 µg/ml; ^{-b}: kein Effekt bis zu eine AE03B-äquimolaren Quercetinglykosidmischung von 500 µg/ml; n.b. nicht bestimmt

	IC ₅₀ -Werte [µg/ml]				
	SRB-Test		EGFR-ELISA	EGFR-Autophosphorylierung	
	- Katalase	+ Katalase		- Katalase	+ Katalase
AE02	134 ± 18 [§]	188 ± 35	10 ± 5 [§]	#	90 ± 12 [§]
AE03B	301 ± 28 [§]	365 ± 17	1,6 ± 0,2 [§]	- ^a	48 ± 4
AE05	n. b.	≥ 500	0,9 ± 0,1	n. b.	~ 250
QG	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b

Auch in der Literatur finden sich zahlreiche Daten, die Apfelextrakten und im Besonderen den enthaltenen Flavonoiden wachstumshemmende Eigenschaften zuschreiben [Miura et al., 2008; Miura et al., 2007; Verriah et al., 2007; Kern et al., 2006; Verriah et al., 2006; Balavenkatraman et al., 2006; Kern et al., 2005; Gossé et al., 2005; Liu et al., 2003; Wolfe et al., 2003; Sun et al., 2002, Eberhardt et al., 2000].

Für den Apfelsaftextrakt AE05 und die sortenreinen Apfelextrakte wurden in Gegenwart von Katalase keine bzw. nur marginal wachstumshemmende Effekte in HT29-Zellen bestimmt. Somit lässt sich u. a. ein Beitrag des sortenreinen Apfelextraktes „Bohnapfel“ zum inhibierenden Potential des AE02 auf das Zellwachstum ausschließen. Da für den Apfelsaft AS02 ein Polyphenolgehalt von 500 mg/ml berechnet wurde, liegen die wachstumshemmenden Eigenschaften des AE02 im verbraucherrelevanten Konzentrationsbereich. Die IC₅₀-Werte von 134 µg/ml (ohne Katalase)

und 188 µg/ml (mit Katalase) befinden sich somit innerhalb des verbraucherrelevanten Konzentrationsbereichs.

Die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade stellt einen der zentralen Signalwege dar, der das Zellwachstum und/oder die Induktion von Apoptose reguliert. Am Anfang dieser Kaskade steht der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), der u. a. in vielen Kolontumoren überexprimiert wird. Die effektive Hemmung der EGFR-Aktivität ist verbunden mit der Unterdrückung der nachfolgenden MAPK-Kaskade (Abb. 73) [Lewis et al., 1998; Marais et al., 1996].

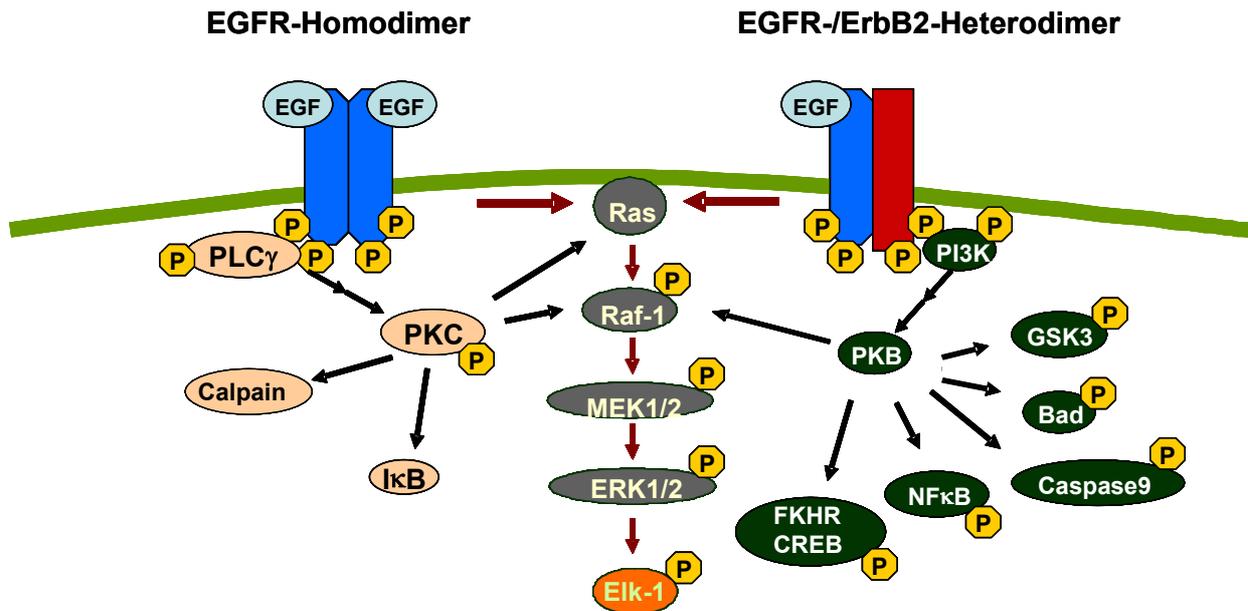


Abb. 73 „Crosstalks“ der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade: Calpain: calciumabhängige Protease; EGF, Epidermaler Wachstumsfaktor; Elk-1, Transkriptionsfaktor („Ets like“ Kinase); ERK1/2, extrazellulär regulierte Kinasen; IκB, Transkriptionsfaktorinhibitor; MEK1/2, MAPK Kinase; PI3K, Phosphoinositol-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PLCγ, Phospholipase Cγ; PTK, Proteintyrosinkinase; Raf-1, Serin-/Threoninkinase; Ras, GTP bindendes Protein

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Apfelextrakte AE02 und AE03B die Aktivität der Proteintyrosinkinase (PTK) des isolierten epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors potent unterdrücken [Fridrich et al., 2007a; Kern et al., 2005]. Im Vergleich der Apfelextrakte zeigte der AE05 das stärkste inhibierende Potential auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation (Tab. 8). Im zellulären Testsystem stellt der Phosphorylierungsstatus ein Maß für die Aktivität des EGFR dar und ist entscheidend für die Interaktion der PTK-Domäne mit nachgeschalteten Elementen der MAPK-Kaskade [Boonstra et al., 2005; Fan et al., 2005; Liang et al., 1997]. Das EGFR-inhibierende Potential des AE02 und des AE03B ist nicht nur im isolierten Testsystem von Relevanz, sondern spiegelt sich auch in der Unterdrückung der Autophosphorylierung des EGFR in HT29-Zellen wider (Tab. 8). Allerdings nur in Gegenwart von Katalase, da es ansonsten in Extraktkonzentrationen ≥ 250 µg/ml zu einem Wiederanstieg des Phosphorylierungsstatus bis zum Wert der

Lösungsmittelkontrolle kam. Dies korreliert mit den Ergebnissen der H₂O₂-generierenden Eigenschaften der Extrakte. Dabei wurde sowohl für den AE02 als auch für den AE03B gezeigt, dass H₂O₂ in Extraktkonzentrationen $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ im Zellkulturmedium entsteht, was zur Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR führt. Im Vergleich der Apfelextrakte erwies sich der AE05 in seinen EGFR-hemmenden Eigenschaften im zellulären Testsystem als deutlich geringer wirksam als der AE02 und der AE03B, was sich in der bereits gezeigten Hemmung des Zellwachstums widerspiegelte (Tab. 8).

Auch dem EGFR nachgeschaltete Signalelemente der MAPK-Kaskade werden in ihrer Aktivität durch den Apfelsaftextrakt AE02 beeinflusst. So wurde in HT29-Zellen der Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, der ein Maß für die Aktivität der EGFR-nachgeschalteten Signalkaskade darstellt (Abb. 73), nach fünfstündiger Substanzinkubation reduziert [Kern et al., 2005]. Auffällig ist hierbei, dass eine Hemmung des Phosphorylierungsstatus in viel niedrigeren AE02-Konzentrationen (Minimum bei $0,1 \mu\text{g/ml}$) erreicht wurde, als dies für eine Hemmung des Tumorzellwachstums erfolgte (Tab. 8). In Konzentrationen von $10 \mu\text{g/ml}$ wurde die Hemmwirkung auf den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 sogar aufgehoben und ab $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ kam es zu einem signifikanten Wiederanstieg an phosphoryliertem ERK1/2 über den Wert der Lösungsmittelkontrolle [Kern et al., 2005].

Auch auf Ebene des Substrates von ERK1/2, dem Transkriptionsfaktor Elk-1 (Abb. 73) führte die Inkubation (5 h) von A431-Zellen mit AE02 zu einem U-förmigen Kurvenverlauf mit einem Minimum bei $1 \mu\text{g/ml}$ AE02. Ab einer Konzentration von $> 100 \mu\text{g/ml}$ war die Hemmwirkung vollständig aufgehoben [Kern et al., 2005]. Hierbei wurde die ERK1/2-abhängige Phosphorylierung von Elk-1 über die Modulation der Luziferaseexpression im Reporterassay bestimmt. Obwohl es durch eine AE02-Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ zur Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung in HT29-Zellen kam, wurde der Gehalt an phosphoryliertem Elk-1 in A431-Zellen um ca. 50 % reduziert [Kern et al., 2005]. Die Unterschiede sind möglicherweise in den verschiedenen Zellsystemen zu suchen, obgleich die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 und die humane Vulvakarzinomzelllinie A431 dafür bekannt sind, dass sie den EGFR überexprimieren und ihr Wachstum durch EGFR-spezifische Inhibitoren, wie z. B. Tyrphostin AG1478, im selben Konzentrationsbereich gehemmt werden kann [Kern et al., 2005; Marko et al., 2004; Meiers et al., 2001; Giard et al., 1973]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Einfluss des AE02 auf die MAP-Kinasen ERK1/2 und den Transkriptionsfaktor Elk-1 nicht in Gegenwart von Katalase bestimmt worden ist und somit die zellulären Endpunkte infolge einer H₂O₂-Bildung moduliert sein könnten. Im Rahmen von Kurzzeitinkubationen ist in der Literatur bereits die Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung durch H₂O₂ beschrieben [Nguyen et al., 2004; Huang et al., 2003].

Ferner korreliert ein Anstieg des ERK1/2-Phosphorylierungsstatus nicht mit einer gesteigerten Zellproliferation [Kern et al., 2005], so dass angenommen wird, dass wahrscheinlich weitere das Zellwachstum regulierende Signalelemente durch den AE02 beeinflusst und somit mögliche proliferationsfördernde Effekte durch höhere Extraktkonzentrationen kompensiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der AE02 im zellulären Testsystem den EGFR und auch nachgeschaltete Signalelemente der MAPK-Kaskade sowie die davon abhängige Gentranskription beeinflusst.

Die Inkubation der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 mit AE02 führte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Katalase zur Unterdrückung des Zellwachstums und zur Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR sowie des ErbB2-Rezeptors (Abb. 73) [Diplomarbeit Nicole Teller, 2006]. Somit ist die Hemmwirkung des Extraktes auf ein weiteres Zellsystem übertragbar, wobei aber keine Selektivität für die Rezeptortyrosinkinasen zu beobachten war. Vermutlich kann die Unterdrückung des ErbB2-Rezeptors auf die Hemmung des EGFR im gebildeten EGFR/ErbB2-Rezeptor Heterodimer zurückgeführt werden [Diplomarbeit Nicole Teller, 2006].

Durch sogenannte „Crosstalks“ können Elemente der MAPK-Kaskade auch durch andere Signalwege moduliert werden. So kann die Serin-/Threoninkinase Raf-1 durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg oder durch die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden (Abb. 73) [Clark et al., 2004]. Kern et al. (2007a) zeigten, dass der AE02 die PKC-Aktivität im zellfreien Testsystem unterdrückt. In intakten Zellen wird die Aktivität der PKC zwar nicht primär gehemmt, scheint jedoch im Rahmen apoptotischer Prozesse beeinflusst zu werden. Caspase-3-Aktivierung, DNA-Fragmentierung und die PKC-Aktivität weisen nach Zellinkubation mit AE02 daraufhin, dass die PKC-Aktivierung einen intermediären Bestandteil apoptotischer Prozesse darstellt [Kern et al., 2007a]. Zu den Apoptose blockierenden Signalwegen zählt u. a. auch die PI3K-Signalkaskade, der sogenannte „Survival-Pathway“. Die Proteinkinase B (PKB) ist das zentrale Effektorprotein des PI3K-Signalweges, das durch Phosphorylierung aktiviert wird und nachgeschaltet die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β) sowie die Transkriptionsfaktoren der Forkheadfamilie (FKHR) phosphoryliert [Cantley, 2002]. Sowohl die Aktivität der GSK3 β als auch der FKHR-Transkriptionsfaktoren wird durch PKB-vermittelte Phosphorylierung gehemmt, so dass die Weiterleitung apoptotischer Signale unterdrückt wird. Für die Phosphorylierung der PKB sowie nachgeschaltet für die GSK3 β -Phosphorylierung wurde dabei gezeigt, dass sich durch Inkubation von HT29-Zellen mit AE02 pro- und antiapoptotische Stimuli überlagern. Auf Ebene der FKHR-Transkriptionsfaktoren wurde durch den AE02 keine Apoptoseinduktion vermittelt

[Diplomarbeit Ute Böttler, 2006]. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen scheint durch den AE02 keine Aktivierung von Raf-1 über die PI3K oder die PKC zu erfolgen.

Auch der Wnt-Signalweg übernimmt eine wichtige Rolle in der Kolonkanzerogenese, da durch Interaktion mit Elementen dieses Signalweges proliferationsfördernde und somit unerwünschte Effekte ausgelöst werden können (Abb. 29). Durch den Apfelsaftextrakt AE02 wurden in verbraucherrelevanten Konzentrationen keine wachstumsstimulierenden Effekte in HT29-Zellen vermittelt. Die Zellinkubation mit AE02 führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Hemmung der zellulären GSK3 β -Aktivität. Damit einher ging die signifikante Abnahme an phosphoryliertem β -Catenin. Gleichzeitig nahm aber unerwarteterweise der Gehalt an Gesamt- β -Catenin ab. Aufgrund der Ergebnisse wurde angenommen, dass der AE02 in humanen Kolonkarzinomzellen keinen Wachstumsstimulus über den Wnt-Signalweg induziert und somit wegen der Reduktion der Expression von β -Catenin eher antiproliferative Effekte des AE02 zu erwarten sind [Kern et al., 2006]. Im Einklang mit den Ergebnissen auf die β -Catenin-Homöostase wird auch die Tcf/Lef-vermittelte Gentranskription durch AE02 nicht beeinflusst [Kern et al., 2006].

Die Vermutung, dass die Hemmung der Aktivität und/oder Expression von Elementen proliferationsassoziiierter Signalkaskaden, einen Beitrag zur Wachstumshemmung von humanen Tumorzellen *in vitro* leistet, wird auch durch den AE02-induzierten Arrest in der G1-Phase unterstützt. Jedoch lassen die stärkeren Effekte auf die G2/M-Phase vermuten, dass weitere zelluläre Zielstrukturen involviert sein müssen [Dissertation Melanie Kern, 2006].

Auch *in vivo* zeigten Barth et al. (2005) bereits, dass durch 1,2-Dimethylhydrazin induzierte genotoxische Schäden in Mukosazellen des distalen Kolons von Ratten durch naturtrüben Apfelsaft gehemmt werden. Ebenso scheint der naturtrübe Apfelsaft im Vergleich zum klaren Apfelsaft die Anzahl an aberranten Kryptofoci im distalen Rattenkolon zu reduzieren [Barth et al., 2007].

Im Vergleich zum AE02 führte die Herstellung des Tresterextraktes AE03B zu substantiellen Unterschieden im Polyphenolmuster. Im Besonderen wird eine Abnahme an Cumaroylchinasäure und Chlorogensäure beobachtet, während sich Quercetinglykoside deutlich im AE03B anreichern. Um zu erfassen, inwieweit die Quercetinglykoside (AE03B: 116,2 mg/g bzw. AE02: 8,9 mg/g) zum inhibierenden Potential des AE03B beitragen, wurde eine AE03B-äquimolare Quercetinglykosidmischung untersucht. Diese führte weder zur Bildung relevanter H₂O₂-Konzentrationen im Zellkulturmedium, noch zeigte sie einen Einfluss auf das Zellwachstum von HT29-Zellen. Analog zu diesen Untersuchungen beobachteten Kern et al. (2005), dass einzelne Quercetinglykoside (Quercetin-3-glukosid, Quercetin-3-galaktosid, Quercetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-rutinosid) keine substantiell wachstumshemmenden Effekte in HT29-Zellen vermitteln.

Auch auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation zeigte die eingesetzte Quercetinglykosidmischung keinen Einfluss, während Quercetin-3-glukosid und Quercetin-3-galaktosid als Einzelsubstanzen die EGFR-Aktivität potent unterdrückten [Kern et al., 2005]. Somit scheinen sich die hemmenden Effekte der Einzelsubstanzen innerhalb der Quercetinglykosidmischung aufzuheben. Auch der Phosphorylierungsstatus des EGFR blieb durch die Quercetinglykosidmischung in HT29-Zellen unbeeinflusst. Anhand dieser Untersuchungen ist auszuschließen, dass die AE03B-äquimolare Quercetinglykosidmischung einen Beitrag zu den wachstums- und EGFR-hemmenden Effekten des Apfeltresterextraktes leistet. Somit muss das inhibierende Potential des AE03B auf andere Inhaltsstoffe zurückzuführen sein, die mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierungen bestimmten werden sollten.

Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung des AE04 wies daraufhin, dass im Besonderen oligomere Procyanidine zum EGFR-hemmenden Potential der Apfelextrakte beitragen. Auch Zeßner et al. (2008) identifizierten Procyanidine als potente Wirkklasse innerhalb der Apfelpolyphenole und schrieben den Verbindungen antiproliferative, antioxidative, antiinflammatorische u. a. Eigenschaften zu. Somit stellte sich die Frage, ob die Aktivität des EGFR durch oligomere Procyanidine gehemmt wird und inwieweit eine Hemmwirkung auf die isolierte Rezeptorpräparation bzw. auf das intakte zelluläre System begrenzt ist. Im Rahmen der Untersuchungen zeigte sich, dass der Oligomerisierungsgrad der Procyanidine bedeutend ist für eine potente Hemmung der isolierten EGFR-Aktivität. Dabei stellten höher oligomere Procyanidine potentere Hemmstoffe als z. B. dimere Procyanidine dar. In intakten Zellen wurde durch Inkubation mit einem Procyanidintrimer die Rezeptorautophosphorylierung effektiv unterdrückt, während sich das Procyanidintetramer als weitestgehend unwirksam erwies. Somit scheint die Hemmwirkung in der Zelle hinsichtlich des Molekulargewichtes der Verbindungen limitiert zu sein. Bislang wurden für die Procyanidine jedoch noch keine Untersuchungen zur H₂O₂-Entwicklung unter Zellkulturbedingungen durchgeführt, so dass abzuwarten wäre, inwieweit höher oligomere Procyanidine in Gegenwart von Katalase den zellulären Endpunkt modulieren. Da mit steigendem Oligomerisierungsgrad auch die Anzahl an OH-Gruppen der Procyanidine zunimmt, könnte dies mit einer zunehmenden H₂O₂-Bildung unter Zellkulturbedingungen korrelieren. H₂O₂ akkumuliert insbesondere verstärkt im Zellkulturmedium nach Inkubation mit OH-Gruppen-reichen Verbindungen wie Delphinidin und EGCG [Diplomarbeit Julia Richter, 2007].

Letztendlich scheinen aber Procyanidine abhängig von ihrem Oligomerisierungsgrad potente Hemmstoffe des EGFR darzustellen und als solche möglicherweise zur wachstumshemmenden Wirkung des Apfelsaftextrakt AE02 beizutragen. Diese Daten stehen in Einklang mit weiteren Untersuchungen, die Procyanidine als Antioxidantien und Radikalfänger beschreiben und ihnen

zytotoxische und apoptoseinduzierende Effekte in Tumorzelllinien zusprechen [Gossé et al., 2006; Medina et al., 2006; Gossé et al., 2005; Tourino et al., 2005]. Im Einzelnen zeigten Gossé et al. (2005/2006), dass procyanidinreiche Apfelfraktionen das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW620 hemmen und im Rahmen intrazellulärer Signalwege die Expression der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2, der c-Jun N-terminalen Kinase erhöhen und die Aktivität der Proteinkinase C unterdrücken. Ferner kommt es zur Hemmung der G2/M-Phase des Zellzyklus und zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität. Auch Miura et al. (2008) und Nomoto et al. (2004) publizierten, dass Procyanidine apoptoseinduzierende Effekte vermitteln und diese über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg ausgelöst werden. Somit modulieren procyanidinreiche Apfelsaftextrakte Signalkettenelemente wachstumsassoziiierter Signalkaskaden und führen nachfolgend zur Hemmung des Zellwachstums in humanen Tumorzellen.

Auch *in vivo* beobachteten Gossé et al. (2005), dass procyanidinreiche Apfelfraktionen in sehr niedrigen Konzentrationen (0,01 % im Trinkwasser) signifikant die Anzahl von hyperprolierenden Krypten und aberranten Kryptfoci im Azoxymethan-induzierten Rattenkanzerogenesemodell um 50 % reduzierten, während Fraktionen aus monomeren Flavonoiden ineffektiv blieben. Im Hinblick auf eine mögliche chemopräventive Wirkung der Verbindungen ist diese Wirkqualität von großem Interesse.

Hümmer et al. (2008) zeigten, dass signifikante Unterschiede im Gesamtprocyanidingehalt von Apfelextrakten bestehen. Dabei scheint das Procyanidinprofil abhängig von der Verarbeitung des Apfelsaftes sein. Im Vergleich zu einem trüben Apfelsaft sind Procyanidingehalt und Oligomerisierungsgrad in einem Klarsaft signifikant verringert. Dies korreliert mit Daten von Gokmen et al. (1998), die ebenfalls beobachteten, dass es durch Aufreinigung eines naturtrüben Apfelsaftes zu einem auffälligen Procyanidinverlust kam. Möglicherweise lassen sich über die Procyanidinkonzentration auch die unterschiedlichen Hemmeffekte naturtrüber und klarer Apfelsäfte in *in vivo* Untersuchungen erklären. Barth et al. (2007) zeigten, dass ein naturtrüber Apfelsaft die Anzahl an aberranten Kryptfoci im distalen Rattenkolon reduzierte, während ein klarer Apfelsaft ineffektiv blieb. Dies ist eventuell auf einen Verlust an Procyanidinen während der Saffherstellung zurückzuführen.

Im zellulären Testsystem spiegelt der Phosphorylierungsstatus die Aktivität des EGFR wider und ist somit entscheidend für die Interaktion der PTK-Domäne mit nachgeschalteten Elementen der MAPK-Kaskade [Boonstra et al., 2005; Fan et al., 2005; Liang et al., 1997]. Die Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung wurde bereits für zahlreiche Flavonoide wie beispielsweise das Grüntee catechin (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), das Flavonol Quercetin und das Flavon Luteolin publiziert [Fan et al., 2005; Boonstra et al., 2005; Lee et al., 2002]. Im Verlauf der vor-

liegenden Dissertation wurde gezeigt, dass der Phosphorylierungsstatus des EGFR durch die Apfelextrakte AE02 und AE03B sowie durch oligomere Procyanidine bzw. Procyanidinfraktionen potent gehemmt werden kann. Auch die Substanzklasse der Ellagatannine führte zu einer potenten Unterdrückung der EGFR-Autophosphorylierung. Castalagin und Grandinin unterdrückten die Aktivität des EGFR in humanen Kolonkarzinomzellen in wachstumshemmenden Konzentrationen und lassen somit auf einen direkten Zusammenhang zwischen EGFR- und Wachstumshemmung schließen. Da für die Ellagatannine bereits die Bildung von H₂O₂ im Zellkulturmedium nachgewiesen werden konnte [Dr. Melanie Esselen, persönliche Mitteilung], sollten die Untersuchung jedoch auch in Gegenwart von Katalase wiederholt werden, um auszuschließen, dass es sich hierbei um artifizielle Effekte durch eine H₂O₂-Akkumulation handelt.

In Rahmen der Kanzerogenese scheint nicht nur die Überexpression des EGFR eine entscheidende Rolle zu spielen, sondern auch die Hypermethylierung proliferationsassoziiierter Gene von Relevanz zu sein [Langer et al., 2006; Ohgaki und Kleihues, 2005; Ueki et al., 2002]. So führt die Hypermethylierung der Promotorregionen des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} zur Stilllegung des Gens. Das p16^{INK4a}-Protein stellt eine Art „molekulare Bremse“ im Zellzyklus dar, durch dessen Verlust es zu einer erhöhten Zellproliferation kommt [Zhu et al., 2001; Wajed et al., 2001]. Im Besonderen werden Polyphenole demethylierende Eigenschaften zugesprochen, die zur Reaktivierung des stillgelegten Gens führen können [Fang et al., 2007; Fini et al., 2007; Lee und Zhu, 2006]. Nach einer Substanzinkubation von 24 h zeigte der AE03B keinen Einfluss auf die DNA-Methylierung in der Promotorregion des p16^{INK4a}-Gens in HT29-Zellen. Sowohl mit als auch ohne Zusatz von Katalase blieben demethylierende Effekte aus. Erwartungsgemäß wurde daraufhin auch in der quantitativen PCR keine Modulation der Genexpression durch AE03B bestimmt. Allerdings führte der DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-CdR, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde und dessen demethylierendes Potential auf die Promotorregion des Gens nachgewiesen ist, nicht zu einer Reaktivierung der Genexpression von p16^{INK4a} in unseren Untersuchungen.

Untersuchungen von Fini et al. (2007) zeigten bereits, dass durch einen Apfelextrakt aus Annurca Äpfeln u. a. die Hypermethylierung in der Promotorregion von p16^{INK4a} aufgehoben wurde und es zur Reaktivierung der Genexpression kam. Aufgrund dieser und weiterer Studien lässt sich vermuten, dass eine Inkubationszeit von 24 h nicht ausreichend war, um demethylierende Effekte detektieren zu können [Fini et al., 2007; Lee und Zhu, 2006; Chuang et al., 2005; Bender et al., 1998]. Prinzipiell kann es nur dann zu einer demethylierenden Wirkung kommen, wenn sich die Zelle hinreichend oft teilt, was durch eine längere Inkubationszeit positiv beeinflusst wird. In der Literatur wird die Verdopplungszeit für HT29-Zellen nach 40-60 h angegeben [DSMZ], wobei

für den in dieser Arbeit verwendeten HT29-Klon die Verdopplungszeit eigens bestimmt werden sollte. Grundsätzlich besitzt der parentale DNA-Strang nach der Zellteilung noch das ursprüngliche Methylierungsmuster, während der neu-synthetisierte Strang noch frei von DNA-Methylierungen ist. Sofern nach DNA-Replikation der Gehalt an DNA-Methyltransferasen sehr gering oder die Enzymaktivität herunterreguliert ist, wird das Methylierungsmuster nicht oder nur unvollständig ergänzt [Hermann et al., 2004]. Das bedeutet, je mehr Zellteilungen erfolgen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Methylierungsmuster stillgelegter Gene infolge demethylierender Agenzien moduliert wird. Obgleich das p16^{INK4a}-Gen in HT29-Zellen hypermethyliert vorliegt, zeigte der polyphenolreiche Apfeltresterextrakt AE03B keine demethylierenden Eigenschaften, so dass unter Berücksichtigung verlängerter Inkubationszeiten weitere Apfelextrakte bzw. Apfelpolyphenole zu testen wären.

Der Abbau von Anthocyanidinen durch die Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts spielt nicht nur *in vivo* eine entscheidende Rolle, sondern ist auch unter Zellkulturbedingungen von Relevanz [Kern et al., 2007b], so dass auch die Frage nach der biologischen Wirkung von Abbauprodukten von Bedeutung ist. Esselen et al. (MNF eingereicht) beobachteten, dass die unter mikrobiellen Bedingungen postulierten Abbauprodukte des Flavonols Quercetin (Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure) unter Zellkulturbedingungen nicht gebildet werden und somit nur *in vivo* eine Rolle zu spielen scheinen. Delphinidin und Quercetin sowie deren Abbauprodukte Gallussäure und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure unterdrückten als Einzelverbindungen sowohl in Gegenwart von Katalase als auch von Ascorbinsäure das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29. Obwohl H₂O₂ einen Beitrag zur Wachstumshemmung leistet, vermitteln die Verbindungen jedoch auch selbst wachstumshemmende Effekte, so dass die Hemmung des Zellwachstums infolge einer H₂O₂-Bildung kein experimentelles Artefakt darstellt. Die Wirkmechanismen, die zur Hemmung des Zellwachstums führen, scheinen jedoch unterschiedlich zu sein. Während es sich für die Ausgangsverbindungen Delphinidin und Quercetin vermutlich um eine EGFR-vermittelte Wachstumshemmung handelt [Fridrich et al., 2008b; Kern et al., 2005, Meiers et al., 2001], beeinflussen die Abbauprodukte Gallussäure und 3,4-Di-hydroxyphenylelessigsäure die Aktivität des isolierten Rezeptors nur marginal [Kern et al., 2007b; Dissertation Melanie Kern, 2006], so dass die wachstumshemmenden Effekte über bislang noch unbekanntes zelluläre Signalelemente vermittelt werden müssen. Im Hinblick auf die polyphenolreichen Apfelextrakte lässt sich daraus schließen, dass ein Beitrag einzelner Abbauprodukte zur Wachstumshemmung eher gering ist und die Hemmwirkung weitestgehend auf die Ausgangsverbindungen zurückzuführen ist.

5 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Beeinflussung der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch Polyphenole unterschiedlicher Substanzklassen in Zellkulturexperimenten. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass ein polyphenolreicher Apfelsaftextrakt das Wachstum humaner Kolonkarzinomzellen *in vitro* potent unterdrückte und sowohl die Aktivität des isolierten EGFR als auch der Rezeptorautophosphorylierung effektiv herabsetzte [Fridrich et al., 2007a; Kern et al., 2005]. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Apfelpolyphenole unter Zellkulturbedingungen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Medium generieren, welches dann zu experimentellen Artefakten führen kann [Lapidot et al., 2002]. Die zu untersuchenden Apfelextrakte AE02, AE03B und AE05 führten unter Zellkulturbedingungen zur Bildung substantieller Konzentrationen an H_2O_2 . In Gegenwart von 100 U/ml Katalase wurde die H_2O_2 -Akkumulation im Zellkulturmedium jedoch bis auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle unterdrückt. Die bereits für den Apfelsaftextrakt AE02 und den Apfeltresterextrakt AE03B beobachteten wachstumshemmenden Effekte wurden auch in Gegenwart von Katalase detektiert, so dass, obwohl H_2O_2 einen Beitrag zur Wachstumshemmung leistet, die Unterdrückung des Zellwachstums kein experimentelles Artefakt darstellt. Für den Apfelsaftextrakt AE05 ($\leq 500 \mu\text{g/ml}$) und die sortenreinen Apfelextrakte ($\leq 500 \mu\text{g/ml}$) wurde in Gegenwart von Katalase nur eine marginale Hemmung des Wachstums von HT29-Zellen bestimmt. Somit lässt sich u. a. ein Beitrag des sortenreinen Apfelextraktes „Bohnapfel“ zum inhibierenden Potential des AE02 auf das Zellwachstum ausschließen.

Die mitogenaktivierte Proteinkinasekaskade ist einer der zentralen Signalwege, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren und/oder Apoptose induzieren. Am Anfang dieser Kaskade steht der EGFR, dessen effektive Hemmung mit der Unterdrückung dieses Signalweges verbunden ist. In Gegenwart von Katalase wurde durch die Apfelextrakte AE02 und AE03B eine signifikante Abnahme des Phosphorylierungsstatus des EGFR bis zu einer Konzentration von $500 \mu\text{g/ml}$ in HT29-Zellen beobachtet. Im Vergleich zur Zellinkubation ohne Katalase blieb ein Wiederanstieg des Gehaltes an phosphoryliertem EGFR ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$) aus. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation von H_2O_2 im Zellkulturmedium dem EGFR-hemmenden Potential von Apfelpolyphenolen entgegenwirkt. Durch Zusatz von Katalase wurde jedoch gezeigt, dass die Apfelextrakte selbst potente Hemmstoffe der EGFR-Aktivität darstellen, H_2O_2 allerdings die zelluläre Antwort modifizieren und so zur Artefaktbildung führen kann. Weiterhin wurde deutlich, dass die Hemmwirkung der Apfelextrakte nicht nur im zellfreien Testsystem von Relevanz ist, sondern sich auch in der Unterdrückung der EGFR-Aktivität in HT29-Zellen widerspiegelt. Der Apfelsaftextrakt AE05 erwies sich im zellulären Testsystem im Vergleich zum AE02 und

zum AE03B als deutlich geringer wirksam. Die Wirkqualität der Apfelextrakte im Hinblick auf die EGFR-Hemmung kann somit wie folgt zusammengefasst werden: Apfeltresterextrakt AE03B > Apfelsaftextrakt AE02 > sortenreiner Bohnapfelextrakt ~ Apfelsaftextrakt AE05.

Im Vergleich zum Apfelsaftextrakt AE02 führt die Herstellung des Tresterextraktes AE03B zu substantiellen Unterschieden im Polyphenolmuster. Im Besonderen kommt es durch die Tresterextraktion zu einer Anreicherung von Quercetinglykosiden im AE03B. Die Untersuchung einer AE03B-äquimolaren Quercetinglykosidmischung ergab, dass diese weder zur Bildung relevanter H₂O₂-Konzentrationen im Zellkulturmedium noch zur Hemmung des Zellwachstums oder zur Unterdrückung der EGFR-Aktivität führt. Somit muss die Beeinflussung zellulärer Zielstrukturen durch den AE03B auf andere bislang noch nicht identifizierte Inhaltsstoffe zurückzuführen sein.

Aktivitätsgeleitete Fraktionierungen weisen daraufhin, dass im Besonderen oligomere Procyanidine zum EGFR-hemmenden Potential der Apfelextrakte beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass isolierte Procyanidine abhängig von ihrem Oligomerisierungsgrad potente Hemmstoffe des EGFR darstellen und als solche möglicherweise zur wachstumshemmenden Wirkung der Apfelextrakte beitragen. Hinsichtlich des chemopräventiven Potentials der Apfelextrakte und der Procyanidine sind die EGFR-inhibierende Wirkqualität und die Unterdrückung des Tumorzellwachstums hervorzuheben. Auch Ellagannine wurden als potente Inhibitoren der Autophosphorylierung des EGFR in HT29-Zellen identifiziert.

Ferner werden polyphenolreichen Apfelextrakten demethylierende Eigenschaften zugeschrieben, die zur Reaktivierung stillgelegter Gene führen können [Fini et al., 2007]. Die Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} wird mit dem Verlust seiner Funktion und seiner Expression in Verbindung gebracht. Der zu untersuchende Apfeltresterextrakt AE03B zeigte jedoch keinen Einfluss auf den DNA-Methylierungsstatus der Promotorregion des p16^{INK4a}-Gens in HT29-Zellen. Sowohl mit als auch ohne Zusatz von Katalase blieben demethylierende Effekte aus. Demzufolge wurde auch in der quantitativen PCR keine Modulation der Gentranskription durch den AE03B bestimmt.

Zu einem Abbau von Flavonoiden kommt es nicht nur durch die intestinale Mikroflora, sondern auch unter Zellkulturbedingungen. Dabei führt die begrenzte chemische Stabilität der Verbindungen zur Bildung entsprechender Abbauprodukte im Zellkulturmedium. Die Abbauprodukte von Delphinidin und Quercetin, Gallussäure bzw. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, stellen, wie die Ausgangssubstanzen selbst, potente Hemmstoffe des Wachstums von HT29-Zellen dar [Kern et al., 2007b; Kern et al., 2005; Marko et al., 2004; Esselen et al., MNF eingereicht]. Auch in Gegenwart von Katalase und Ascorbinsäure kam es zu einer signifikanten Unterdrückung des Zell-

wachstums durch die Ausgangsverbindungen und die Abbauprodukte. Somit wird deutlich, dass, obwohl H_2O_2 einen Beitrag zur Wachstumshemmung leistet, die einzelnen Verbindungen selbst wachstumshemmende Effekte vermitteln. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass durch den Flavonoidabbau Substanzen gebildet werden, die wiederum selbst wachstumshemmende Effekte vermitteln und somit zu den zellulären Wirkungen der Ausgangssubstanzen beitragen. Jedoch kann im Rahmen des Abbaus von Delphinidin ausgeschlossen werden, dass ausschließlich die Gallussäure für dessen wachstumshemmende Eigenschaft *in vitro* verantwortlich ist, da auch die Gallussäure einem extensiven Abbau im Zellkulturmedium unterliegt.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Apfelextrakte auch in Gegenwart von Katalase potente Hemmstoffe der EGFR-Aktivität und des Wachstums von humanen Tumorzellen *in vitro* darstellen und somit die gezeigten zellulären Effekte nicht ausschließlich auf eine H_2O_2 -Bildung zurückzuführen sind. Im Besonderen scheinen oligomere Procyanidine zum EGFR-inhibierenden und höchstwahrscheinlich auch zum wachstumshemmenden Potential der Apfelpolyphenole beizutragen. Da die zellulären Effekte im verbraucherrelevanten Konzentrationsbereich von Apfelsäften liegen, könnten procyanidinreiche Apfelsäfte somit auch im Rahmen der Chemoprävention von Bedeutung zu sein.

6 Methoden

6.1 Apfelextrakte

6.1.1 Apfelsaftextrakt AE02

Der klare Apfelsaft AS02 wurde aus 45 % Tafeläpfeln (davon 25 % Topaz) und einem Gemisch aus Mostapfelsorten (17,5 % Bohnapfel; 22,5 % Winterrambur; 15 % Bittenfelder) der Ernte des Jahres 2002 hergestellt. Durch Enzymierung (50 ml/t Fructozym P, Erbslöh, Geisenheim), kombinierte Schönung (8 g/hl Gelatine; 40 ml/hl Kieselsol; 50 g/hl Bentonit, Erbslöh, Geisenheim) sowie anschließender Separation und Schichtenfiltration (Ceco KD, Firma Begerow, Langenlohnsheim, Deutschland) des naturtrüben Saftes wurde der Klarsaft gewonnen. Die Aufreinigung von 100 l Klarsaft erfolgte über eine mit 5 l Adsorberharz (XAD 16 HP, Rohm & Haas, Frankfurt, Deutschland) gefüllte Pharmacia Glassäule (BPG 100, 100x10 cm). Wasserlösliche Bestandteile wie Zucker, organische Säuren und Mineralien wurden mit destilliertem Wasser entfernt, während die Polyphenole in 96 %-igem Ethanol eluiert wurden. Anschließend wurde das ethanolische Eluat eingeeengt und die Polyphenole gefriergetrocknet. Der resultierende polyphenolreiche Extrakt wurde zur Lagerung kühl und dunkel aufbewahrt. Die analytische Bestimmung der Polyphenole des AE02 wurde mittels eines HPLC/Diodenarraydetektor durchgeführt (Einwaage 1 g/l in 20 % Methanol; Säule Phenomenex Aqua, Aschaffenburg, Deutschland; Acetonitril/Phosphorsäuregradient; Detektionswellenlänge: $\lambda(\text{Flavonoide})=280 \text{ nm}$; $\lambda(\text{Phenolcarbonsäuren})=360 \text{ nm}$; $\lambda(\text{Quercetinderivate})=360 \text{ nm}$) (Tab. 9) [Schieber et al., 2001; Will et al., 2000].

Jedoch ist das Polyphenolprofil der Extrakte noch lange nicht vollständig identifiziert (ca. 50 %) und es ist anzunehmen, dass noch unbekannte Polyphenole ebenfalls zur hochpotenten Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR beitragen. In einer Studie von Kern et al. [2005] wurden neben dem AE02 auch zwei Mischungen mit ausschließlich bekannten Inhaltsstoffen des Apfelsaftextraktes hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die EGFR-Aktivität untersucht. Die Mischungen zeigten keine bzw. nur eine marginale Hemmung der isolierten EGF-Rezeptorpräparation, wobei sich die Mischung mit den Procyanidindimeren PB1 und PB2 als deutlich potenter erwies [Kern et al. 2005]. Damit wird deutlich, dass noch nicht identifizierte Polyphenole zur Hemmung des EGFR beitragen müssen. Ferner spielen vermutlich auch synergistische, additive und überadditive Effekte eine Rolle.

Die Charakterisierung der Apfelpolyphenole wurde 2004 zu Gunsten kürzerer Analysezeiten, eines geringeren Lösungsmittelverbrauchs und einer LC-MS-Kompatibilität modifiziert (Tab. 9). Dabei wurden die Polyphenole mit einem Thermo-Finnigan HPLC/DAD System (Drei-

eich, Deutschland; Trennsäule, 3 µM RP-Reposil-Pur C18-AQ, Firma Maisch, Ammerbruch, Deutschland; Acetonitril/Wasser/Essigsäuregradient) aufgetrennt (Einwaage 1 g/l in 10 % Methanol).

Tab. 9 Polyphenolzusammensetzung der Apfelextrakte AE02, AE03B, AE04, AE05 [Schäfer et al., 2006; Kern et al., 2005]. Die in Klammern stehenden Zahlen weisen auf eine veränderte Analytik zur Charakterisierung des Polyphenolprofils hin; n. n.: nicht nachweisbar.

Polyphenole	AE02 [mg/g]		AE03B [mg/g]		AE04 [mg/g]		AE05 [mg/g]
Procyanidin B1	7	(n.n.)	6,2	(0,9)	n.n.	(3,1)	1,8
Procyanidin B2	15,1	(15,1)	18,4	(16,4)	12,1	(5,1)	1,1
Procyanidin C1	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	2,5
(-)-Epicatechin	19,2	(25,3)	17,7	(15,2)	12,5	(15,7)	2,5
(+)-Catechin	n.n.	(4,8)	2,7	(2,9)	n.n.	(1,8)	3,8
Phloretinxyloglukosid	66,2	(155,8)	31,7	(68,8)	4,2	(136,3)	23,1
Phloretinglykosid 1	24,7	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.
Phloretinglykosid 2	9	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.
Phloridzin	27,9	(35)	78,9	(64,0)	48,0	(52,8)	23,6
Chlorogensäure	181,5	(240,8)	19,2	(20,6)	183,2	(245,9)	164,0
Kryptochlorogensäure	n.n.	(9,2)	n.n.	(n.n.)	3,3	(13,9)	20,9
Cumaroylgukose	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	n.n.	(n.n.)	2,9
3-Cumaroylchinasäure	9,5	(9,2)	3,0	(n.n.)	9,4	(8,8)	2,0
4-Cumaroylchinasäure	77,3	(61,0)	5,0	(3,5)	66	(63,8)	71,6
5-Cumaroylchinasäure	10,4	(n.n.)	3,8	(n.n.)	39,8	(n.n.)	n.n.
Kaffeesäure	9,5	(11,9)	4,0	(3,9)	7,5	(3,1)	3,1
p-Cumarsäure	n.n.	(2,9)	4,2	(4,3)	2,6	(3,3)	1,8
Quercetin-3-xylosid	n.n.	(n.n.)	18,1	(12,3)	n.n.	(2,1)	n.n.
Quercetin-3-arabinsid	n.n.	(n.n.)	3,5	(12,2)	n.n.	(n.n.)	n.n.
Quercetin-3-rhamnosid	4,1	(n.n.)	25,1	(19,1)	4,3	(4,9)	1,2
Quercetin-3-galaktosid	0,8	(1,7)	8,1	(26,8)	1,8	(3,8)	1,5
Quercetin-3-glukosid	1,4	(n.n.)	12,3	(8,5)	1,5	(2,7)	0,7
Quercetin-3-rutinosid	2,6	(3,6)	49,1	(4,7)	4,5	(n.n.)	n.n.
Gesamtgehalt	466,2	(576,4)	310,9	(284,0)	478,3	(567,0)	328,1

6.1.2 Apfeltresterextrakt AE03B

Im Laufe der Herstellung von Apfelsaft fällt als Pressrückstand Apfeltrester an, der nass als Tierfutter (Wildfütterung) oder in getrocknetem Zustand zur Pektinengewinnung eingesetzt wird. Die Nebenprodukte der Verarbeitung pflanzlicher Lebensmittel stellen allgemein sehr reichhaltige Quellen phenolischer Verbindungen dar, da diese zum Teil überwiegend in Schalen und Kernen anzutreffen sind, die bei der Verarbeitung allgemein entfernt oder bei der Safterstellung nur unzureichend extrahiert werden [Schieber et al., 2001]. So stellen auch die Trester aus der Apfelsaftproduktion besonders polyphenolreiche Quellen dar.

Der Trester des AS03B wurde aus den Tafeläpfeln (Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold) der Ernte des Jahres 2003 gewonnen. Zur Herstellung des Extraktes 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 (AB Enzymes, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Die enzymatische Aufarbeitung dient dem Aufschluss der Zellmembran und erfolgt für 2 h bei 50 °C im Maischetank unter kontinuierlichem Rühren. Somit wäre es zweckmäßiger gewesen den Begriff eines Maischeerzeugnis einzuführen statt von einem Apfeltrester zu sprechen. Vom sogenannten B-Saft wurden 550 l auf eine mit 55 l Adsorberharz (P-495, Bucher-Alimentech, Neuseeland) gefüllte Edelstahlsäule gegeben. Die wasserlöslichen Komponenten (Zucker, organische Säuren, Mineralien) wurden ausgewaschen und die Polyphenole in Ethanol eluiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde der Tresterextrakt AE03B gefriergetrocknet. Die Analytik der Apfelpolyphenole (Einwaage 1 g/l in 10 % Methanol) erfolgte entsprechend der für den AE02 beschriebenen Methodik (Tab. 9) [Schäfer et al., 2006a; Schieber et al., 2001].

6.1.3 Apfelsaftextrakt AE04

Der Apfelsaftextrakt AE04 wurde aus 250 l des Klarsaftes AE02, aus 50 l Tresterextraktions-saft AE03B und aus je 200 l verschiedener Mostapfelsäfte (Schafsnase, Bohnapfel, Winter-rambour) hergestellt. Zur Herstellung des Extraktes und der Charakterisierung der Apfelpolyphenole wurde die für den AE02 beschriebene Analytik herangezogen (Tab. 9).

6.1.4 Fraktionierung des AE04

Zur Fraktionierung des AE04 wurden 100 g des Apfelsaftextraktes im Arbeitskreis von Prof. Schreier (Universität Würzburg) chromatographisch aufgetrennt [modifiziert nach Zeßner, 2005]. Hierzu wurden je 10 g des Extraktes in 25 ml Methanol gelöst und über Größenaus-schlusschromatographie an einer Sephadex LH-20 Säule (2000 x 25 mm) aufgereinigt. Der Verlauf der Trennung wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel dokumentiert. An-

hand der Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Charakterisierung wurde eine Einteilung in acht Grundfraktionen S.1 bis S.8 vorgenommen. Nach abgeschlossener Trennung erfolgte die Regenerierung des Säulenmaterials mit einer Aceton/Methanol Mischung, wobei stark unpolare Substanzen eluiert wurden (Fraktion S.9). Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 35 °C schonend entfernt und die Fraktionen in Wasser aufgenommen. In Fraktion S.6, S.7 und S.8 kristallisierten Niederschläge aus, die mit Hilfe einer Glasfritte (Porengröße P4) abgetrennt und mit eiskaltem Wasser gewaschen wurden, so dass diese Fraktionen letztendlich als Mutterlauge und Niederschlag vorlagen. Fraktion S.9 war vollständig wasserunlöslich. Anschließend wurden die Fraktionen gefriergetrocknet, homogenisiert und bei 4 °C gelagert. Da durch die chromatographische Auftrennung an Sephadex LH-20 erwartungsgemäß nur eine grobe Vortrennung der Substanzen erreicht werden konnte (Tab. 10), schlossen sich verschiedene Trennschritte mit dem Ziel an, Reinsubstanzen zur *in vitro* Testung zu gewinnen.

Tab. 10 Analytische Bestimmung (HPLC-DAD, HPLC-MS/MS) der polyphenolischen Substanzen der Fraktionen des AS04 [Prof. Schreier, Universität Würzburg, BMBF Jahresbericht 2005] n.d., nicht detektiert; n.b., nicht bestimmt

Polyphenole	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5	S.6	S.7	S.8	S.9
(-)-Epicatechin	n.d.	n.d.	n.d.	0,0	65,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+)-Catechin	n.d.	n.d.	n.d.	0,0	10,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Cumaroylchinasäure	n.d.	1,7	107,4	16,2	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Neochlorogensäure	n.d.	1,4	0,0	0,0	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorogensäure	n.d.	n.d.	337,0	213,8	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kryptochlorogensäure	n.d.	n.d.	0,0	0,0	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeesäure	n.d.	n.d.	0,0	0,0	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-Coumarsäure	n.d.	n.d.	11,6	0,0	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretinxyglukosid	n.d.	n.d.	144,5	107,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloridzin	n.d.	n.d.	44,2	191,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	5,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloridzin	n.d.	n.d.	n.d.	14,4	2,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloretinxyglukosid	n.d.	n.d.	n.d.	26,6	62,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,5	15,7	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51,4	18,6	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinarabinosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinglukosid	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	6,7	3,1	n.d.	n.d.	n.d.

Quercetingalaktosid	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	16,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinrhamnosid	n.d.	n.d.	n.d.	4,0	18,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinrutinosid	n.d.	n.d.	n.d.	5,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinxylosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,5	3,4	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	0,6	1,5	4,5	n.d.
polymere Procyanidine (photometrisch)	650,8	357,6	339,8	447,9	767,5	938,7	846,5	868,0	996,3
polymere Kohlenhydratbausteine	113	107	n.b.						
Gesamt [mg/g]	763,8	467,7	985,2	988,0	906,9	945,8	848,0	872,5	996,3

Fraktion S.5 wurde als potenter Inhibitor der PTK-Aktivität des isolierten EGFR identifiziert und aus diesem Grund einer weiteren Auftrennung unterzogen. Die Auftrennung der Fraktion erfolgt mittels Flash-Chromatographie an einer Octadecylphase (C18, 5 µM) mit isokratischem Fließmittel. Dabei wurden die 10 Subfraktionen S.5.1 bis S.5.10 erhalten (Tab. 11).

Tab. 11 Analytische Bestimmung (NMR-, HPLC-MS/MS) der Subfraktionen des S.5 des AE04 [Prof. Schreier, Universität Würzburg, BMBF Jahresbericht 2005] n.i., nicht identifiziert; n.b., nicht bestimmt; *Halbquantitativ über die LC Flächen)

Subfraktionen	Komponente	m/z	Menge*
S.5.1	stark polare Substanzen	n.b.	n.b.
	Procyanidintrimer	n.b.	Minorkomponente
S.5.2	stark polare Substanzen	n.b.	n.b.
	stark polare Substanzen	n.b.	n.b.
	stark polare Substanzen	721	n.b.
	stark polare Substanzen	705	n.b.
	Procyanidindimer B1	n.b.	n.b.
S.5.3	stark polare Substanzen	705	6%
	n. i.	673	25%
	Catechin	n.b.	45%
	Procyanidindimer B1	n.b.	n.b.
	Procyanidin	641	10%
	Hydroxyphloridzin	451	4%
S.5.4	Catechin	289	20%
	Neochlorogensäure	353	13%
	Procyanidin	461	23%
	Procyanidindimer B2	577	14%
	n. i.	465	6%
	Kaffeensäure	179	22%

S.5.5	Procyanidin	n.b.	n.b.
	Procyanidin	577	n.b.
	Procyanidin	n.b.	n.b.
	Catechin	289	80%
	Procyanidin	961	n.b.
	Cumaroylchinasäure	335	Wenig
S.5.6a	Procyanidin	n.b.	n.b.
	Cumaroylchinasäure	n.b.	n.b.
	n. i.	385	n.b.
S.5.6b	Procyanidin	385	n.b.
	Procyanidin B2	577	n.b.
	Procyanidin	n.b.	n.b.
	Epicatechin	n.b.	n.b.
	Procyanidin	n.b.	n.b.
	Phloretin glykosid	n.b.	n.b.
S.5.7	n. i.	335	n.b.
	Hydroxyphloretin-glykosid	451	n.b.
	Quercetinglukosid	463	n.b.
	Quercetingalaktosid	463	n.b.
	Hydroxyphloridzin	451	Hauptkomponente
	Procyanidine	n.b.	n.b.
	Quercetin	301	n.b.
S.5.8	Hydroxyphloridzin	451	Spuren
	Phloretin xylglukosid	567	Spuren
	Quercetinarabinosid	433	Spuren
	Quercetin xylosid	433	Spuren
	Quercetin	301	25%
	Procyanidine	n.b.	n.b.
	Quercetin rhamnosid	447	42%
	Phloridzin	273	30%
S.5.9	Procyanidine	n.b.	Hauptkomponente
	Procyanidin	n.b.	n.b.
	Quercetin	301	n.b.
	Phloretin	273	n.b.
S.5.10	Procyanidine	n.b.	n.b.
	Phloretin	301	n.b.
	Quercetin	273	n.b.

Da die Grundfraktionen S.1 – S.9 des AE04 als besonders potente Inhibitoren der isolierten EGF-Rezeptorpräparation identifiziert und mit auffallend hohen Gehalten an oligomeren Procyanidinen bestimmt wurden, sollte geklärt werden, inwieweit die Procyanidine des AE04 und deren Polymerisationsgrad Einfluss auf die Aktivität des EGFR nehmen. Des Weiteren ist bekannt, dass oligomere Procyanidine abhängig von ihrem Oligomerisierungsgrad potente Hemmstoffe des EGFR sowohl im isolierten Testsystem als auch in HT29-Zellen darstellen [Fridrich et al., 2007b]. Zur Trennung der Procyanidine nach ihrem Oligomerisierungsgrad wurde der Apfelsaftextrakt AE04 an Kieselgel aufgereinigt, wobei sich der Gradient an einer Methode von Sudjaroen et al. (2005) orientierte. Leider sind die glykosylierten Polyphenole sehr spät eluiert, so dass es Überlagerungen mit den Procyanidinen gab [persönliche Mitteilung, Wolfgang Hümmer]. Insgesamt wurden fünf Fraktionen gewonnen, deren Oligomerisierungsgrad von Fraktion F1 (procyanidinfrei) zu Fraktion F5 (Oktamer) anstieg (Tab. 12) [Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg, persönliche Mitteilung].

Tab. 12 Fraktionen des AE04 nach Trennung der Procyanidine. n.d., nicht detektiert; n.b., noch unbekannt

Polyphenole	F.1	F.2	F.3	F.4	F.5
(-)-Epicatechin	n.d.	4,5	n.d.	n.d.	n.d.
(+)-Catechin	n.d.	1,5	n.d.	n.d.	n.d.
4-Cumaroylchinasäure	1,5	73,7	n.d.	n.d.	n.d.
Neochlorogensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorogensäure	11,3	697,9	37,4	3,4	n.d.
Kryptochlorogensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-Coumarsäure	6,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretinxyloglukosid	n.d.	13,0	484,0	42,7	n.d.
Phloridzin	n.d.	129,6	39,9	3,3	n.d.
Phloretin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloridzin	n.d.	n.d.	6,2	1,8	n.d.
3-Hydroxyphloretinxyloglukosid	n.d.	n.d.	22,5	11,7	n.d.
Procyanidindimer B1	n.d.	n.d.	12,4	n.d.	n.d.
Procyanidindimer B2	n.d.	n.d.	28,4	n.d.	n.d.
Procyanidindimer B3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidindimer B4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinarabinosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetinglukosid	n.d.	1,5	1,0	n.d.	n.d.
Quercetingalaktosid	n.d.	4,4	0,0	n.d.	n.d.

Quercetinrhamnosid	n.d.	5,2	1,6	n.d.	n.d.
Quercetrinrutinosid	n.d.	0,0	11,7	n.d.	n.d.
Quercetinxylosid	n.d.	4,5	4,5	n.d.	n.d.
Quercetin	n.d.	0,7	0,0	n.d.	n.d.
polymere Procyanidine (photometrisch)	0,0	70,2	268,2	739,2	1030,7
polymere Kohlenhydratbausteine	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Gesamt [mg/g]	19,3	1006,9	877,0	802,0	1030,7

6.1.5 Apfelsaftextrakt AE05

Der Apfelsaftextrakt AE05 setzt sich aus den Säften verschiedener Apfelsorten (Topaz 24 %, Bittenfelder 10 %, Bohnapfel 23 %, Seestermüher Zitronenapfel 25 % und Börtlinger Weinapfel 18 %) der Ernte des Jahres 2005 zusammen. Mit Ausnahme des Tafelapfels Topaz handelt es sich hierbei ausschließlich um Mostapfelsorten.

Der hergestellte Klarsaft wurde über eine mit Adsorberharz (XAD 16 HP, Rohm & Haas, Frankfurt, Deutschland) gefüllte Pharmacia Glassäule (BPG 100, 100x10 cm) aufgereinigt und die Apfelpolyphenole in Ethanol eluiert. Nach Behandlung im Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung wurde das Polyphenolprofil mittels HPLC-DAD System bestimmt (Tab. 9) [Dr. Will, Forschungsanstalt Geisenheim, persönliche Mitteilung].

Der AE05 war als Masterextrakt mit AE02-vergleichbaren Eigenschaften angedacht. Im Rahmen des NutritionNet Netzwerkes wurde der AE02 als Apfelextrakt mit antioxidativem, anti-proliferativem, antiinflammatorischem und antihormonellem Potential sowie als Modulator des Karzinogenmetabolismus charakterisiert. Um einen weiteren potenten Apfelextrakt zu erhalten, wurde der AE05 nach Vorlage des AE02-Polyphenolmusters hergestellt.

6.1.6 Sortenreine Apfelsaftextrakte

Weiterhin wurden sortenreine Apfelsaftextrakte in unsere Untersuchungen mit einbezogen. Bohnapfel, Seestermüher Zitronenapfel, Hauxapfel und Gehrers Rambur zählen zu den alten Sorten des Kulturapfels *Malus domestica*. Während Bohnapfel, Hauxapfel und Gehrers Rambur typische Mostapfelsorten darstellen, wird der Seestermüher Zitronenapfel (Apfel des Jahres 2007 in Norddeutschland) auch als aromatischer Winterapfel verzehrt. Der Kulturapfel zählt zur Gattung der Äpfel in der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) [Votteler, 2005; Hartmann, 2003].

Zur Herstellung der sortenreinen Apfelsaftextrakte wurde neben dem Klarsaft auch der trübe Saft verwendet. Ferner wurde die Aufreinigung des Klarsaftes und des Trübsaftes jeweils an

einem XAD16-Adsorberharz und an einem weiteren Harz (Sepabeads SP70, Resindion, Milano) durchgeführt. Tendenziell scheint das SP70-Harz eine bessere Adsorptionswirkung hinsichtlich der Polyphenole zu besitzen [persönliche Mitteilung, Dr. Will, Forschungsanstalt Geisenheim].

Je 200 ml der Harze wurden in 30x5 cm Pharmacia XK-Säulen gepackt und mit ca. 500 ml destilliertem Wasser gespült. Nach Zentrifugation wurden pro Apfelsaft 2 Liter auf die Säule gegeben. Die wasserlöslichen Bestandteile (Zucker, organische Säuren, Mineralien) wurden durch Spülung mit ca. 0,5 Liter destilliertem Wasser entfernt. Die polyphenolischen Inhaltsstoffe wurden in 96%igem Ethanol eluiert, im Rotationsverdampfer eingengt und gefriertrocknet. Die Bestimmung der Polyphenolzusammensetzung (Tab. 13) erfolgte wie bereits für den AE02 beschrieben.

Die sortenreinen Apfelsaftextrakte sind mengenmäßig durch einen hohen Gehalt an Chlorogensäure bestimmt. Gehrers Rambur und die Bohnapfelsaftextrakte zeichnen sich im Vergleich zum Hauxapfel und zum Seestermüher Zitronenapfel durch erhöhte Konzentrationen an (-)-Epicatechin aus. Während der Hauxapfel durch seinen hohen Gehalt an Phloretinxyloglukosid auffällt, ist dies beim Seestermüher Zitronenapfel die 4-Cumaroylchinasäure (Tab. 13).

Tab. 13 Polyphenolzusammensetzung der sortenreinen Apfelsaftextrakte Hauxapfel, Seestermüher Zitronenapfel, Gehrers Rambur und Bohnapfel. XAD, SP70: verwendete Harze zur Aufreinigung

Polyphenole	Hauxapfel, trüb, XAD	Seestermüher Zitronenapfel, trüb, XAD	Gehrers Rambur, klar, XAD	Bohnapfel, klar, XAD	Bohnapfel klar, SP70
Procyanidindimer B1	1,91	1,82	2,37	2,83	7,4
(+)-Catechin	3,84	4,94	5,65	2,72	6,3
Procyanidindimer B2	6,82	3,94	5,95	1,41	0,0
(-)-Epicatechin	11,96	3,95	35,73	26,67	31,0
Procyanidintrimer C1	3,16	4,60	10,17	8,79	10,2
Phloretin-2'xyloglukosid	140,70	13,78	73,07	92,79	119,0
Phloretin-2'xylogalaktosid	17,04	0,00	8,88	10,37	14,0
Phlorizin	52,84	29,17	13,06	12,70	17,6
Cumaroylglukose	0,28	2,54	0,80	0,00	0,0
Chlorogensäure	148,08	197,94	218,43	124,87	158,0
Kryptochlorogensäure	3,81	26,37	10,69	2,93	4,7
Kaffeesäure	0,00	1,26	3,05	12,62	16,0
3-Cumaroylchinasäure	0,00	3,07	2,96	0,00	1,4
4-Cumaroylchinasäure	13,50	99,00	38,17	9,37	13,4
Cumarsäure	1,66	2,20	2,93	0,00	0,8

Quercetin-3-galaktosid	0,93	1,58	0,60	0,55	1,1
Quercetin-3-glykosid	0,88	0,73	0,97	0,42	0,7
Quercetin-3-xylosid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
Quercetin-3-rhamnosid	1,23	1,10	2,36	1,75	2,8
Gesamt [mg/g]	408,62	397,98	435,84	310,79	404,4

6.2 Zellkultur

6.2.1 Zelllinien

6.2.1.1 HT29-Zellen

Bei HT29-Zellen handelt es sich um ein humanes Kolonkarzinom, das 1964 aus dem Primärtumor einer 44 Jahre alten Frau kaukasischen Typs entnommen wurde. Der als heterotransplantabel beschriebene Tumor bildet gut differenzierte Tumore 1. Grades aus. Die adhärente, epithelartige Zelllinie wächst als Monolayer in großen Kolonien und besitzt eine Verdopplungszeit von 40 bis 60 h. Es liegt ein hypertriploider Karyotyp mit 17,5 % Polyploidie vor [von Kleist et al., 1975, DSMZ].

6.2.1.2 A431-Zellen

Die Zelllinie A431 bezeichnet ein humanes Epidermoidkarzinom der Vulva und wurde aus dem Tumor einer 85-jährigen alten Frau etabliert. Die adhärensten, epithelartigen Zellen wachsen als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von 80 bis 100 h. Charakteristisch für diese Zelllinie ist die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors. Der Karyotyp ist hypotriploid mit einer Polyploidie von 24 % [Giard et al., 1973, DSMZ].

6.2.2 Kultivierung von Monolayern

HT29-Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, ohne Natriumpyruvat, Invitrogen) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS; Penicillin-G-Natrium: 10.000 U/ml; Streptomycinsulfat: 10.000 µg/ml) kultiviert. Zur Kultivierung von A431-Zellen wird Minimum Essential Medium (MEM, Sigma) mit 10 % FKS, 4,5 g/l L-Glutamin und 1 % PS verwendet.

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Vor Zusatz des FKS zum Kulturmedium muss dieses 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert werden, um allgemein störende Einflüsse zu vermindern oder zu beseitigen (z. B. Komplementzerstörung, Fibrinfällung, etc.). Nach Hitzeinaktivierung und Aliquotierung kann das FKS bei -20 °C gelagert und bei Bedarf dem Medium zugesetzt werden.

6.2.2.1 Mediumwechsel von Monolayern

Zelllinien, die als Monolayerkulturen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37 °C im Laufe der Zeit zerfallen. Dadurch kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes (> pH 7,4) und eines Farbumschlags des Indikators Phenolrot von rot nach gelb/orange [Lindl, 2002]. Sofern sich die Zellen in einer subkonfluenten Wachstumsphase befinden, wird das verbrauchte Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und durch frisches, erwärmtes (37 °C) Zellkulturmedium ersetzt. Je nach Größe der Zellkulturflasche beträgt die Menge des Mediums 40 ml (175 cm²) bzw. 20 ml (80 cm²).

6.2.2.2 Passagieren von Monolayern

Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums werden die Zellen passagiert, d. h. die Zellen werden unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues Kulturgefäß überführt und mit frischem Medium sowie Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt [Lindl, 2002]. Da die verwendeten Zelllinien als Monolayer wachsen, müssen sie zum Passagieren zunächst vom Boden der Kulturflasche gelöst werden.

Nach Entfernen des Mediums einer Zellkulturflasche (Flaschengröße: 175 cm²) werden die Zellen mit 5 ml PBS (1x) gewaschen und mit 2,5 ml einer Trypsinlösung überschichtet, die je nach Zelllinie unterschiedlich lange einwirken muss, bevor sich der Zellrasen vom Flaschenboden lösen lässt (HT29-Zellen: 2 min; A431-Zellen: 10 min; bei 37°C, 5). Durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) wird die Trypsinlösung inaktiviert und die Zellen können durch mehrfaches Spülen in Suspension gebracht werden. Ein Teil der erhaltenen Zellsuspension wird weiterkultiviert (ca. 1 ml), während der Rest entweder in Versuchen eingesetzt oder verworfen werden kann.

10x PBS

171 mM	NaCl, pH 7,4
10 mM	Na ₂ HPO ₄
3,4 mM	KCl
1,8 mM	KH ₂ PO ₄

Trypsinlösung

0,05 g Trypsin (3,6 U/mg, Serva)

0,86 mM EDTA

mit PBS (1x) auf 100 ml auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, steril filtrieren, zu je 5 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern

6.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl beruht auf der Berücksichtigung viabler Zellen und wird mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer Zählkammer) durchgeführt. Vor Gebrauch werden Kammer und Deckglas mit 70 %-igem Ethanol gereinigt und durch Befeuchten fest aufeinander gedrückt, so dass die sogenannten Newtonringe erscheinen, die einen reproduzierbaren Abstand zwischen Kammerboden und Deckglas gewährleisten. Zur Zählung werden die Zellen abtrypsinisiert und in geeigneter Weise mit Trypanblau verdünnt. Nach sorgfältigem Resuspendieren wird die Neubauer Zählkammer durch Ansetzen der Pipette an den Rand des Deckglases mit Zellsuspension befüllt.

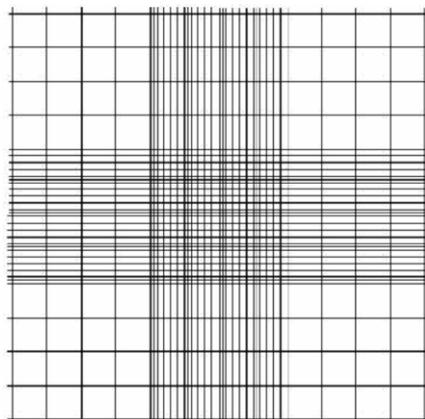


Abb. 74 Neubauer Zählkammer [Lindl, 2002]

Die Neubauer Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten, von denen jedoch nur die vier Eckquadrate ausgezählt werden (Abb. 74). Jedes Eckquadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 , was bei einer Tiefe von $0,1 \text{ mm}$ ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ ergibt (Faktor 10^4). Um zu verhindern, dass Zellen, die auf den Linien liegen, zweimal gezählt werden, berücksichtigt man nur solche Zellen, die oben und links vom Betrachter auf der Linie liegen. Durch Multiplikation des Mittelwertes der vier Eckquadrate mit dem Verdünnungsfaktor und dem Volumenfaktor (10^4) erhält man die Zellzahl/ml. Tote Zellen sind infolge ihrer Membranpermeabilität durch Trypanblau gefärbt und werden nicht mitgezählt [Lindl, 2002].

6.2.2.4 Einfrieren von Zellen

Adhärente Zellen werden abtrypsiniert und nach Vorlage von 500 µl eines DMSO-FKS-Gemisches (1:2,3) in Kryoröhrchen pipettiert (Zellsuspension 1 ml). DMSO diffundiert dabei in die Zellen und verhindert als Kryoschutzmittel sowohl die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle als auch die partielle Dehydratation des Zytoplasmas, indem es das Zellwasser ersetzt und bindet [Lindl, 2002]. Zu beachten ist, dass die eingesetzte DMSO-Konzentration (10 %) toxisch ist und somit zügig bis zum Einfrieren der Zellen gearbeitet werden muss. Die Kryoröhrchen werden zunächst bei -20 °C eingefroren, um eine kontinuierliche Einfrierrate zu gewährleisten. Nach 24 h können die Zellen bei -80 °C gelagert werden. Eine Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C bewahrt die Zellen vor Variabilität durch Subkultivierung und unterbindet zahlreiche biochemische Reaktionen [Lindl, 2002].

6.2.2.5 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen werden der Kryolagerung entnommen, zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit serumhaltigem Medium (20 % FKS) versetzt, so dass der toxische Gehalt an DMSO von 10 % auf 1 % herabgesetzt wird. Zur vollständigen DMSO-Entfernung wird die Zellsuspension bei 200xg abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Zellpellet wird in serumhaltigem Medium (zunächst 20 % FKS) aufgenommen und zur Kultivierung in eine Zellkulturflasche überführt [Lindl, 2002].

6.2.2.6 Mykoplasmentest

Bei Mykoplasmen handelt es sich um die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryonten, die in Form und Größe (zwischen 0,22 µm und 2 µm) variabel sind und die die Sterilefilter der Zellkulturflaschen ungehindert passieren können. Da ihre Wirkung auf den Stoffwechsel der befallenen Zellen vielfältig ist, müssen kontaminierte Zellen sofort aus der Kultur genommen werden [Lindl, 2002].

Mit Hilfe eines Mykoplasmentest werden die Zellkulturen daher regelmäßig auf eine Kontamination hin untersucht. Der Test wird auf einem sterilen „super-frost“ Objektträger durchgeführt, der in einer mit Medium (10 ml) gefüllten Petrischale (d=9,2 cm) liegt. Zur Kultivierung der Zellen werden drei bis vier Tropfen Zellsuspension auf dem Objektträger verteilt und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen auf dem Objektträger fixiert, indem dieser mit -20 °C kaltem Methanol gespült und für mindestens 15 min im Methanolbad bei -20 °C belassen wird.

Nach Trocknung des Objektträgers werden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI/SR101 (DAPI bindet selektiv an DNA, während Sulforhodamin (SR101) Proteine rot färbt)

betrofft und vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 380 nm, Emission: 488 nm) erscheinen aufgrund der Farbstoffkombination Zytoplasmaproteine rot und Zellkerne/DNA blau. Da Mykoplasmen zum größten Teil aus DNA bestehen, sind sie unter dem Mikroskop als gleichmäßig geformte, kleine, hell leuchtende Punkte in Inter- und Intrazellularraum zu erkennen. Im Falle einer Kontamination werden die Zellen entsorgt und neue Zellen in Kultur genommen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen waren mykoplasmenfrei.

DAPI/SR101-Lösung

0,2 M	Tris/HCl, pH 7,6
0,2 M	NaCl
8 µM	DAPI
50 µM	SR101

6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht darauf, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen als auch mit nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine reagiert. Durch Ausbildung des Protein-Farbstoff-Komplexes verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Die Bildung des Komplexes ist nach ca. 2 min abgeschlossen und bleibt über eine Stunde konstant [Bradford MM, 1976].

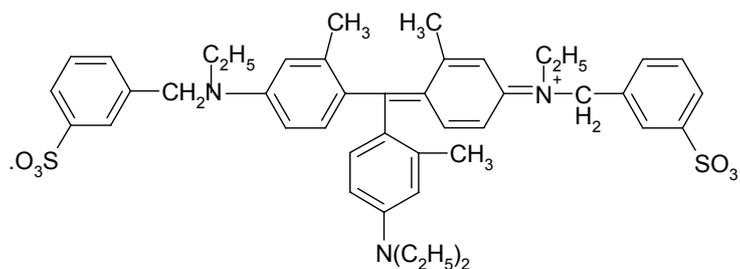


Abb. 75 Coomassie Brilliant Blau G-250

Durchführung

- je 10 µl einer BSA-Standardreihe (Konzentrationsbereich 0,2-1,2 µg/ml), der Kontrollen (Lysepuffer, H₂O_{bidest.}) sowie der verdünnten Proben in Eppendorfreaktionsgefäßen vorlegen
- in jedes Gefäß 1 ml Bradford-Reagenz geben und vortexen
- je Ansatz 4x 200 µl in eine 96 Lochplatte pipettieren und bei 595 nm im Multiplattenlesegerät vermessen

- Nach Abzug der Kontrollen kann durch lineare Regression die Proteinkonzentration anhand der Standardreihe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermittelt werden [Bradford MM, 1976].

Bradford-Reagenz

0,12 mM Coomassie Brilliant Blau G250

5 % (v/v) Ethanol p.A.

10 % (v/v) H₃PO₄ (85 %)

mit H₂O_{bidest.} auf 1 l auffüllen

Die Lösung muss mindestens vier Wochen im Dunkeln gelagert werden, bevor sie filtriert und verwendet werden kann.

6.4 Bestimmung der Proteintyrosinkinase(PTK)-Aktivität des EGFR

6.4.1 Kultivierung der Zellen

Zur Isolierung des EGFR werden 40 Petrischalen à 4x10⁶ A431-Zellen in serumhaltigem Medium (10 % FKS) ausgestreut und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 80-90 % (ca. nach 3-4 Tagen) erfolgt die Aufarbeitung der Rezeptorisolierung auf Eis.

6.4.2 Isolierung des EGFR

Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen 2x mit je 3 ml PBS gewaschen, anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für 12 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml serumhaltigem Medium (10 %) wird das Verdauungsenzym Trypsin inaktiviert und die Zellen können mit Hilfe eines Zellschabers in Suspension gebracht werden. Die Zellsuspension wird in 50 ml PP-Röhrchen gesammelt und bei 2000xg für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die erhaltenen Zellpellets in 4 ml PBS resuspendiert. Nach Vereinen der Zellsuspensionen wird erneut bei 2000xg für 8 min bei 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet gewogen, wobei das Gewicht aus 40 Petrischalen ungefähr 2 g betragen sollte. Der Überstand kann verworfen werden, während das Zellpellet in 10 ml KMP-Puffer aufgenommen wird. Durch eine Ultraschallbehandlung mit anschließender Ultrazentrifugation werden die Zellmembranen aufgebrochen und die EGFR-haltige Membran von anderen Zellbestandteilen abgetrennt. Dazu wird die Zellsuspension 3x 10 min mit dem Ultraschallstab behandelt (je 20 s Pause) und bei 15.000xg für 18 min bei 2 °C ultrazentrifugiert. Anschließend werden die Überstände auf Eis gesammelt und das Zellpellet wieder in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert. Nach dreimaliger Wiederholung von Ultraschallbehandlung und

Ultrazentrifugation kann das Pellet verworfen und die gesammelten Überstände auf eine 10 mM CaCl₂-Lösung eingestellt werden. Durch Inkubation bei RT tritt nach 15 min eine deutliche Trübung (aufgrund des Aggregierens intrazellulärer Membranbestandteile) auf. Die aggregierten Membranbestandteile werden bei 7000xg für 30 min bei 2 °C abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird halbiert und nochmals zentrifugiert (100.000xg, 60 min, 2 °C). Die Membranpellets sind für ca. 1 Jahr bei -80 °C lagerbar.

Trypsin/EDTA-Lösung

0,25 g Trypsin
0,35 g EDTA mit PBS (1x) auf 500 ml auffüllen

KMP-Puffer Stammlösung

20 mM PIPES
1 mM MgCl₂ x 6 H₂O
5 mM KCl

KMP-Puffer

10 ml KMP-Puffer-Stammlösung
0,2 mM PMSF

CaCl₂ x 2 H₂O-Lösung

1 M CaCl₂ x 2 H₂O

6.4.3 Aufreinigung des EGFR

Die Aufreinigung des Rezeptors erfolgt mittels einer Weizenkeimlektinagarose-Affinitätschromatographie und wird möglichst in einer Umgebung von 4 °C durchgeführt. Dazu wird eine Säule mit in Natriumazid (NaN₃) gelagerter Weizenkeimlektinagarose befüllt und mit ca. 400 ml NaCl äquilibriert (Durchflussrate: 0,3 ml/min), um das NaN₃, das der Agarose als Fungizid zugesetzt wurde, zu entfernen.

Zur Aufreinigung des EGFR wird eines der Membranpellets für 1 h unter Rühren auf Eis in 10 ml KMPT-Puffer gelöst. Durch Zentrifugation werden ungelöste Bestandteile bei 100.000xg für 1 h bei 2 °C abgetrennt, während der EGFR im Überstand verbleibt.

Gleichzeitig wird die Säule mit ca. 100 ml Säulenpuffer äquilibriert (Durchflussrate: 0,5 ml/min), so dass anschließend der Zentrifugationsüberstand auf die Säule gegeben werden kann. Das Eluat wird im PP-Röhrchen gesammelt und die Säule erneut beladen. Um die Proteine ausreichend an das Säulenmaterial zu binden, wird dieser Schritt noch zwei weitere Male wiederholt. Unspezifisch gebundene Zellbestandteile werden durch Spülen mit 100 ml Säulenpuffer ausgewaschen (Durchflussrate: 1 ml/min). Der EGFR wird schließlich in 0,3 M

N-Acetyl-D-Glukosamin-haltigem Säulenpuffer eluiert und in 5 Fraktionen zu je 4,5 ml abgefangen (Durchflussrate: 1 ml/min). Pro Fraktion werden 500 µl DTT-Lösung (10 mM) zugesetzt und Aliquots à 500 µl erstellt, die bei -80 °C für ca. 6 Monate gelagert werden können.

Die Säule wird über Nacht mit 1 M NaCl-Lösung und 0,02 % (w/v) NaN₃ gespült, um die Weizenkeimlektinagarose vor mikrobiellem Befall zu schützen.

DTT-Lösung

10 mM Dithiothreitol

PMSF-Stammlösung

100 mM PMSF in Isopropanol

KMPT-Puffer

10 ml KMP-Puffer-Stammlösung

100 µl Triton[®]X-100

0,2 mM PMSF

Säulenpuffer (pH 7,2)

40 mM HEPES

500 mM NaCl pH-Wert einstellen, dann erst Zugabe von

10 % (v/v) Glycerol

0,05 % (v/v) Triton[®]X-100

N-Acetylglukosamin-haltiger Säulenpuffer

9,95 g N-Acetyl-D-Glukosamin

150 ml Säulenpuffer

NaCl-Lösung

1 M NaCl

NaN₃-haltige NaCl-Lösung

0,02 % (w/v) NaN₃ in NaCl-Lösung

6.4.4 Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Substrat

Die Vertiefungen einer 96-Lochimmunoplatte (Greiner) mit hoher Proteinbindungskapazität werden über Nacht mit je 100 µl des Proteintyrosinkinasesubstrates Poly-Glutaminsäure/Tyrosin (Poly-Glu/Tyr 4:1) bei 35 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend werden die trockenen Platten dreimal mit je 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung für 5 min gewaschen, ausgeschlagen und erneut im Trockenschrank getrocknet. Die Lagerung der beschichteten Platten erfolgt trocken und im Dunkeln.

Poly (Glu, Tyr) 4:1 Lösung

0,1 mg Poly (Glu, Tyr) 4:1 in 1 ml PBS (1x)

Waschpuffer

PBS (1x) + 0,1 % Tween[®]20

Lagerung bei 4 °C

6.4.5 Bestimmung der PTK-Aktivität der EGFR-Fractionen

Die PTK-Aktivität wird in den ersten vier aufgereinigten EGFR-Fractionen bestimmt. Dazu wird je ein Aliquot dieser Fractionen mit PBS(1x)/0,1 % BSA im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 und 1:12 verdünnt. Die Durchführung erfolgt analog zu Kapitel 6.2.4.6 in einer Dreifachbestimmung. Anschließend werden die verdünnten Fractionen bei 405 nm vermessen und ausschließlich die Verdünnungen für eine EGFR-ELISA Aktivitätsuntersuchung herangezogen, deren Absorption im Bereich von 0,8 - 1,2 liegt.

6.4.6 Aktivitätsuntersuchungen der EGFR-assoziierten PTK-Aktivität (EGFR-ELISA)

Die Untersuchung der PTK-Aktivität des EGFR durch Testsubstanzen erfolgt mittels einer enzymvermittelten Immunoreaktion (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay) (Abb. 76).

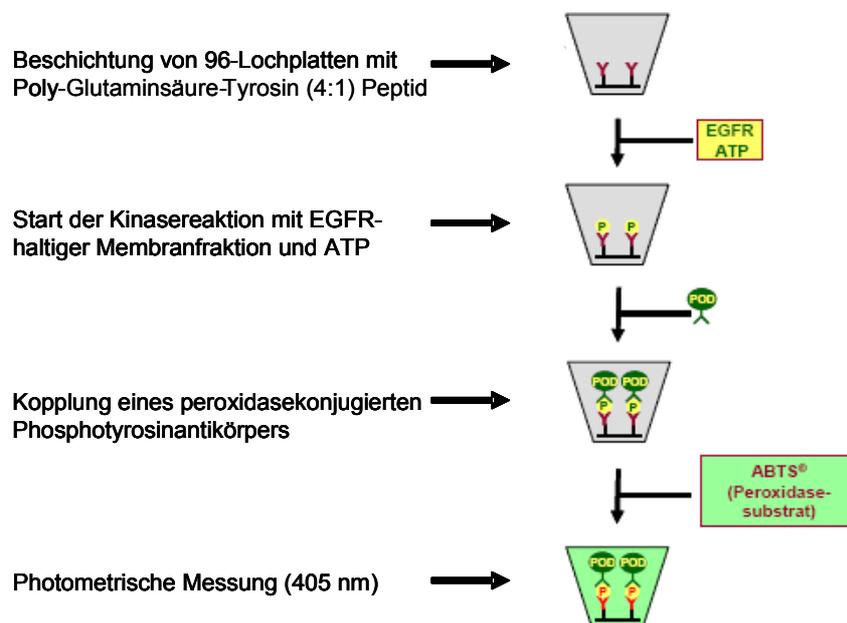


Abb. 76 Testprinzip des EGFR-ELISA

Durchführung:

- Die äußeren Vertiefungen einer 96 Lochimmunoplatte werden mit 100 µl H₂O_{bidest.} befüllt, um eine gleichmäßigere Wärmeverteilung zu gewährleisten.

- je 10 µl 10 %-ige DMSO-Lösung für den Blindwert und die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) vorlegen. Als Hemmkontrolle werden 10 µl des EGFR-Inhibitors Tyrphostin AG1478 (100 µM in 10 %-iger DMSO-Lösung) mitgeführt. Die zu untersuchenden Substanzen werden in 10 %-iger DMSO-Lösung auf die Platte pipettiert. (Abb. 77)
- Die EGFR-haltige Fraktion wird auf Eis aufgetaut und entsprechend in 1xPBS verdünnt. Je Ansatz werden 40 µl EGF-Rezeptorlösung hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert.
- Der Blindwert wird mit 50 µl H₂O_{bidest.} versetzt, während die Kinasereaktion durch Zugabe von 50 µl vortemperiertem Assaypuffer (37 °C) gestartet wird. Die Platte wird für 30 min bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert.
- Durch Entfernen des Assaypuffers und 3x Waschen mit je 200 µl Waschpuffer für 5 min wird die Reaktion abgestoppt. Die Platte muss zum Trocknen ausgeklopft werden.
- Pro Ansatz werden 75 µl Anti-Phosphotyrosinperoxidase-Lösung in PBS(1x)/1 % BSA (1/2000) hinzupipettiert.
- Nach 1 h wird die Antikörperlösung entfernt und die Platte erneut wie oben beschrieben gewaschen.
- Die Peroxidasereaktion wird durch Zugabe von 100 µl ABTS-Lösung im Dunkeln gestartet und ist durch eine peroxidasevermittelte Farbreaktion (Grünfärbung) charakterisiert. Nach max. 1 h werden die Proben bei 405 nm absorptionsphotometrisch im Mikrotiterplattenleser vermessen. Eine Hemmung der PTK-Aktivität zeigt sich durch eine schwächere Grünfärbung der Lösung im Vergleich zur Kontrolle.
- Die Auswertung der Daten erfolgt als Test over Control [T/C]-Wert in Bezug auf den Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle, der 100 % gesetzt wird. Der IC₅₀-Wert bezeichnet die Konzentration der zu untersuchenden Substanz, bei der die Wachstumsrate 50 % gegenüber der Kontrolle beträgt. Die zur Bestimmung benötigten Formeln sind im Formelverzeichnis dargestellt.

H ₂ O											
H ₂ O	BL	AG1478									H ₂ O
H ₂ O	BL	AG1478									H ₂ O
H ₂ O	BL	T									H ₂ O
H ₂ O	N	Probe									H ₂ O
H ₂ O	N	Probe									H ₂ O
H ₂ O	N	Probe									H ₂ O
H ₂ O											

Abb. 77 Pipettierschema des EGFR-ELISA. AG1478 (Tyrphostin), EGFR-spezifischer Hemmstoff; BL, Blindwert; N, Normalwert

Tyrphostin AG1478 Lösung

100 µM Tyrphostin AG1478 in 10 %-iger DMSO-Lösung

Assaypuffer (pH 7,2)

50 mM HEPES

10 mM MgCl₂ x 6 H₂O

2 mM MnCl₂ x 4 H₂O

200 µM ATP

Puffer in 5 ml Röhrchen aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Waschpuffer

PBS (1x) + 0,1 % Tween[®] 20

Lagerung bei 4 °C

Antikörperlösung

1 % (w/v) BSA

1:2000 Anti-Phosphotyrosin (PY99, Santa Cruz) in PBS (1x) lösen

ABTS[®]-Lösung

1x ABTS[®]-Tablette

5 ml ABTS[®]-Puffer (10x)

45 ml H₂O_{bidest.}

6.5 Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Zellkulturmedium

Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Konzentration im Zellkulturmedium durch Reaktion von Polyphenolen mit noch unbekanntem Mediumbestandteilen wurde das „Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit“ (Molecular Probes, Invitrogen) verwendet. Dabei reagiert H_2O_2 mit Amplex Red (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) unter Peroxidasezugabe zu dem rotfluoreszierenden Oxidationsprodukt (Resorufin) (Abb. 78).

Mit dem Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit lassen sich H_2O_2 -Konzentrationen unter 10 pmol detektieren. Allerdings sollte darauf geachtet werden, dass die H_2O_2 -Konzentration in der zu untersuchenden Lösung nicht konzentrierter als 100 μM ist, da durch überschüssiges H_2O_2 das Reaktionsprodukt zu nicht fluoreszierendem Resazurin oxidiert wird. Die Fluoreszenz nimmt mit diesem Oxidationsprodukt ab.

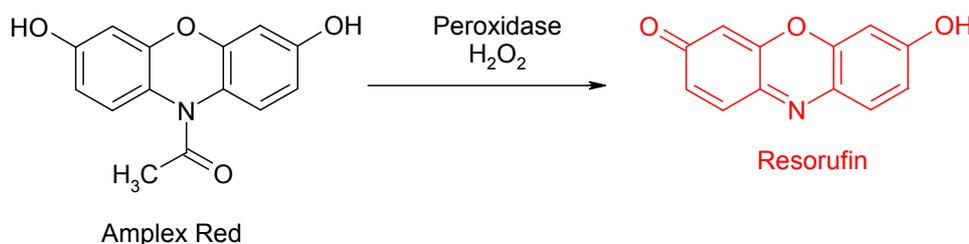


Abb. 78 Reaktion des Amplex Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) mit H_2O_2 in Gegenwart von Peroxidase zu dem rotfluoreszierenden Oxidationsprodukt Resorufin.

6.5.1 Kultivierung der Zellen

80.000 HT29-Zellen werden pro Vertiefung einer 24-Lochplatten in 1 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) ausgestreut und für 48 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

6.5.2 Durchführung

- Die eingesetzten Lösungen sind dem „Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit“ zu entnehmen.
- Die Zellen werden mit der jeweiligen Testsubstanz für 45 min in serumfreiem Medium inkubiert (entsprechend den Inkubationsbedingungen der Western Blot Analyse). Gleichzeitig werden Zellen mit Testsubstanz und Katalase (100 U/ml) behandelt, um zu beobachten, inwiefern eine H_2O_2 -Akkumulation im Zellkulturmedium durch Katalasezusatz unterdrückt werden kann. Um die Inkubationsbedingungen des SRB-Tests nachzustellen, werden die Zellen für 72 h mit Testsubstanz in serumhaltigem Medium (10 % FKS) inkubiert.

- Zum jeweiligen Endpunkt (45 min bzw. 72 h) werden jeweils 50 µl der H₂O₂ Standardreihe (Konzentrationsbereich 0,25-3 µM), der Probe (ggf. verdünnt) und des Puffers in eine 96-Lochplatte pipettiert
- Der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe von 50 µl „Working Solution“ (100 µM Amplex Red Reagenz; 0,2 Units/ml Peroxidase-Lösung; 1x Reaktionspuffer). Die 96-Lochplatte wird für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 585 nm fluoreszenzphotometrisch im Multiplattenlesegerät vermessen.
- Nach Abzug der Kontrolle (Puffer) kann durch lineare Regression die H₂O₂-Konzentration anhand der Standardreihe (ggf. unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) ermittelt werden.

6.6 Untersuchung der Wachstumshemmung (SRB-Test)

Der Sulforhodamin B (SRB)-Test ermöglicht die Bestimmung der zellwachstumshemmenden Wirkung von Testsubstanzen. Dazu werden mit Testsubstanz inkubierte Zellen mit SRB angefärbt, das unter mild sauren Bedingungen an basische Aminosäuren der Zellproteine bindet. Der Farbstoff kann unter basischen Bedingungen (pH 10) wieder herausgelöst und absorptionsphotometrisch bei 570 nm vermessen werden [Skehan et al., 1990].

6.6.1 Kultivierung der Zellen

6000 HT29-Zellen werden pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgestreut und für 48 h in 1 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank anwachsen gelassen.

6.6.2 Durchführung

- Die Zellen werden mit in DMSO gelöster Testsubstanz (DMSO-Endkonzentration: 1 %) in serumhaltigem Medium (10 % FKS) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert.
- Die Substanzreaktion wird pro Vertiefung mit 100 µl 50 %-iger Trichloressigsäure (TCA) abgestoppt und die Zellen werden 1 h bei 4 °C gelagert, wodurch noch lebende Zellen am Plattenboden fixiert werden.
- Durch vorsichtiges Waschen (4x) mit H₂O_{bidest.} werden Zellreste und überschüssiges Medium entfernt. Die Trocknung der 24-Lochplatte erfolgt bei RT über Nacht oder für 2 h bei 37 °C im Trockenschrank.
- Die Zellen werden mit 250 µl 0,4 %-iger SRB-Lösung für mindestens 30 min im Dunkeln angefärbt und anschließend 2x mit H₂O_{bidest.} sowie 2x mit 1 %-iger Essigsäure gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen.

- Nach dem Trocknen der 24-Lochplatte wird der Farbstoff SRB mit Tris-Base (pH 10) herausgelöst und absorptionsphotometrisch im Multiplattenleser bei 570 nm vermessen.
- Die Auswertung der Daten erfolgt als Test over Control [T/C]-Wert in Bezug auf den Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle, der 100 % gesetzt wird. Der IC₅₀-Wert bezeichnet die Konzentration der zu untersuchenden Substanz, bei der die Wachstumsrate 50 % gegenüber der Kontrolle beträgt. Die zur Bestimmung benötigten Formeln sind im Formelverzeichnis dargestellt.

Trichloressigsäure (TCA)

50 %-ig in H₂O_{bidest.}

Essigsäurelösung

1 %-ig in H₂O_{bidest.}

Sulforhodamin B Lösung

0,4 %-ig in Essigsäurelösung (1 %)

Tris Base (pH 10)

10 mM Tris in H₂O_{bidest.}

6.7 Untersuchung des EGFR-Phosphorylierungsstatus /-Gesamtproteingehaltes

6.7.1 Kultivierung und Inkubation der Zellen

1,2 x 10⁶ HT29-Zellen werden pro Petrischale (d = 9,2 cm) ausgestreut und für 48 h in 10 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank anwachsen gelassen. Nach 48 h erfolgt eine Serumreduktion des Medium von 10 % auf 1 % FKS für weitere 24 h, wobei die Petrischalen zuvor mit PBS gewaschen werden. Anschließend sollten die Zellen eine Konfluenz von 70 bis 80 % aufweisen. Zur Substanzinkubation werden die Zellen 45 min mit den in DMSO gelösten Proben (DMSO-Endkonzentration: 1 %) in serumfreiem Medium inkubiert. In den letzten 15 min der Substanzinkubation erfolgt Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor EGF (100 ng/ml).

6.7.2 Gewinnung der Zellproteine

- Die Petrischalen werden zu den entsprechenden Zeitpunkten dem Brutschrank entnommen, auf Eis gestellt und das Medium entfernt. Anschließend werden die Petrischalen 2x mit je 3 ml eiskaltem PBS gespült und PBS Rückstände sorgfältig abpipetiert.

- Pro Petrischale werden 200 µl RIPA Puffer aufgegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und das Zelllysate zu je 40 Hüben im vorgekühlten (4 °C) Handhomogenisator mit dem „tight“-Pistill homogenisiert. Das Zellhomogenat wird in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert.
- 10 min bei 20.000xg und 4 °C zentrifugieren
- Die Proben werden 1:10 mit H₂O_{bidest.} verdünnt und zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Der Proteingehalt der Proben wird auf 2 mg/ml mit H₂O_{bidest.} eingestellt.
- Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer (6x) gemischt und für 5 min bei 900 rpm und 95 °C im „Thermocycler“ denaturiert.

RIPA Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,4

250 mM NaCl

1 mM EDTA

1 ml Igepal

auf 100 ml mit H₂O_{bidest.} auffüllen. Lagerung bei 4 °C

erst vor Gebrauch zugeben:

1 mM Na-Orthovanadat

80 µl Protease Inhibitor Mix (Roche, 2 ml H₂O_{bidest.} /Tablette)

1 mM PMSF

10 µl Phosphatase Inhibitor Mix (Sigma)

6x SDS-Probenpuffer (100 ml), Lagerung bei 4 °C

50 ml 0,5 M Tris, pH 6,8

40 ml Glycerin

1,24 g SDS

0,16 g Bromphenolblau

erst vor Gebrauch zugeben:

5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

6.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse

Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-PAGE)

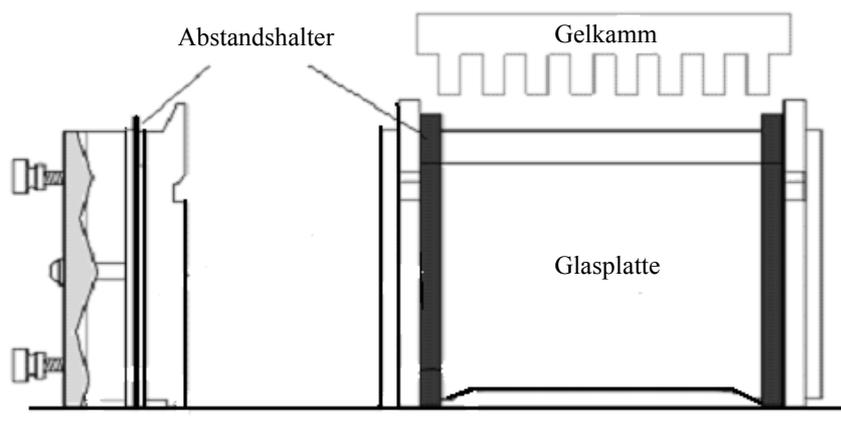


Abb. 79 Elektrophoresekammer

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels der disk. SDS-PAGE in einem vertikalen Doppelgelelektrophoresesystem der Firma Peqlab. Hierzu werden die Glasplatten und die Abstandshalter mit 70 %-igem Ethanol entfettet, entsprechend der Anleitung zusammengesetzt und in den Gießstand eingebaut (Abb. 79).

Zur Proteintrennung werden entsprechend des Molekulargewichtes Trenngel mit unterschiedlichem Polyacrylamidanteil verwendet (Tab. 14). Die in Tab. 14 aufgeführten Trenngel reichen für je ein Trenngel mit den Maßen 8,5 cm x 5,8 cm x 0,8 mm (BxHxT).

Das Trenngel wird zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und mit n-Butanol überschichtet, um eine einheitliche Gelgrenze zu erreichen und Luftsauerstoff, der die Polymerisation behindert, auszuschließen. Das Trenngel benötigt bei RT 45 min zum Auspolymerisieren oder kann über Nacht bei 4 °C gelagert werden.

Tab. 14 Pipettierschema der Trenngel. Die Rotiphoreselösung enthält Acrylamid (AA) und N, N' Methylbisacrylamid in einem Verhältnis 37,5:1. Die AA-Konzentration bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, während die Konzentration an Bisacrylamid über den Grad an Quervernetzungen entscheidet. TEMED (N, N', N', N' Tetramethyldiamin) katalysiert die Reaktion und APS (Ammoniumpersulphat) dient als Radikalstarter der Polymerisation.

Komponenten	7 %-iges AA-Trenngel	12 %-iges AA-Trenngel
H ₂ O _{bidest.}	2,54 ml	1,72 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,23 ml	1,23 ml
Rotiphoreselösung	1,15 ml	1,97 ml
SDS (10 %)	49,2 µl	49,2 µl
APS (10 %)	24,6 µl	24,6 µl
TEMED	2,46 µl	2,46 µl

Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird das n-Butanol mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und nicht polymerisierte Gelreste mit H₂O_{bidest.} beseitigt. Wasserreste wer-

den vorsichtig mit einem Papierstreifen entfernt, bevor der entfettete Kamm zur Ausbildung der Probenaschen für das Sammelgel eingesetzt wird. Das Sammelgel wird entsprechend Tab. 15 zusammenpipettiert und über das Trenngel gegeben.

Nach Auspolymerisierung des Sammelgels (ca. 30 min) wird der Kamm vorsichtig herausgezogen, die Geltaschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült und Wasserreste mittels der Wasserstrahlpumpe entfernt. Anschließend können die vorbereiteten und abgekühlten Probe aufgetragen werden (Gesamtproteingehalt pro Geltasche: 40 μg).

Tab. 15 Pipettierschema des Sammelgels. Die Rotiphoreselösung enthält Acrylamid (AA) und N, N' Methylbisacrylamid in einem Verhältnis 37,5:1. Die AA-Konzentration bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, während die Konzentration an Bisacrylamid über den Grad an Quervernetzungen entscheidet. TEMED (N, N, N', N' Tetramethylethyldiamin) katalysiert die Reaktion und APS (Ammoniumpersulphat) dient als Radikalstarter der Polymerisation.

Komponente	Sammelgel (4 %)
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	1,2 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
Rotiphoreselösung	0,25 ml
SDS (10 %)	20 μl
APS (10 %)	20 μl
TEMED	2 μl

Zur Charakterisierung des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine und zur Beobachtung der elektrophoretischen Trennung wird ein Molekulargewichtsstandard (SeeBlue Plus 2, Invitrogen) (Tab. 16).

Tab. 16 Molekulargewichtsstandard SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen) in einem Trisglycin gepuffertem System

Standard	Molekulargewicht [kDa]
Myosin	250
Phosphorylase	148
BSA	98
Glutamic Dehydrogenase	64
Alcohol Dehydrogenase	50
Carbonic Anhydrase	36
Myoglobin Red	22
Lysosome	16
Aprotinin	6
Insulin, B Chain	4

Die Geltaschen werden vorsichtig mit 1x SDS Laufpuffer überschichtet, bevor die Elektrophoresekammer bis zur Markierung mit 1x SDS Laufpuffer befüllt wird.

10x SDS Laufpuffer

2 M	Glycin
250 mM	Tris/HCl, pH 8,3
1 %	SDS

Durch Anlegen einer Spannung von 100 V wird die Gelelektrophorese gestartet. Nach dem Übergang der Proteine vom Trenn- ins Sammelgel kann die Spannung auf 140-160 V erhöht werden, um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erzielen.

6.7.4 Proteintransfer und Antikörperdetektion

Der Transfer der Proteine erfolgt mittels „semi-dry Blots“ auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu werden eine Nitrozellulosemembran und 6 Whatman-Papiere (entsprechend der Gelgröße) zugeschnitten und in 1x Blotting-Puffer bei 4 °C äquilibriert.

2x Blottingpuffer

78 mM	Glycin
96 mM	Tris
0,074 %	SDS
40 % (v/v)	Methanol

Anschließend werden die Whatman-Papiere, die Nitrozellulosemembran und das Gel in folgender Reihenfolge auf dem Elektrobloßter aufgeschichtet: Anodendeckel, 3 Whatman-Papiere, Nitrozellulosemembran, Gel, 3 Whatman-Papiere, Kathodendeckel (Abb. 80).

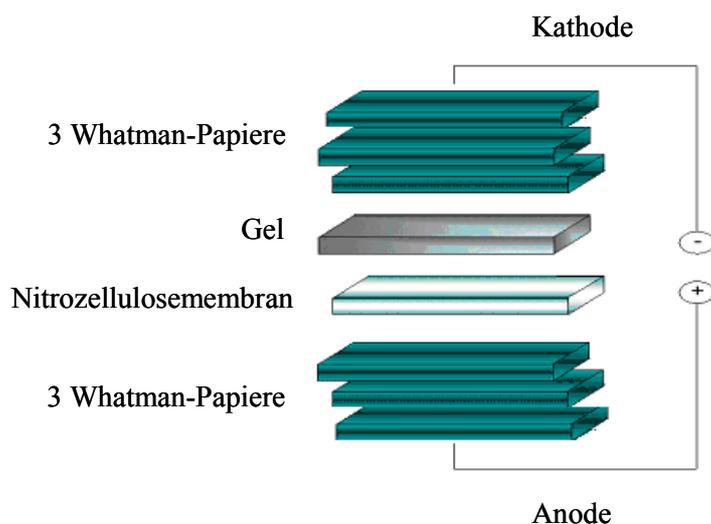


Abb. 80 Schematischer Aufbau des semidry Western Blots.

Sobald die Proteine ausreichend elektrophoretisch aufgetrennt sind, kann die Gelelektrophorese gestoppt und das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst werden. Das Gel wird kurz in

1x Blotting Puffer äquilibriert und entsprechend der Vorbereitung auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Der aufeinander geschichtete Stapel wird dann mit Hilfe einer Walze von Luftblasen befreit, die den Proteintransfer beeinträchtigen würden. Der Proteintransfer wird über 75 min bei konstanter Stromstärke von 75 mA pro Gel (8,5 cm x 5,8 cm) durchgeführt. Anschließend wird die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Milchpulverlösung (Blockierungsreagenz) gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Erstantikörper wird 1:1000 in 1x TBS (0,1 % Tween[®]20) mit 5 % (w/v) Milchpulver angesetzt und zur Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C verwendet. Im Anschluss wird die Membran 3x zu je 5 min in Waschpuffer (0,3 % Tween[®]20) geschwenkt und die Zweitantikörperlösung vorbereitet. Der HRP-konjugierte Zweitantikörper wird 1:2000 in 1xTBS (0,1 % Tween[®]20) mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt und für ca. 2 h bei RT zur Inkubation eingesetzt. Erneut folgt ein Waschen der Membran für 3x 5 min in Waschpuffer, bevor die Membran für 1 min in LumiGlo[®]-Lösung inkubiert werden kann (Abb. 81).

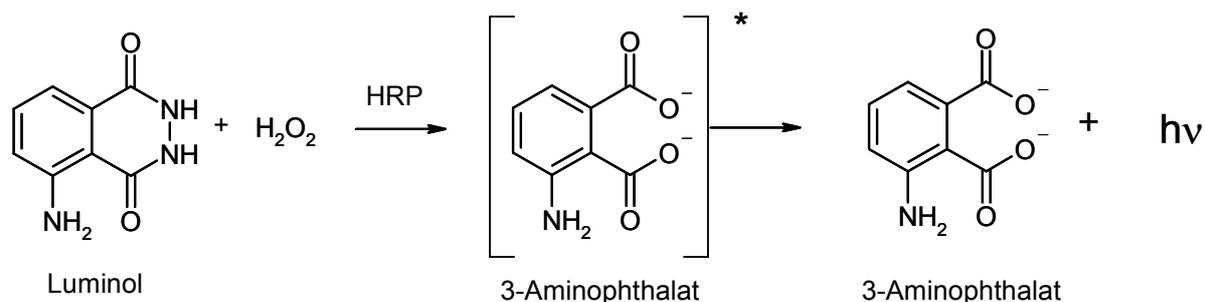


Abb. 81 Reaktion des Luminols (HRP: „horseradish“ Peroxidase; hv: Lumineszenzsignal)

Die Detektion und Auswertung erfolgen mittels der LAS3000 und der Aida Image Analyzer Software Version 3.52 (Raytest, Straubenhardt). Die Datenauswertung erfolgt als Test over Control [T/C]-Wert in Bezug auf den Wert der Lösungsmittelkontrolle, der 100 % gesetzt wird. Der IC₅₀-Wert bezeichnet die Konzentration der zu untersuchenden Substanz, bei der die Wachstumsrate 50 % gegenüber der Kontrolle beträgt. Die zur Bestimmung benötigten Formeln sind im Formelverzeichnis dargestellt. Als Beladungskontrolle wird α-Tublin mitgeführt.

Milchpulver

1x	TBS
5 %	Milchpulver
0,1 %	Tween [®] 20

20x TBS

2,6 M	NaCl
0,4 M	Tris/HCl (pH 7,6)

Waschlösung

1x	TBS
0,3 %	Tween [®] 20

Erstantikörper

Phospho EGFR (Tyr1173) Antikörper (polyklonal, Kaninchen) 1:1000 Verdünnung, 175 kDa

EGFR Antikörper (polyklonal, Kaninchen) 1:1000 Verdünnung, 175 kDa

p16^{INK4a}-Antikörper (polyklonal, Kaninchen) 1:1000 Verdünnung, 16 kDa

α -Tubulin Antikörper (monoklonal, Maus) 1:5000 Verdünnung, 52 kDa

Zweitantikörper

Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugierter Antikörper, 1:2000 Verdünnung

Anti-Maus IgG, HRP konjugierter Antikörper, 1:2000 Verdünnung

6.8 Untersuchung des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a}

6.8.1 Kultivierung und Inkubation der Zellen

1,4x10⁶ HT29-Zellen werden pro Petrischale (d = 9,2 cm) ausgestreut und für 48 h in 10 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank anwachsen gelassen. Der Apfeltresterextrakt AE03B wird in DMSO gelöst, während die Lösung des DNMT Inhibitors 5-Aza-CdR in PBS erfolgt (Lösungsmittelkonzentration: jeweils 1 %). Die Zellen sollten zu etwas 70 % konfluent sein. Die Isolierung der genomischen DNA und der zellulären Gesamt-RNA erfolgt aus einem Inkubationsansatz.

6.8.2 Isolierung der genomischen DNA und der zellulären Gesamt-RNA

Die Isolierung der genomischen DNA und der zellulären Gesamt-RNA aus einem Inkubationsansatz erfolgt mittels des AllPrep DNA/RNA-Mini Kits von Qiagen.

Die Proben werden zuerst in einem denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Puffer lysiert und homogenisiert, wobei RNasen und DNasen inaktiviert werden, um die Isolierung intakter RNA und DNA zu gewährleisten. Das Zelllysat wird auf eine AllPrep DNA-Säule pipettiert, die unter gepufferten Bedingungen die DNA binden kann. Somit werden DNA und RNA voneinander getrennt (Abb. 82). Durch anschließende Waschschrte wird die DNA aufgereinigt und letztlich in einem spezifischen Puffer eluiert. Das RNA-haltige Eluat der DNA Spinsäule wird auf eine RNA-Säule pipettiert, auf deren Membran die Gesamt-RNA bindet, während

Fremdstoffe effizient ausgewaschen werden. Die RNA wird im Anschluss in RNasefreiem Wasser eluiert. Mit dieser Methode werden alle RNA Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, und DNA-Fragmente von 30 bis 50 kb isoliert. Das Verhältnis der Absorptionswerte A260/A280 ist ein Maß für die Reinheit der isolierten RNA und DNA. Für die aufgereinigte RNA sollte der Wert in der Größenordnung von 1,9 bis 2,1 liegen und für die aufgereinigte DNA zwischen 1,7 und 1,9.

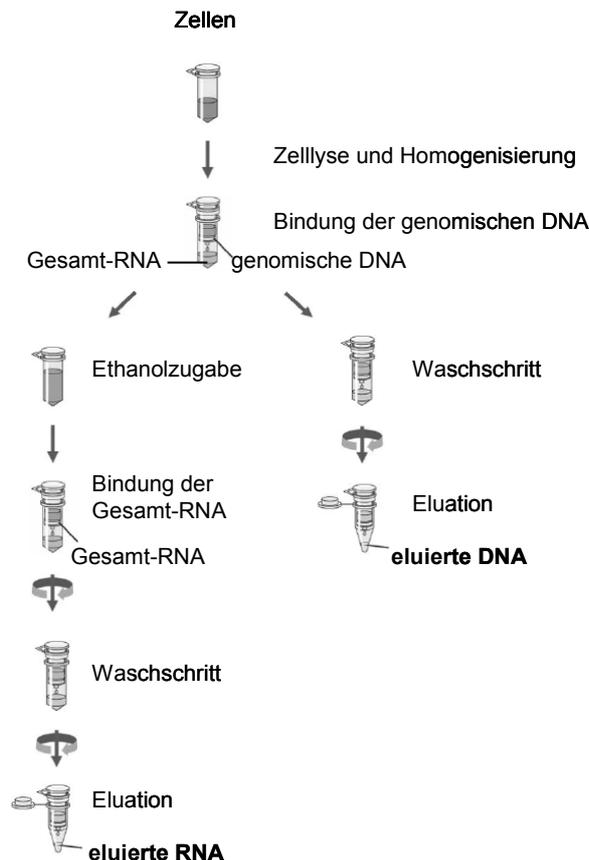


Abb. 82 Isolierung der zellulären Gesamt-RNA und der genomischen DNA mittels des AllPrep DNA/RNA Mini Kits von Qiagen [AllPrep DNA/RNA Mini Handbuch 2005, Qiagen]

Durchführung: ausschließlich mit sterilen Pipetten incl. Filtereinsatz arbeiten

- Bis auf β -Mercaptoethanol und 70 %-igen Ethanol werden alle Lösungen dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit entnommen.
- Das Medium der Petrischalen verwerfen, die Zellen 2x mit je 3 ml PBS spülen und PBS-Rückstände sorgfältig entfernen
- Pro Petrischale 600 μ l RLT Puffer (incl. 1 % β -Mercaptoethanol) hinzugegeben und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber ablösen
- Das Zellysyt in ein steriles Eppendorfgefäß überführen, resuspendieren und mittels einer 20G Nadel (5x) homogenisieren

- Das Zelllysate auf eine AllPrep DNA-Säule pipettieren, 30 s bei 10.000xg und RT zentrifugieren und die Säule in ein neues Auffanggefäß überführen (Die DNA ist auf der Membran gebunden, während sich die RNA im Zentrifugat befindet. Nachfolgend mit der Isolierung der RNA beginnen.)
- Das RNA-haltige Zentrifugat mit 600 µl 70 %-igem (v/v) Ethanol versetzen, sorgfältig resuspendieren und 700 µl der Zelllösung auf eine RNeasy-Säule pipettieren
- 30 s bei 10.000xg und RT zentrifugieren; das Zentrifugat verwerfen
- Die restliche Zelllösung auf die RNeasy-Säule pipettieren, erneut zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- RNeasy-Säule mit 700 µl RW1 Puffer waschen und 30 s, bei 10.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- RNeasy-Säule mit 500 µl RPE Puffer waschen und 30 s, bei 10.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- 500 µl RPE Puffer auf die RNeasy-Säule pipettieren, 2 min, bei 10.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- RNeasy-Säule in ein steriles Eppendorfgefäß überführen
- RNA in 50 µl RNasefreiem Wasser eluieren und 1 min, bei 16.000xg und RT zentrifugieren
 - ⇒ **isolierte RNA auf Eis lagern**
- DNA-Säule mit 500 µl AW1 Puffer und 30 s, bei 10.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- DNA-Säule mit 500 µl AW2 Puffer und 2 min, bei 16.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- DNA-Säule in ein steriles Eppendorfgefäß überführen
- DNA in 100 µl EB-Puffer eluieren und 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 10.000xg und RT zentrifugieren
 - ⇒ **isolierte DNA auf Eis lagern**
- Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgt mittels eines Spektralphotometers. Anschließend werden die DNA- und RNA-Präparationen aliquotiert und bei -80 °C gelagert (ca. ½ Jahr stabil).

6.8.3 Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus

Zur Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus wird die aufgereinigte DNA der Bisulfitbehandlung (DNA Methylation Gold Kit, Zymo Research) unterzogen. Die Bisulfittechnik stellt

eine einfache und weitverbreitete Methode zur Detektion von DNA-Modifikationen dar. Durch die katalytische Wirkung von Bisulfit (HSO_3^-) werden Einzelstrangcytosine der zuvor denaturierten DNA hydrolytisch zu Uracilen desaminiert (Abb. 83). Dabei wird das C6-Atom des Cytosins bei hoher NaHSO_3^- -Konzentrationen (3 M) und leicht sauren Bedingungen (pH 5) sulfoniert. Die Aminogruppe am C4 wird dann spontan hydrolysiert und das Bisulfitmoleküle wird unter basischen pH-Wert-Bedingungen regeneriert, so dass Uracil bestehen bleibt. Die Methode macht sich zu Nutze, dass Bisulfit die Konversion von Cytosin zu Uracil katalysiert, nicht jedoch methylierte Cytosine.

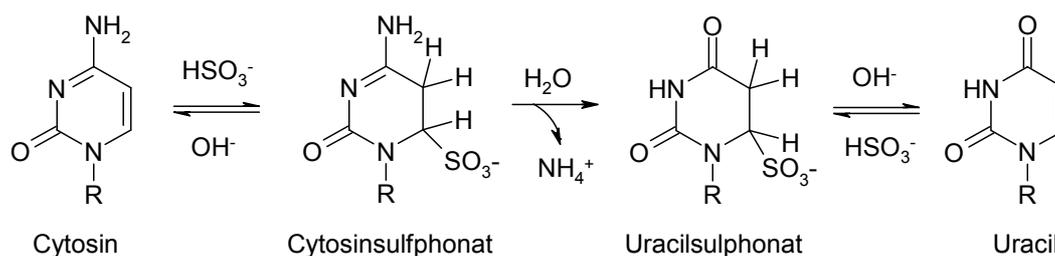


Abb. 83 Konversion von Cytosin in Uracil [Lottspeich und Zorbas]

Das verwendete DNA Methylation-Gold Kit™ von Zymo Research ermöglicht die Durchführung von DNA-Denaturierung und Bisulfitkonversion in einem Schritt.

6.8.3.1 Bisulfitbehandlung

- 1 μg der zuvor isolierten DNA in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ in einem 200 μl PCR-Gefäß vorlegen
- 130 μl CT Conversion Reagenz hinzupipettieren und vortexen
- Thermocycler:
 - 98 °C für 10 min
 - 64 °C für 2,5 h
 - Endtemperatur: 4 °C (Lagerung möglich)
- 600 μl M-Binding Puffer auf eine Zymo-Spin-IC-Säule pipettieren und Probe hinzugeben
- 30 s, bei 18.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen (Achtung: Sonderabfall)
- 200 μl M-Desulphonation Puffer auf die Säule geben und 20 min bei RT inkubieren
- 30 s, bei 18.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- 200 μl Waschpuffer auf die Säule pipettieren und 30 s bei 18.000xg und RT zentrifugieren; Zentrifugat verwerfen
- Säule in ein steriles Eppendorfgefäß überführen

- 10 µl Eluation Puffer direkt auf die Säulenmatrix geben und 1 min bei 18.000xg und RT zentrifugieren
- die bisulfitbehandelte DNA ist bei -20 °C stabil

Die bisulfitbehandelte DNA wird anschließend mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP-PCR) amplifiziert. Da die beiden DNA-Stränge nach der Bisulfitkonversion nicht mehr komplementär zueinander sind, muss jeder Strang getrennt analysiert werden. Der Amplifikationsprozess führt zu einer Transformation von U (vorher C) zu T, und von ^mC zu C (Abb. 84). Auf dem komplementären DNA-Strang des PCR-Produktes wird G (gegenüber C) zu A transformiert [Lottspeich und Zorbas].

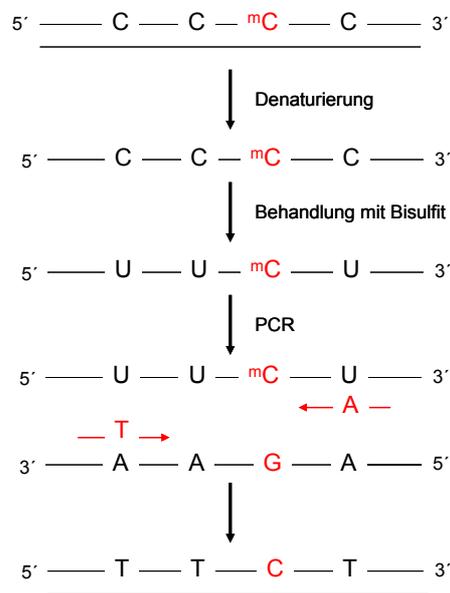


Abb. 84 Prinzip der Methylierungsanalyse durch die Bisulfitmethode (A: Adenin; C: Cytosin; ^mC: methyliertes Cytosin; G: Guanin; U: Uracil; T: Thymin) [modifiziert nach Lottspeich und Zorbas]

6.8.3.2 Methylierungsspezifische PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird verwendet, um ausgewählte DNA-Abschnitte in kurzer Zeit zu amplifizieren. Dazu werden zwei Primer (Oligonukleotide) benötigt, die jeweils mit einem der beiden Stränge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren. Zu Beginn der PCR muss die Probe 15 min erhitzt werden, um die HotStarTaq-Polymerase zu aktivieren. Den ersten der drei PCR Schritte stellt die Denaturierung dar. Dabei wird die Probe auf 95 °C erhitzt und die DNA in ihre Einzelstränge zerlegt. Während der Ansatz auf die Schmelztemperatur der Primer heruntergekühlt wird, erfolgt deren Anlagerung. Nach der Primerhybridisierung wird die Temperatur entsprechend erhöht, dass die verwendete Polymerase ihr Temperaturoptimum erreicht. Anschließend erfolgt die Verlängerung der Primer.

Diese drei Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt. Die Endtemperatur der PCR sollte auf 4 °C eingestellt werden, somit kann die PCR auch über Nacht laufen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine methylierungsspezifische PCR (MSP-PCR) in Form einer „nested“ Zweistufen-PCR nach Lee & Zhu (2005) etabliert. Dazu wurde zunächst ein DNA-Fragment der Größe von 208 bp amplifiziert (Abb. 85), das dann als Matritze zur Amplifikation der methylierten und nichtmethylierten DNA-Fragmente (81 bp) eingesetzt wurde (Abb. 85).

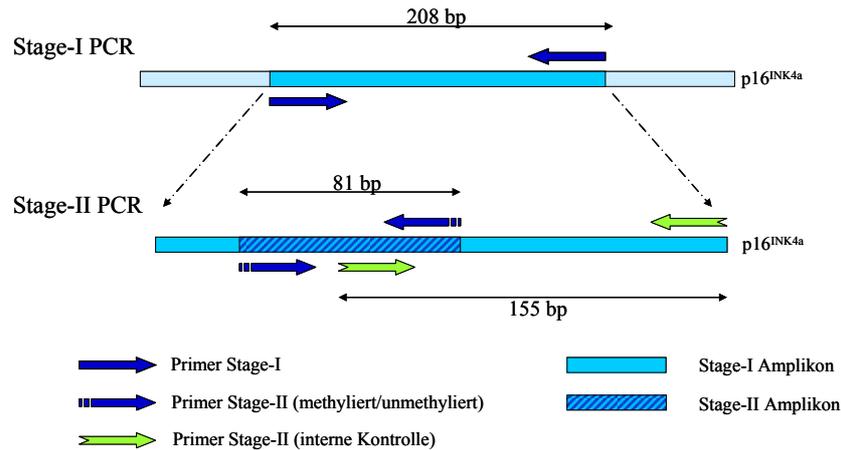


Abb. 85 Methylierungsspezifische PCR (MSP-PCR) in Form einer „nested“ Zweistufen-PCR nach Lee & Zhu (2005)

Die Methode wurde unter Berücksichtigung eines internen Kontrollfragments von 155 bp etabliert. Aufgrund der zwei PCR-Schritte wird die Produktspezifität der Reaktion deutlich gesteigert. Im Rahmen der Stage I wird noch keine Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten DNA-Fragmenten vorgenommen, so dass zwei Primer zur Amplifikation ausreichen (N forward/N reverse; Tab. 17). Für die Stage II werden spezifische Primer für methylierte, unmethylierte DNA-Fragmente und das interne Kontrollfragment benötigt (Tab. 17).

Tab. 17 Primer der Stage I und Stage II PCR (IC: interne Kontrolle; M: methyliert; N: „normal“ Stage I; U: unmethyliert) [Lee & Zhu, 2005]

Primer	
p16 ^{INK4a} N forward	GGA GAG GGG GAG AGT AGG T
p16 ^{INK4a} N/IC reverse	CTA CAA ACC CTC TAC CCA CCT
p16 ^{INK4a} IC forward	GGG GAG TAG TAT GGA GTT T
p16 ^{INK4a} M forward	CGG GGA GTA GTA TGG AGT CGG CGG C
p16 ^{INK4a} M reverse	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA
p16 ^{INK4a} U forward	TGG GGA GTA GTA TGG AGT TGG TGG T
p16 ^{INK4a} U reverse	CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A

Die Lösungen der Stage I PCR werden dem HotStarTaq® Plus PCR Kit von Qiagen entnommen, auf Eis aufgetaut, entsprechend Tab. 18 zusammenpipettiert, gevortext und in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die entsprechenden Primer sind Tab. 17 zu entnehmen. Das Temperaturprogramm der PCR ist nach Tab. 19 im Thermocycler durchzuführen. Als Positivkontrolle wird eine Wasserprobe mitgeführt, um Verunreinigungen während der PCR auszuschließen. Im Anschluss an die PCR wird ein Teil der Probe 1:100 für die Stage II verdünnt, während der restliche Teil bis zur Agarosegelelektrophorese bei -20 °C gelagert werden kann.

Tab. 18 Pipettierschema Stage I PCR

Reagenz	Ansatz [μ l]
H ₂ O _{DEPC}	15,375
10x PCR Puffer	2,5
dNTP Mix 5 mM	0,5
Primer forward 5 μ M	2,5
Primer reverse 5 μ M	2,5
HotStarTaq Polymerase	0,125
bisulfitbehandelte DNA	1,5
Σ	25,0

H₂O_{DEPC} (Diethylpyrocarbonat: starker, aber kein absoluter Inhibitor von RNasen)

0,1 % (v/v) DEPC in H₂O_{bidest.}

12 h bei 37 °C inkubieren und anschließend autoklavieren, um DEPC vollständig zu entfernen

Tab. 19 Temperaturprogramm der Stage I PCR

	Zeit	Temperatur [°C]
Aktivierung der Polymerase	15 min	95
Denaturierung	30 s	95
Primerhybridisierung	30 s	53
Elongation	30 s	72
	40 Zyklen	
abschließende Elongation	10 min	72

Das amplifizierte DNA-Fragment der Stage I wird nach Verdünnung (1:100 in H₂O_{DEPC}) in der Stage II unter Verwendung von methylierten und unmethylierten Primern eingesetzt (Tab. 17). Die entsprechenden Lösungen werden auf Eis aufgetaut, nach Tab. 20 zusammenpipettiert und die PCR gemäß dem Temperaturprogramm (Tab. 21) im Thermocycler durchgeführt.

Die amplifzierten DNA-Fragmente können bis zur Gelelektrophorese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Tab. 20 Pipettierschema der Stage II PCR

Reagenz	Ansatz [μl]
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	14,375
CoralLoad PCR Puffer	2,5
dNTP Mix 5 mM	0,5
Primer forward 5 μM	2,5
Primer reverse 5 μM	2,5
HotStarTaq Polymerase	0,125
DNA aus Stage I (1:100 verdünnt)	2,5
Σ	25,0

Tab. 21 Temperaturprogramm der Stage II PCR für methylierte* und unmethylierte* DNA-Fragmente sowie für das interne Kontrollfragment[#]

	Zeit	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]
Aktivierung der Polymerase	15 min	95
Denaturierung	30 s	95
Primerhybridisierung	30 s	62* bzw. 53 [#]
Elongation	30 s	72
26 Zyklen		
abschließende Elongation	10 min	72

6.8.3.3 Detektion der amplifzierten DNA-Fragmente

Die PCR-Produkte können durch Agarosegelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert werden. Während der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA zur Anode, wobei die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wird, da sich kleinere Moleküle schneller durch die Gelmatrix bewegen. Die Länge der PCR-Produkte kann durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zu den Proben im Gel mitläuft, bestimmt werden. Entscheidend ist, dass das Agarosegel einen Nukleinsäurefarbstoff enthält, der an die DNA bindet und im UV Licht fluoresziert (z. B. Ethidiumbromid).

Agarosegel

2 % Agarose (für DNA) in TAE Puffer (1x) unter Aufkochen lösen
auf ca. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ abkühlen, 4,5 μl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zufügen und das Gel in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Peqlab) auspolymerisieren lassen

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris, pH 8.5

57,1 l Eisessig

100 ml EDTA

auf 1 l mit H₂O_{bidest.} auffüllen

Nach dem Aushärten des Agarosegels wird das Gel mit TAE-Puffer (1x) überschichtet und die zu detektierenden Proben können aufgetragen werden. Da den amplifizierten DNA-Fragmenten der Stage I ein Farbmärker fehlt, der zur Beobachtung des Gellaufs dient, werden jeweils 15 µl der Proben mit 3 µl Ladepuffer (6x) versetzt. Als DNA-Märker wird eine DNA-Leiter von 100 bp verwendet. Dazu werden 1,5 µl der DNA-Leiter mit 8,5 µl H₂O_{DEPC} und 2 µl Ladepuffer (6x) vermischt. Die zu detektierenden DNA-Fragmente der Stage II können direkt im 2 %-igen Agarosegel aufgetragen werden, da die Proben bereits in der PCR mit einem Farbmärker (CoralLoad PCR Puffer) versehen worden sind. Bei der Auftragung sollte darauf geachtet werden, dass von allen Proben das gleiche Volumen aufgetragen wird. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V Gleichspannung für 2 bis 2,5 h. Anschließend kann das Agarosegel im UV-Licht betrachtet werden, da sich Ethidiumbromid (aus dem Agarosegel) in die DNA eingelagert hat und fluoresziert. Detektion und Auswertung erfolgen qualitativ mittels der LAS3000 mit der AIDA Image Analyser-Software Version 3.52 von Raytest.

6.8.4 Transkriptionsanalyse des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a}

Die Transkriptionsanalyse des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} erfolgt mittels quantitativer PCR der zuvor isolierten Gesamt-RNA. Die quantitative PCR (auch als „Real Time“ PCR bezeichnet) ist eine Vervielfältigungsmethode, die auf dem Prinzip der PCR beruht und die zusätzlich die Quantifizierung von RNA-Transkripten ermöglicht. Dabei finden Amplifizierung und Quantifizierung parallel statt. Die Quantifizierung wird mittels einer Fluoreszenzmessung durchgeführt, die einmal pro PCR-Zyklus die Anzahl der amplifizierten PCR-Produkte erfasst. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte quantitative PCR erfolgt mittels einer fluoreszenzmarkierten QuantiProbe von Qiagen (Abb. 86). Mit der Menge der PCR-Produkte steigt die gemessene Fluoreszenz proportional an. Die Intensität der Fluoreszenz wird über den gesamten Reaktionsverlauf in jedem Zyklus vermessen und aufgezeichnet, woraus sich eine Fluoreszenzkurve ergibt. Bei der hier durchgeführten Quantifizierung handelt es sich um eine relative Quantifizierung bezogen auf das nicht-regulierte Kontrollgen („housekeeping“ Gen) β-Aktin.

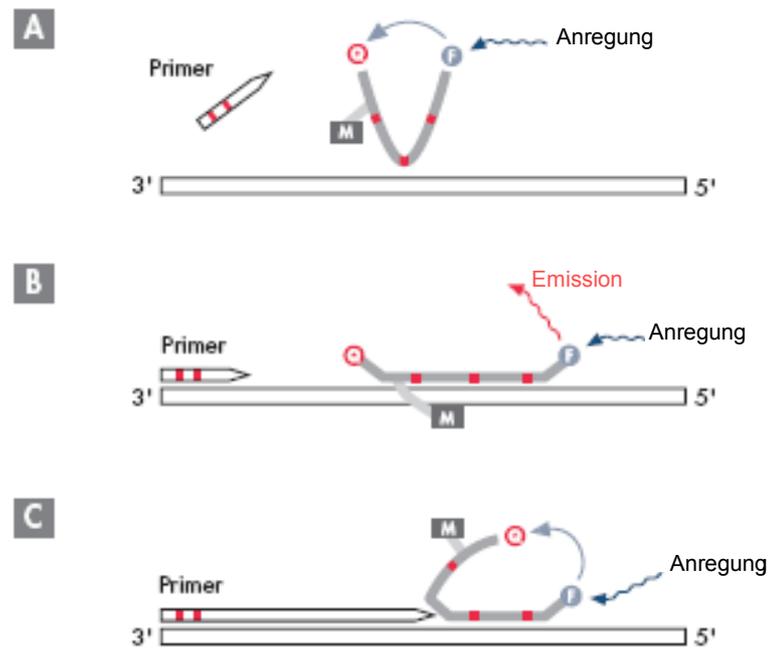


Abb. 86 Schematische Darstellung des Prinzips der QuantiProbe von Qiagen (F: Fluorophor; Q: Quencher; M: „minor-groove-binder“) [QuantiTect Probe PCR, Qiagen Handbuch, 2004]

Sofern die QuantiProbe nicht an eine Zielsequenz gebunden ist, verhindert die Nähe des Fluorophors zum Quencher ein detektierbares Fluoreszenzsignal (Abb. 86A). Während der Primerhybridisierung erfolgt die Anlagerung der QuantiProbe an die Zielsequenz der DNA über die kleine Bindungsfurche. Dieser Schritt trennt den fluoreszierenden Farbstoff und den Quencher, so dass es zu einem Fluoreszenzsignal kommt (Abb. 86B). Die Anzahl der Signale ist direkt proportional zur Menge an Zielsequenzen und kann in der „Real Time“ PCR quantitativ bestimmt werden. Im Rahmen der Elongation kommt es zur Ablösung der QuantiProbe von der Zielsequenz. Gleichzeitig nähern sich Fluorophor und Quencher wieder an, so dass die Fluoreszenz gequenchet wird (Abb. 86C).

Für die quantitative PCR muss die zelluläre Gesamt RNA, anhand derer die Gentranskription nachgewiesen werden soll, in komplementäre cDNA umgeschrieben werden, da während der PCR spezifische DNA-Polymerasen zum Einsatz kommen, die nicht in der Lage sind, die RNA zu amplifizieren. Aus diesem Grund wird eine Reverse Transkriptase (RT) – eine RNA-abhängige DNA-Polymerase – verwendet mittels derer die RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Wie auch andere DNA-Polymerasen benötigt die Reverse Transkriptase ein kurzes DNA-Stück, einen sogenannten Primer, zur Initiation der DNA-Synthese. Dazu wird ein Oligo-d(T)-Primer verwendet, der komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA ist.

6.8.4.1 Reverse Transkription

Die Umschreibung der zellulären Gesamt-RNA in komplementäre cDNA erfolgt mittels des Omniscript RT Kits von Qiagen. Dazu werden die erforderlichen Lösungen dem Kit entnommen und auf Eis aufgetaut. Für die Reverse Transkription werden 2 µg RNA in 12,3 µl H₂O_{DEPC} eingesetzt und mit 7,7 µl Master Mix versehen (Tab. 22). Das Gesamtvolumen von 20 µl enthält 100 ng/µl RNA und wird für 60 min bei 37 °C im Thermocycler (Chromo4, Bio-Rad) inkubiert. Die erhaltene cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

Tab. 22 Pipettierschema des Master Mix der Reversen Transkription

Reagenz	Ansatz [µl]
10x RT-Puffer	2
dNTP-Mix 5 mM	2
Oligo-dT-Primer 10 µM	0,5
RNase-Inhibitor 15 U/ml	0,7
Omniscript RT 4 U/ml	1
H ₂ O _{DEPC}	1,5
Σ	7,7

6.8.4.2 Quantitative PCR

Zur quantitativen PCR wird jeweils ein Master Mix für p16^{INK4a} und für das endogene Kontrollgen β -Aktin zusammenpipettiert (Tab. 23). Die durch Reaktion der RT erhaltene cDNA wird in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, sofern davon ausgegangen wird, dass die gesamte RNA während der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben worden ist. Das Temperaturprogramm der quantitativen PCR ist Tab. 24 zu entnehmen.

Tab. 23 Pipettierschema des Master Mix für p16^{INK4a} bzw. β -Aktin zur quantitativen PCR

Reagenz	Ansatz [µl]
2x QuantiTect Probe Master Mix	12,5
20x Primer Mix (p16 bzw. β -Aktin)	1,25
20x QuantiProbe Solution (p16 bzw. β -Aktin)	1,25
H ₂ O _{DEPC}	7,5
cDNA	2,5
Σ	25

Tab. 24 Temperaturprogramm der quantitativen PCR

	Zeit	Temperatur [°C]
Aktivierung der Polymerase	15 min	95
Denaturierung	15 s	94
Anlagerung	30 s	56
Verlängerung	30 s	76
40 Zyklen		

Die Quantifizierung der Transkription von p16^{INK4a} erfolgt relativ durch Bezug auf das nicht regulierte Kontrollgen β -Aktin. Als Berechnungsmodell wird die sogenannte „ $\Delta\Delta\text{CT}$ “-Methode verwendet [Laviak und Schmittgen, 2001]. Um immer zu Beginn der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurve messen zu können, wird der Ct-Wert (Threshold Cycle – Schwellenwertzyklus) verwendet, der den Zyklus beschreibt, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Über den Ct-Wert wird ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau festgelegt [Pfaffl, 2004].

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Zielgen} - \text{Ct-Kontrollgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct-Testsubstanz} - \Delta\text{Ct-Lösungsmittelkontrolle}$$

$$\text{rel. Transkriptionsänderung} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

6.9 Reagenzien und Chemikalien

ABTS [®] -Tablette	Roche
ABTS [®] -Puffer	Roche
N-Acetylglukosamin	Sigma Aldrich
Agarose Wheat Germ Lectin in 1 M NaCl	Amersham Biosciences
Adenosintriphosphat (ATP)	Alexis Biochemicals
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Bovine Serum Albumin Fraktion V	Roth
Bovine Serum Albumin Standard	Pierce
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
n-Butanol	Roth
CaCl ₂	Roth
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth
DAPI/SR101-Lösung	Partec
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth
3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure	Sigma Aldrich
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Calbiochem
Essigsäure	Roth
Glyzerol	Merck
Glycin	Roth
HEPES	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Katalase	Sigma Aldrich
LumiGLO	New England Biolabs
Magnesiumchlorid-6-Hydrat	Riedel-de Haën
β-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Fluka
Milchpulver	Roth
MnCl ₂	Roth
Natriumascorbat	Roth
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Roth

Natriumhydroxid	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Riedl-deHäen
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Alexis Biochemicals
Phosphataseinhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
PIPES (Piperazine,N,N'-bis-[2-ethansulfonsäure])	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth
Poly (Glu, Tyr) 4:1 Lösung	Sigma Aldrich
Phosphorsäure	Roth
Proteaseinhibitor Complete	Roche
Rotiphorese 30 (37,5:1), Arcylamid 30 % wässrige Lösung mit 0,8 % N, N'-Methylenbisacrylamid	Roth
Salzsäure	Roth
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Roth
See Blue Plus 2 Marker	Invitrogen
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure	Roth
Tris	Roth
Triton®X-100	Roth
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich
Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/mg)	Serva
Tween®20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Roth
Wasserstoffperoxid (30 %-ig)	Sigma Aldrich

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren vorrätig und können über die Firmen Roth, Merk oder Sigma Aldrich bestellt werden.

Steriler Zellkulturbedarf wurde über die Firmen Invitrogen/Gibco, Sigma Aldrich, Greiner, Nunc und Sarstedt bezogen.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verbrauchsmaterialien waren über die Firmen VWR, Sarstedt, Nunc, Greiner und Roth erhältlich.

6.10 Eingesetzte Substanzen und Inhibitoren

Apfelsaftextrakte AE02, AE04, AE05	Prof. H. Dietrich [*]
Apfelsaftextrakte, sortenrein (Bohnapfel, Gehrsrambur, Haux, Seestermüher)	Prof. H. Dietrich [*]
Apfeltresterextrakt AE03B	Prof. H. Dietrich [*]
5-Aza-2'-desoxycytidin	Sigma Aldrich
Castalagin	Prof. T. Hofmann [#]
Delphinidin	Extrasynthese
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	Sigma Aldrich
Eichenholzextrakt	Prof. T. Hofmann [#]
Ellagsäure	Sigma Aldrich
Fraktionen aller Art	Prof. P. Schreier [§]
Gallussäure	Sigma Aldrich
Grandinin	Prof T. Hofmann [#]
3-Hydroxyphloridzin	Prof. P. Schreier [§]
Phloretin	Roth
Phloridzin (Phloretin-2-glykosid)	Roth
Phloretin-2-xyloglukosid	Prof. P. Schreier [§]
Procyanidindimer PB1-PB4	Prof. P. Winterhalter [§]
Procyanidintrimer PC1	Prof. P. Winterhalter [§]
Procyanidintetramer PA2	Prof. P. Winterhalter [§]
Quercetin	Sigma Aldrich
Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	Extrasynthese
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	Extrasynthese
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	Extrasynthese
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	Extrasynthese
Tyrphostin AG1478	Sigma Aldrich

(*Forschungsanstalt Geisenheim; #TU München, §Universität Würzburg, §Universität Braunschweig)

6.11 PCR-Bedarf

All Prep DNA/RNA Mini Kit	80204	Qiagen
Amplex [®] Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase-Assay Kit	A 22188	Molecular Probes [™] /Invitrogen
DNA Ladder Plus, Gene Ruler	100 bp	Fermentas
EZ DNA Methylation Gold Kit [™]	D 5005	Zymo Research

Filterspitzen		Sarstedt
Hot Star Taq [®] Plus DNA Polymerase	203605	Qiagen
Loading Dye Solution (6x)		Fermentas
Omniscript [®] RT Kit	205113	Qiagen
QuantiTect [®] Probe	204343	Qiagen
RNase Inhibitor	129919	Qiagen
Sämtliche PCR Master Mix Lösungen		Qiagen
Primer		MWG Biotech

6.12 Antikörper

Anti EGFR (polyklonal)		New England Biolabs
Anti phospo EGFR (polyklonal)		New England Biolabs
Anti- α -Tubulin (monoklonal)		Santa Cruz
Anti-mouse IgG HRP-konjugiert		Santa Cruz
Anti-rabbit IgG HRP-konjugiert		New England Biolabs

6.13 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Autoklav	Systec 5075 EL	Systec
Biofreezer		New Brunswick Scientific
Brutschrank	Heracell	Heraeus
Brutschrank	CB210	Binder
Continous Fluorescence Detector	Chromo 4	MJ Research/BioRad
Electrophoresis Power Supply	Consort E835, Consort EV231	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektroblotter	Perfect Blue „Semidry“	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektrophoresekammer	Perfect Blue, vertikale Doppelgelsysteme (Twin S + M) / horizontale Gelsysteme (Mini S + M + L)	Peqlab Biotechnologie GmbH
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss
Geldokumentationsgerät	LAS 3000 Fuji	Raytest Fuji
Hand-/Glashomogenisator		Wheaton

Heizplatte	CH100	Peqlab Biotechnologie GmbH
Kühl-/Gefrierschränke	Premium/Comfort	Liebherr
Magnetrührer/Heizplatte	IKA RH basic 2	IKA-Werke GmbH & CoKG
Magnetrührer	HI 300N	Hanna Instruments
Mikroplattenleser	Genios	Tecan
Mikroplattenleser	Victor ³ V	Perkin Elmer
Mikroskop	Axiovert 40 C	Zeiss
MSI Minishaker		IKA-Werke GmbH & CoKG
Neubauer Zählkammer		Marienfeld
Pipettus	Pipettus Akkus	Hirschmann Laborgeräte
Power Station	Consort E835	Consort
Überkopfschüttler	Roto-Shake	Peqlab Biotechnologie GmbH
Vortex	Vortex-Genie 2	Peqlab Biotechnologie GmbH
Peltier Thermal Cycler	PTC-200	MJ Research
pH Meter	pH211/Microprocessor	Hanna Instruments
Spektralphotometer	Nanodrop	Peqlab Biotechnologie GmbH
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus Instruments
Sterilwerkbank	KR-130 BW	Kojair, Axon
Thermocycler	Thriller	Peqlab Biotechnologie GmbH
Trockenschrank	Heraeus	Memmert
Ultrazentrifuge	Centrikon t-1080	Kontron Instruments
Ultraschallstab	Sonifier 450	Branson
Vakuumsaugpumpe	Laborport	KNF Neuberger
Wasserbad		Memmert
Waage (Analysenwaage)	CP 124 S	Sartorius
Waage (Grobwaage)	1574 MP8-2	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus

7 Literaturverzeichnis

- Adams** RL (1995) Eukaryotic DNA-Methyltransferases-structure and function. *Bioassays*. 17(2), 139-145
- Ader** P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S (1996) Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp. Physiol.* 81, 943-955
- Agarwal** C, Tyagi A, Agarwal R (2006) Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induction apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells.
- Aherne** SA, O'Brien NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18(1), 75-81
- Antequera** F, Bird A (1993) CpG islands. *Exs.* 64, 169-185
- Arts** K, Hollman P, Mesquita H, Feskens E, Kromhout D (2001) Dietary catechins and epithelial cancer incidence: Zutphen Elderly Study. *Int. J. Cancer*. 92, 298-302
- Arteaga** CL (2003) ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Experimental Cell Research*. 284, 122-130
- Aura** AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä 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(6), 1725-1730
- Austin** CA, Patel S, Ono K, Nakane H; Fisher LM (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem. J.* 15, 883-889
- Autenrieth** IB (2003) Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *J. Gastrointest. Hepatol. Erkr.* 1, 14-17
- 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*. 48, 5496-5500
- Barth** SW, Faehndrich 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, 1414-1421
- Barth** SW, Faehndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K (2007) Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon cancerogenesis. *J. Agric. Food Chem*. 55, 1181-1187
- Bastow** KF, Bori ID, Fukushima Y, Kashiwada Y, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I, Lee KH (1993) Inhibition of DNA topoisomerases by sanguin H-6, a cytotoxic dimeric ellagitannin from *Sanguisorba officinalis*. *Planta Med.* 59, 240-245
- Balavenkatraman** KK, Jandt E, Friedrich K, Kautenburger T, Pool-Zobel BL, Ostman A, Böhmer FD (2006) DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene* 12, 25(47), 6319-6324
- Baylin** SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alteration in DNA methylation: a fundamental spect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 72, 141-196
- Belitz** HD und Grosch W, Schieberle P (2001) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer Verlag
- Ben-Levy** R, Peles E, Goldman-Micheal R, Yarden Y (1992) An oncogenic point mutation confers high affinity ligand binding to the neu receptor. Implications for the generation of site heterogeneity. *Journal of biological chemistry*, 267, 17304-17313
- Bhatia** N, Agarwal C, Agarwal R (2001) Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signalling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr. Cancer*, 39, 292-299
- Bird** AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-213
- Block** G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18, 1-29

- Blaut M, Schoefer L, Braune A (2003)** Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int. J. Vitam Nutr. Res.* 73(2), 79-87
- Blust Volker, Diplomarbeit (2008)** Einfluss von Polyphenolen auf das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}. Universität Karlsruhe
- Bock C, Paulsen M, Tierling S, Mikeska T, Lengauer T, Walter J (2006)** CpG islands methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequences, repeats, and predicted DNA structure, *PLoS Genetics*
- Boettler Ute, Diplomarbeit (2006)** Apfelinhaltsstoffe als Hemmstoffe des Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweges. Universität Karlsruhe
- Boegenrieder T, Landthaler M, Stolz M (1998)** p16^{INK4a}/MTS1/CDKN2 – das „Melanomgen“? Stand der Forschung und Ausblick. *Hautarzt*, 49, 91-100
- Boerner JL, Danielsen A, Maihle NJ (2003)** Ligand-independent oncogenic signalling by the epidermal growth factor receptor: V-ErbB as a paradigm. *Experimental Cell Research*, 284, 111-121
- Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P (1995)** The epidermal growth factor. *Cell Biol. Int.* 19, 413-430
- Borges G, Roowi S, Rouanet J, Duthie GG, Lean MEJ, Crozier A. (2007)** The bioavailability of raspberry anthocyanidins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 714-72
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990)** Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.* 186, 343-354
- Bors W, Michel C (1999)** Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: Pulse radiolysis studies. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1413-1426
- Boyer J, Liu RH (2004a)** Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(5)
- Boyer J, Brown D, Liu RH (2004b)** Uptake of quercetin and quercetin3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7171-7179
- 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. *Nutrition Journal*, 4(1)
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254
- Braune A, Gütschow M, Engst W, Blaut M (2001)** Degradation of quercetin und luteolin by *Eubacterium ramulus*. 67(12), 5558-5567
- Braune A, Engst W, Blaut M (2005)** Degradation of neohesperidin dihydrochalcone by human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 53(5), 1782-1790
- Briviba K, Stracke BA, Rüfer CE, Watzl B, Weibel FP, Bub A (2007)** Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7716-7721
- Burden S, Yarden Y (1997)** Neuregulins and their receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron.* 18, 847-855
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003)** An open-and-shut case? Recent insights into the activation EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell*, 12, 541-552
- Cadena DL, Chan CL, Gill CN (1994)** The intracellular tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor undergoes a conformational change upon autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 1(7), 260-265
- Cadiah E, Varea S, Munoz L, Fernández de Simón B, Garcia-Vallejo MC (2001)** Evolution of ellagitannins in Spanish, French, American oak woods natural seasoning and toasting. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3677-3684
- Cantley LC (2002)** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657
- Cappell MS (2007)** From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 53(4), 351-373
- Carpenter G, King L (Jr), Cohen S (1978)** Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, 276, 409-410

- Castelluccio** C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice EC (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* 368, 188-192
- Chen** RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature (Lond)*, 395, 89-93
- Cheng** X (1995) Structure and function of DNA methylation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 24, 293-318
- Citri** A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Mol. Cell Biol.* 7, 505-515
- Clifford** MN, Scalbert A. (2000) Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1118-1125
- Constantinou** A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* 58, 217-225
- Costello** JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific pattern. *Nat. Genet.* 24, 132-138
- Costello** JF, Plass C (2001) Methylation matters. *J Med Genet.* 38 (5), 285-303
- Castonguay** A, Glai HU, Perchellet EM, Gao XM, Boukharta M, Jalbert G (1997) Antitumorogenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins and oligomeric anthocyanin and procyanidin. *Int. J. Oncol.* 10, 367-373
- Cross** SH, Bird AP (1995) CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 309-314
- Dawson** JP, Berger MB, Lin CC, Schlessner J, Lemmon MA, Ferguson K (2005) Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), 7734-7742
- 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 H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 584-588
- Da Silva** EL, Abdalla DS, Terao J (2000) Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. *IUBMB Life.* 49(4), 289-295
- Davis** RJ (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 459-467
- Day** AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G (2003) Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phloridzin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* 65(7), 1199-206
- Day** AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effects on biological activity. *Free Radic. Biol. Med.* 29(12), 1234-1243
- Day** AJ, Williamson G (2001) Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr.* S105-S110
- Day** AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 436(1), 71-75
- Déprez** 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, 957-967
- De Smet** C, Lurquin C, Lethe B, Martelange B, Boon T (1999) DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*, 19, 7327-7335
- Devipriya** N, Srinivasan M, Sudheer A.R, Menon VP (2007) Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. *Singapore Med. J.* 48, 311-318
- DeYulia** GJ, Cárcamo JM (2005) EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases. *Biochem. Biophysical. Res. Com.* 334, 38-42
- Dixon** RA, Xie DY, Sharma SB (2005) Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165(1), 9-28

- Donovan** JL, Manach C, Rios L, Morand C, Besson C, Scalbert A., Rémésy C (2002) Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. *Br. J. Nutr.* 87, 299–306
- Doré** J, Sghir G, Hannequart-Gramet G, Corthier G, Pochart P (1998) Design and validation of 16S rRNA-target oligonucleotide probe for specific detection and quantification of human faecal bacteriodes population. *System. Appl. Microbiol.* 21, 65-71
- DSMZ**, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, www.dsmz.de
- Eberhardt** MV, Lee CY, Liu RH (2000) Antioxidant activity of fresh apples, *Nature*, 405, 903-904
- Ekstrand** AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4309-4313
- Enomoto** T, Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Dake Y (2006) Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: a randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study. 16(5), 283-289
- Erlund** I, Alfthan G, Mäenpää J, Aro A (2001) Tea and coronary heart disease: the flavonoid quercetin is more bioavailable from rutin in women than in men. *Arch. Intern. Med.* 161(15), 1919-1920
- Erlund** I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Pertunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. 56(8), 545-553
- Espin** JC, Gonzalez-barrio R, Cerda B, Lopez-Bote C, Rey AI, Tomas-Barberan FA (2007) Iberian pig as model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J. Agric. Food Chem.* 55(25), 10476-10485
- Esselen** M, Skrebek S, Rüfer C, Marko D (2008) Hydrogen peroxide affects the stability and the growth inhibitory properties of quercetin and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid under in vitro conditions. *Mol. Nutr. Food Res.* (submitted)
- Esteller** M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol*, 196, 1-7
- Esteller** M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG (2000) Hypermethylation-associated inactivation of p14 ARF is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 60, 129-133
- 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.* 392, 417-423
- Fang** M, Chen D, Yang CS (2007) Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr.* 137(1), 223S-228S
- Faria** A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N (2006) Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2392-2397
- Fatemi** M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2002) Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA. *Eur J Biochem.* 269, 4981-4984
- Feskanich** D, Ziegler R, Michaud D, Giovannucci E, Speizer F, Willett W, Colditz G (2000) Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1812-1823
- Fini** L, Selgrad M, Fogliano V, Graziani G, Romano M, Hotchkiss E, Daoud YA, De Vol EB, Boland CR, Ricciardiello L (2007) Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr.* 137(12), 2622-2628
- Fleischhut** J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE (2006) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr.*, 45, 7-18
- Fridrich** D, Kern M, Pahlke G, Volz N, Will F, Dietrich H, Marko D (2007a) Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 51(5), 594-601
- Fridrich** D, Kern M, Fritz J, Pahlke G, Köhler N, Winterhalter P, Marko D (2007b) The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Mol Nutr Food Res.* 51, 192-200

- Fridrich D**, Fritz J, Esselen M, Pahlke G, Hofmann T, Marko D (2008a) Ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *J Agric Food*, 56(9), 3010-3015
- Fridrich D**, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D (2008b) Different activity profile of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of EGFR and ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol Nutr Food Res*. 52(7), 815-822
- Fritz Jessica**, Dissertation (2008) Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen und der DNA-Integrität durch Polyphenole aus Beerenfrüchten, TU Kaiserslautern
- Fry DW** (2003) Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Experimental Cell Research*, 284, 131-139
- 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(1), 52-57
- Garrett TP**, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz CO, 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, 763-773
- Gazit A**, Yaish P, Gilon C, Levitzki A (1989) Tyrophostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 32, 2344-2352
- Gazit A**, Osherov N, Posner I, Yaish P, Poradosu E, Gilon C, Levitzki A (1991) Tyrophostins II. Heterocyclic and alpha-substitutedbenzylidenemalononitrile tyrophostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J. Med. Chem.*, 34, 1896-1907
- Gerhäuser C** (2001) Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe. *Aktuel. Ernähr. Med.* 26, 137-143
- Giard DH**, Aaronson SA, Todaro GH, 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(5), 1417-1423
- Glabasnia A.**, Hofmann T (2006) Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba L.*) and European Oak Wood (*Quercus robur L.*) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3380-3390
- Glabasnia A.**, Hofmann T (2007) Identification and sensory evaluation of dehydro- and deoxy-ellagitannins formed upon toasting of oak wood (*Quercus alba L.*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 4109-4118
- Glade MJ** (1999) Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. *Am. Inst. Cancer Res./World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research 1997. Nutrition*, 15, 523-526
- Goffin J**, Eisenhauer E (2002) DNA-Methyltransferase inhibitors – state of the art. *Annals of Oncology* 13, 1699-1716
- Gokmen V**, Vorneman Z, Nijhuis HH (1998) Improved ultrafiltration for color reduction and stabilization of apple juice. *J. Food Sci.* 63, 504-507
- Gonzalez-Zulueta M**, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. (1995) Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 55(20), 4531-4535
- Gossé 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, 1291-1295
- Gossé F**, Roussi S, Guyot S, Schoenfelder A, Mann A, Bergerat JP, Seiler N, Raul F (2006) Potentiation of apple procyanidin-triggered apoptosis by the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 in human colon cancer-derived metastatic cells. *Int. J. Oncol.* 29, 423-428
- Harvard Reports on Cancer Prevention Volume I: Human causes of cancer – “Cancer causes and control”**, 1996, 7: Supplement 1
- Habermeyer M**, Fritz J, Barthelmes HU, Christensen MO, Larsen MK, Boege F, Marko D (2005) Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerasen I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1395-1404
- Hagemann C**, Rapp UR (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.* 253, 34-46

- Harborne** JB, Williamson CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481-505
- Harbour** JW, Dean DC (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 1393-2409
- Haslam** E (1977) Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. *Phytochemistry*, 16, 1625-1640
- Hartmann** W (2003) *Farbatlas alter Obstsorten*, 2. Auflage, Ulmer Verlag
- He** X, Liu RH (2007) Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4366-4370
- Heichman** KA, Roberts JM (1994) Rules to replicate by. *Cell*, 79, 557-562
- Herbst** RS (2002) Targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 16, 19-24
- Herman** JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9821-9826
- Hertog** MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993) Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer.* 22(2), 175-184
- Hertog** MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1994) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 342(8878), 1007-1011
- Hibasami** H, Shohji T, Shibuya I, Higo K, Kanda T (2004) Induction of apoptosis by three types procyanidin isolated from apple (*Rosaceae Malus Pumila*) in human stomach cancer KATO III cells. *Int. J. Mol. Med.* 13, 795-799
- Hibi** K, Taguchi M, Nakayama H, Takase T, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A (2001) Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 7, 3135-3138
- Hilger** RA, Scheulen ME, Strumberg (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*, 25, 511-518
- Hirama** T, Koeffler HP (1995) Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*, 86, 841-854
- Hirai** H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2672-2681
- Hofmann** T, Glabasnia A, Schwarz B, Wisman KN, Gangwer KA., Hagerman A.E (2006) Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9503-9509
- Hollman** P, Katan M (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 51, 305-310
- Hollman** PC, Katan MB (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol.* 37(9-10), 937-942
- Hollman** PC, Katan MB (1999) Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res.* S75-80.
- Hsu** CL, Lo WH, Yen GC (2007) Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.* 55(18), 7359-7365
- Huang** YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH (1999) Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br. J. Pharmacol.* 128, 999-1010
- Huang** HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 2927-2935
- Iwamoto** R, Mekada E (2006) ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Structure and Function.* 31, 1-14
- Jacob** LM (1997) Granatapfel: Prävention und adjuvante Ernährungstherapie bei Krebserkrankungen. *EHK*, 56, 464-473

- Jeltsch A** (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA-Methyltransferases. *Chembiochem.* 3, 274-293
- Jo JY, Gonzalez de Mejia E, Lila MA** (2005) Effects of grape cell culture extracts on human topoisomerase II catalytic activity and characterization of active fractions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2489-2498
- Jones PA, Gonzalgo ML** (1997) Altered DNA methylatin and genome instability: a new pathway to cancer? *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2103-2105
- Jorisson NR, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW** (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research.* 284, 31-53.
- Kahle K, Kraus M, Richling E** (2005a) Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 797-806
- Kahle K, Kraus M, Scheppach W, Richling E** (2005b) Colonic availability of apple polyphenols – A study in ileostomy subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 1143-1150
- Kahle K, Kraus M, Scheppach W, Ackermann M, Ridder F, Richling E** (2006) Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 418-423
- Kahle K, Hümmer W, Kempf M, Scheppach W, Erk T, Richling E** (2007) Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J. Agric. Food Chem.* 55(26), 10605-10614
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH** (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440
- Kamimura A., Takahashi T, Morohashi M, Takano Y** (2006) Procyanidin oligomers counteract TGF-beta1- and TGF-beta2-induced apoptosis in hair epithelial cells: an insight into their mechanisms. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2006, 19, 259-265
- Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderl S, Issa JP, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Andreeff M, Keating M, Talpaz M** (2003) Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 98, 522-528
- Kapoor A, Agius F, Zhu JK** (2005) .Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett.* 579(26), 5889-5898
- Karoui M, Tresallet C, Brouquet A, Radvanyi H, Penna C** (2007) Colorectal carcinogenesis. 2. Underlying epigenetic and genetic alterations and molecular classification of colorectal cancers. *J Chir (Paris).* 144(2), 97-104
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y** (1996) ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: Implications for breast cancer. *EMBO J.* 15, 254-264
- Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H** (2000) action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro an in a rat carcinogenesis model. *Food Chem. Toxicol.* 38, 467-471
- Kashiwada Y, Nonaka GI, Nishioka I, Lee KJ, Bori I, Fukushima Y, Bastow KF, Lee KH.** Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro. *J. Pharm. Sci.* 1993, 82, 487-492
- Kenny TP, Kenn CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME** (2004) Cocoa procyanidins inhibit proliferation and angiogenic signals in human dermal microvascular endothelial cells following stimulation by low-level H₂O₂. *Exp. Biol. Med.* 229, 765-771
- Kepler K, Humpf HU** (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem.* 12, 5195-5205
- Kern Melanie,** Dissertation (2006) Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen Kolonkarzinomzellen. TU Kaiserslautern
- 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, 317-328
- Kern M, Pahlke G, Ngiewih Y, Marko D** (2006) Modulation of key elements of the wnt pathway by apple polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7041-7046

- Kern M, Pahlke G, Balavenkatraman KK, Böhmer F, Marko D (2007a)** Apple polyphenols affect protein kinase c activity and the onset apoptosis in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4999-5006
- Kern M, Fridrich D, Reichert J, Skrbek S, Nussler A, Hofem A, Vatter S, Pahlke G, Rüfer C, Marko D (2007b)** Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(9), 1163-1172
- Kleist von S, Chany E, Burtin P, King M and Fogh J (1975)** Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst.* 55(3), 555-560
- Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Heliövara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A (1997)** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* 146, 223-230
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J (1996)** Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 312(7029), 478-481
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002)** Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 76(3), 560-568
- Kono Y, Shibata H, Kodama Y, Sawa Y (1995)** The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochem. J.* 312, 947-953
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G (2004)** How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 15-21
- Kuhnle G, Spencer JPE, Schroeter H, Shenoy B, Debnam ES, Srai SKS, Rios-Evans C, Hahn U (2000)** Epicatechin and Catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 507-512
- Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J, Von Weyhern C, Reiter R, Feith M, Stein HJ, Siewert JR, Höfler H, Sarbia M (2006)** Prognostic significance of expression patterns of c-erbB2, p53, p16^{INK4A}, P27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study.
- Lapidot T, Walker, MD, Kanner J (2002)** Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem.* 3156-3160
- Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM (1994)** Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 48, 487-494
- Lee WJ, Zhu BT (2006)** Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis.* 27(2), 269-77
- Lee KW, Hur HJ, Lee HJ, Lee CY (2005)** Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem.* 53, 1990-1995
- 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, 1615-1627
- Lee NY, Hazlett TL, Koland JG (2006)** Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain. 15, 1142-1152
- Lee NY, Koland JG (2005)** Conformational changes accompany phosphorylation of the epidermal growth factor receptor C-terminal domain. 14, 2793-2803
- Lee S, Hyeon JL, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH (2003)** Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *American Journal of Pathology,* 163, 1371-1378
- LeMarchand, Murphy S, Hankin J, Wilkens L, Kolonel L (2000)** Intake of flavonoids and lung cancer. *Natl. Cancer Inst.* 92, 154-160
- Lesche R, Eckhardt F (2007)** DNA methylation markers: a versatile diagnostic tool for routine clinical use. *Curr Opin Mol Ther.* 9(3), 222-230
- Liang YC, Lina-Shiau SY, Chen CF, Lin JK (1997)**
- Lin SS, Hung CF, Ho CC, Liu YH, Ho HC, Chung JG (2000)** Effects of ellagic acid by oral administration on N-acetylation and metabolism of 2-aminofluorene in rat brain tissues. *Neurochem. Res.* 25, 1503-1508
- Lindl T (2002),** Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählter Methoden und Anwendungen, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage

- Liu RH, Liu J, Chen B (2005)** Apples prevent mammary tumors in rats. *J. Agric. Food Chem.* 53(6), 2341-2343
- Liu R, Sun J (2003a)** Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1718-1723
- Liu RH (2003b)** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 517S-520S
- Long LH, Clement MV, Halliwell (2002)** Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate
- López-Lázaro M, Martín-Cordero C, Toro MV, Ayuso MJ (2002)** Flavonoids as DNA topoisomerase I poisons. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17, 25-29
- Lottspei F, Zorbas H (1998)** Bioanalytik, Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag
- Losso JN, Bansode RR, Trappey A, Bawadi HA, Truax R (2004)** In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 672-678
- Lowe SW, Sherr CJ (2003)** Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13, 77-83
- Lu H, Meng X, Li S, Patten C, Sheng S, Hong J, Bai N, Winnik B, Ho CT, Yang CS (2003)** Gucuronides of tea catechins: enzymology of biosynthesis and biological activities. *Drug Metab. Dispos.* 31, 452-461
- Lukas J, Bartkova J, Bartek J (1996)** Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol.* 16(12), 6917-6925
- Manach C, Scalbert A., Morand C, Rémésy C, Jimenez L (2004)** Polyphenols: food source and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747
- Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK (1989)** Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 49, 5111-5117
- Mamot C, Rochlitz CF (2005)** IressaTM, TrcevaTM und ErbituxTM – Medikamente einer neuen Generation. *Schweiz. Med. Forum*, 5, 475-479
- Medina I, Lis S, Lizarraga D, Pazos M, Tourino S, Cacante M, Torres JL (2006)** Functional fatty fish supplemented with grape procyanidins. Antioxidant and proapoptotic properties on colon cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3598-3603
- Mendelsohn J (2002)** Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 1-13
- Mendelsohn J, Baselga J (2003)** Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 2787-2799
- Mertens-Talcott SU, Lee JH, Percival SS, Talcott ST (2006)** Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from muscadine grapes (*vitis rotundifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 54, 5336-5343
- Meiers S, Kemény M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D (2004)** The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth factor receptor. *J. Agric. Food Chem.* 49, 958-962
- Miura T, Chiba M, Kasai K, Nozaka H, Nakamura T, Shoji T, Kanda T, Ohtake Y, Sato T (2008)** Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis.* 29(3), 585-593
- Miura D, Miura Y, Yagasaki K (2007)** Effect of apple polyphenol extract on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis, and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(11), 2743-2750
- Moodie SA, Wolfmann A (1994)** The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 10, 44-48
- Momparler RL, Bouchard J, Onetto N, Rivard GE (1984)** 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with acute leukemia inhibits DNA methylation. *Leuk. Res.* 8, 181-185
- Morrison DK, Cutler RE (1997)** The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 174-179
- Nagao T, Abe F, Okabe H (2001)** Antiproliferative constituents in the plants 7. Leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum*. *Biol Pharm Bull.* 24(11), 1338-1341

- Nakagawa** Y, Shetlar MR, Wender SH (1965) Urinary products from quercetin in neomycin-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 97, 233-241
- Nakayama** H, Hibi K, Taguchi M, Takase T, Yamazaki T, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A (2002) Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Lett.* 188, 115-119
- Nakazato** K, Song H, Waga T (2006) Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in wistar rats. *Exp. Anim.* 55(2), 383-389
- Nakazato** K, Song H, Waga T (2007) Dietary apple polyphenols enhance gastrocnemius function in wistar rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39(6), 934-940
- Nardini** M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C (2002) Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5735-5741
- Nardini** M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di-Felice M, Scaccini C (1995) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 541-552
- Nevins** JR (1998) Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 9, 585-593
- Nicholson** RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer.* 37(4), 9-15
- 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, 81-88
- Nautiyal** J, Rishi AK, Majumdar APN (2006) Emerging therapies in gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol.* 12(46), 7440-7450
- Ohgaki** H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(4), 479-489
- Ogiso** H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto M, Inoue O, Shirouzu M, Yokoyama S (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110, 775-787
- Okano** M, Xie S, Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genet.* 19, 219-220
- Olayioye** MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19, 3159-3167
- Oshero**v N, Gazit A, Cilon C, Levitzki A (1993) Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/Neu receptors by tyrosinostatics. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (15), 11134-11142
- Oshero**v N, Levitzki A (1994) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem.* 225, 1047-1053
- Oszminski** J, Wolniak M, Wojdylo A, Wawer I (2007) Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 573-579
- Palisano** WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA (2000) Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 60, 5954-5958
- Pinent** M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L et al. (2005) Metabolic fate of glucose on 3T3-L1 adipocytes treated with grape seed-derived procyanidin extract (GSPE). Comparison with the effects of insulin. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 5932-5935
- Pinent** M, Blay M, Blade M, Salvado MJ, Arola L, Ardévol A (2004) Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 145, 4985-4990
- Pines** J (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases; take your partner. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 195-197
- Pinkas-Kramarski** R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15, 2452-2467

- Pinkas-Kramarski R**, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, Alimandi M, Kuo A., Moyer JD, Lavi S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Seger R, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1998) ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol. Cell Biol.* 18, 6090-6101
- Plass C**, Plass C, Weichenhan D, Catanese J, Costello JF, Yu F, Yu L, Smiraglia D, Cavenee WK, Caligiuri MA, deJong P, Held WA (1997) An arrayed human not I-EcoRV boundary library as a tool for RLGS spot analysis. *DNA Res.* 4, 253-255
- Pohl C**, Will F, Dietrich H, Schrenk D (2006) Cytochrome P450 1A1 expression and activity in caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. 54, 10262-10268
- Pradhan S**, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of *de novo* and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* 274, 33002-33010
- Quelle DE**, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the Ink4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 83, 993-1000
- Quideau S**, Jourdes M, Lefeuvre D, Montaudon D, Saucier C, Glories Y, Pardon P, Pourquier P (2005) The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chemistry*, 11, 6503-6513
- Quideau S**, Jourdes M, Saucier C, Glories Y, Pardon P, Baudry C (2003) DNA topoisomerase inhibitor acutissimin and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 6012-6014
- Quideau S**, Varadinova T, Karagiozova D, Jourdes M, Pardon P, Baudry C, Genova P, Diakov T, Petrova (2004) Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonhydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chemistry & Biodiversity*, 1, 247-258
- Ramsahoye BH**, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA-Methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5237-5242
- Raspaglio G**, Ferrandina G, Ferlini C, Scambia G, Ranelletti FO (2003) Epidermal growth factor-responsive laryngeal squamous cancer cell line Hep2 is more sensitive than unresponsive CO-K3 one to quercetin and tamoxifen apoptotic effects. *Oncol Res.* 14(2), 83-91
- Rechner AP**, 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
- Rechner AR**, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 220-235
- Rechner AR**, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srail SK, Moore KP, Rice-Evans CA (2004) Colonic metabolism of dietary polyphenol. Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Rad. Biol. Med.* 36, 212-225
- Rice-Evans CA**, Miller NJ, Paganga (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956
- Richter Julia**, Diplomarbeit (2007) Beitrag von Wasserstoffperoxid zu den zellulären Wirkungen von Flavonoiden und deren mikrobiellen Abbauprodukten in vitro sowie die Beeinflussung von Topoisomerasen durch Topoisomerasegifte *in vivo*. Universität Karlsruhe
- Rios LY**, Bennett RN, Lazarus SA., Rémésy C, Scalbert A., Williamson G (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1106-1110
- Robertson KD**, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 1(1), 11-19
- Robertson KD** (2002) DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene.* 21, 5361-5379
- Roman-Gomez J**, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Molina FJ, Calasanz MJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2004) Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasia*, 104, 2492-2498
- Roques SC**, Landrault N, Teissedre PL, Laurent C (2002) Hydrogen peroxide generation in caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: effect of ascorbic acid. *Free Radic Res.* 36, 593-599.
- Ross HA.**, McDougall GJ, Stewart D (2007) Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry*, 68, 218-228

- Sah** JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. (2004) Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signalling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J. Biol. Chem.* 279, 12755-12762
- Salomon** DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995, 19, 183-232
- Salomon** DS (2004) Exon structure of the EGFR gene. *Signal*, 5(3), 30-31
- Saito** A., Mizushima Y, Ikawa H, Yoshida H, Doi Y, Tanaka A, Nakajima N (2005) Systematic synthesis of galloyl-substituted procyanidin B1 and B2, and their ability of DPPH radical scavenging activity and inhibitory activity of DNA polymerases. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2759-2771
- Santini** V, Kantarjian HM, Issa JP (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann. Intern. Med.* 134, 573-586
- Santos-Buelga** C, Scalbert A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1094-1117
- Santourlidis** S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, Schulz WA (1999) High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate*, 39, 166-174
- Scalbert** A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S
- Schaefer** HJ, weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinase: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* 19, 2435-2444
- Schäfer** S, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Frank W, Janzowski C (2006a) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 24-33
- Schäfer** S, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2006b) Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 413-417
- 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(2), 265-273
- Schlessinger** J (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110, 660-672
- Schoefer** L, Mohan R, Schwiertz An, Braune A, Blaut M (2003) Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl. Environmental Microbiol.* 69(19), 5849-5854
- Seeram** NP, Bourquin LD, Nair MG (2001) Degradation products of cyaniding glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agric Food Chem.* 49, 4924-4929
- Seeram** NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9329-9339
- Sembries** S, Dongowski G, Mehrländer K, Will F, Dietrich H (2006) Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomaces in rats. *J. Agric. Food Chem.* 54, 10269-10280
- Serrano** M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366, 704-707
- Skehan** P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82(13), 1107-1112
- Sherr** CJ (2001) The Ink4a/Arf network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 731-737
- Sherr** CJ (1996) Cancer and cell cycle. *Science*, 274, 1672-1677
- Shibata** H, Sakamoto Y, Oka M, Kono Y (1999) Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1295-1297
- Smiraglia** DJ, Rush LJ, Frühwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Cligiuri MA, Plass C (2001) Excessive CpG islands hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Human Molecular Genet.* 10, 1413-1419

- 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. *Antioxidants & Redox Signaling*. 3(6) 1023-1039
- Spencer** JPE, Choudry AS, Pannala SK, Scrai ES, Debnam, Rice-Evans C (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 236-241
- Spencer** JPE, Schroeter H, Shenoy B, Srail SK, Debnam ES, Rice-Evans C (2001) Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophysik. Res. Commun.* 285, 599-593
- Spencer** JPE (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 133, 3255S-3261S
- Suan** A, Bonnet R, Sutren M, Godon IJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4799-4807
- Stamos** J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* 277, 46265-46272
- Strathdee** G, Brown R (2002) *Bioscience 2004, Pharmacogenomics*, 5(7), 775-778
- Sugiyama** H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y (2007) Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4604-4609
- Sun** J, Chu YF, Wu X Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7449-7454
- Suzuki** K, Yahara S, Hashimoto F, Uyeda M (2001) Inhibitory activities of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate against topoisomerase I and II. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1088-1090
- Takai** D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T (2000) Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol.* 30, 289-290
- Takahashi** T, Shivapurkar N, Riquelme E, Higematsu H, Reddy J, Suzuki M, Miyajima Kuniharu, Zhou X, Bekele BN, Gazdar AF, Wistuba II (2004) Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in gallbladder carcinoma and chronic cholecystitis. *10*, 6126-6133
- Takahashi** H, Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Fujisawa T, Iida H, Mawatari H, Nozaki Y, Akiyama T, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Nakajima A, Nakagama H (2007) Life style-related diseases of the digestive system: colorectal cancer as a life style-related disease: from carcinogenesis to medical treatment. *J. Pharmacol. Sci.* 105, 129-132
- Teller** Nicole, Diplomarbeit (2006) Selektivität der Hemmwirkung ausgewählter Polyphenole auf Rezeptortyrosinkinase der ErbB-Familie *in vitro*. Universität Karlsruhe
- Tourino** S, Selga A, Jimenez A, Julia L, Lozano C, Lizárraga D, Cascante M, Torres JL (2005) Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4728-4735
- Tsao** R, Yang R, Xie S, Emily S, Khanizadeh S (2005) Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.* 53, 4989-4995
- 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(9), 1302-1316
- Tzahar** E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y (1997) Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *The EMBO Journal*, 16(16), 4938-4950
- Tzahar** E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 16, 5276-5287
- Ueki** K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, Usui M, Ochiai C, Ito S, Takahashi H, Mukasa A, Asai A, Kirino T (2002) Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res.* 8(1), 196-201

- Ullrich** A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee Y, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309, 418-425
- Vanyushin** BF (2005) Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Mosc)*, 70(5), 488-499
- Veeriah** S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis*, 45, 164-174
- Veeriah** S, Hofmann T, Gleis M, Dietrich H, Will F, Schreier P, Knaup B, Pool-Zobel BL (2007) Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J. Agric. Food Chem.* 55, 2892-2900
- Veeriah** S, Miene C, Habermann N, Hofmann, Klenow S, Sauer J, Böhmer F, Wölfl S, Pool-Zobel BL (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicology defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int. J. Cancer*, 122, 2647-2655
- Votteler** W (2005) Verzeichnis der Apfel- und Birnensorten, 5. Auflage, Obst- und Gartenbauverlag
- Volz** Nadine, Diplomarbeit (2007) Der Einfluss polyphenolreicher Extrakte auf Elemente zellulärer Signaltransduktionskaskaden *in vitro*. Universität Karlsruhe
- Wajed** SA, Laird PW, DeMeester TR (2001) DNA Methylation: An alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery*, 234(1), 10-20
- Wakefield** RI, Smith BO, Nan X, Free A, Soteriou A, Uhrin D, Bird AP, Barlow PN (1999) The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J. Mol. Biol.* 291, 1055-1065
- Waldecker** M, Kautenburger T, Daumann H, Veeriah S, Will F, Dietrich H, Pool-Zobel BL, Schrenk D (2008) Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extract. *Nutrition*, 24, 366-374
- Waldgren** RA, Lin JT, Kinne RK, Walle T (2000) Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin-4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294(3), 837-843
- Wang** Q, Vielleneuve G, Wang Z (2005) Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep.* 6, 942-948
- Watzl** B, Rechkemmer G (2001) Phenolsäuren, *Ernährungs-Umschau*, 48, Heft 10, 413-415
- Watzl** B, Karlis B, Rechkemmer G (2002) Anthocyane, *Ernährungs-Umschau*, 49, Heft 4, 148-150
- Watzl** B, Rechkemmer G (2001) Flavonoide, *Ernährungs-Umschau*, 48, Heft 12, 498-502
- Wee** LM, Long LH, Whiteman M, Halliwell B (2003) Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium. *Free Radic Res.* 37, 1123-1130
- Will** F, Bauchhage K, Dietrich H (2000) Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. 211, 291-297
- Wilson** VL, Jones PA, Momparler RL (1983) Inhibition of DNA methylation in L1210 Leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res.* 43, 3493-3496
- Wittmer** SM, Ploch M, Windeck T, Muller SC, Drewelow B, Derendorf H, Veit M (2005) Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in human. *Phytomedicine*, 12, 28-38
- Wolfe** K, Wu XZ Liu RH (2003a) Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* 51, 609-614
- Wolfe** K, Liu RH (2003b) Apple peels as a value-added food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1676-1683
- Wolffram** S, Weber T, Grenacher B, Scharrer E (1995) A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J. Nutr.* 125, 1300-1308
- Yang** GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS (1998) Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19, 611-616

- Yang** GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS (2000) Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformd and non-transformed human brochial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis*, 21(11), 2035-2039
- Zeßner** Henriette, Dissertation (2005) Bioaktivitätsgeleitete Isolierung der Polyphenole des Apfelsaftes. Universität Saarbrücken
- Zeßner** H, Pan L, Will F, Klimo K, Knauft J, Niewöher R, Hümmer W, Owen R, Richling E, Frank N, Schreier P, Becker P, Gerhäuser C (2008) Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1-17
- Zhang** WY, Liu HQ, Xie KQ, Yin LL, Li Y, Kwik-Urbe CL, Zhu XZ (2006) Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 508-515
- Zhou** M, Felder S, Rubinstein M, Hurwitz DR, Ullrich A, Lax I, Schlessinger J (1993) Real time measurements of kinetic of EGF bindung to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model of receptor activation. *Biochemistry*, 32, 8193-8198
- Zhu** QY, Holt RR, Lazarus SA, Ensunsa JL, Hammerstone JF, Schmitz HH, Keen CL (2002) Stability of the flavon-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1700-1705
- Zhu** WG, Dai Z, Ding H, Srinivasan K, Hall Julia, Duan W, Villalona-calero MA, Plass C, Otterson GA (2001) Increased expression of unmethylated CDKN2A by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells. *Oncogene*, 20, 7787-7796

8 Anhang

- Formelverzeichnis
- Publikationen
- Lebenslauf
- Danksagung
- Epilog

FormelverzeichnisArithmetischer Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

x_i i-ter Messwert

n Anzahl der Messungen

Standardabweichung

$$s = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

\bar{x} arithmetischer Mittelwert

x_i i-ter Messwert

n Anzahl der Messungen

Lineare Regression

$$y = mx + b$$

m Steigung der Geraden

$$b = \frac{\left(\sum_i y_i \right) \cdot \left(\sum_i x_i^2 \right) - \left(\sum_i x_i \right) \cdot \left(\sum_i [x_i \cdot y_i] \right)}{n \left(\sum_i x_i^2 \right) - \left(\sum_i x_i \right)^2}$$

b y-Achsenabschnitt

Test over Control

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

T/C Test over Control

T Optische Dichte der Testsubstanz

C_N Optische Dichte der Lösungsmittelkontrolle

C_B Optische Dichte des Blindwertes

IC₅₀-Wert

$$IC_{50} = \frac{50 - A}{B}$$

A y-Achsenabschnitt

B Steigung

Fehlerberechnung des IC₅₀-Wertes

$$\Delta IC_{50} = \sqrt{\left(-\frac{1}{B} \right)^2 \cdot (m_A)^2 + \left(\frac{A - 50}{B^2} \right) \cdot (m_B)^2}$$

m_B Fehler der Steigung

m_A Fehler des y-Achsenabschnitts

Ausreißertest nach Nalimov

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\rho_{n-1} \left(\frac{n}{n-1} \right)^{\frac{1}{2}}}$$

x^* vermutlicher Ausreißer

\bar{x} arithmetischer Mittelwert

ρ_{n-1} Standardabweichung

n Anzahl der Messungen

n (Anzahl der Messungen)	r* (Vergleichswert)
3	1,409
4	1,645
5	1,757
6	1,814
7	1,848
8	1,870

Anhand der Tabelle wird verglichen, ob r^* des Messwertes $>$ r^* der Tabelle ist. Trifft dies zu, so gilt der Messwert als Ausreißer und muss aus der Messreihe entfernt werden.

Publikationen

- **Fridrich D**, Kern M, Pahlke G, Volz N, Will F, Dietrich H, Marko D (2007) Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(5), 594-601
- **Fridrich D**, Kern M, Fritz J, Pahlke G, Köhler N, Winterhalter P, Marko (2007) The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(2), 192-200
- **Fridrich D**, Fritz J, Esselen M, Pahlke G, Hofmann T, Marko D (2008) Ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food*, 56(9), 3010-3015
- **Fridrich D**, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D (2008) Different activity profile of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of EGFR and ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol. Nutr. Food Res.* 52(7), 815-822
- Kern M, **Fridrich D**, Reichert J, Skrbek S, Nussler A, Hofem A, Vatter S, Pahlke G, Rüfer C, Marko D (2007) Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(9), 1163-1172
- Jakobs S, **Fridrich D**, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G (2006) Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol. Nutr. Food Res.* 50(1), 52-57

Posterbeiträge

- 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII in Hamburg, 19.-23.09.2005, **D. Fridrich**, S. Jakobs, G. Pahlke, D. Marko und G. Eisenbrand, Effekte von Quercetin auf die Glukose-/Glykogenhomöostase in humanen Tumorzellen.
- LChG Regionalverband Südwest: Jahrestagung in Karlsruhe 06.-07.03.2006, **D. Fridrich**, M. Kern und D. Marko, Procyanidine als Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR).
- 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Dresden 18.-20.09.2006, **D. Fridrich**, M. Kern und D. Marko, Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors durch Apfelpolyphenole.
- 10th Karlsruhe Nutrition Congress, BFEL, Karlsruhe, 14.-15.09.2006, **D. Fridrich**, M. Kern und D. Marko, Impact of degradation products and H₂O₂ formation on the growth inhibitory properties of quercetin in human colon carcinoma cells.
- NutIntest, Kaiserslautern, 28.02.-01.03.2007, **D. Fridrich**, M. Kern und D. Marko, Apple pomace extract as inhibitor of the epidermal growth factor receptor and its contribution to tumour cell growth in HT29 cells.
- NutIntest, Kaiserslautern, 28.02.-01.03.2007, U. Boettler, **D. Fridrich**, M. Kern, G. Pahlke und D. Marko, Impact of apple polyphenols on the protein kinase B (PKB) pathway.

Lebenslauf

Name	Diana Fridrich
Geburtsdatum	15. August 1980
Geburtsort	Bottrop in Westfalen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1987 – 06/1991	Albert-Schweitzer-Grundschule, Bottrop
08/1991 – 06/2000	Josef-Albers-Gymnasium, Bottrop Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/2000 – 03/2005	Studium der Lebensmittelchemie, Universität Kaiserslautern (TU)
10/2002	Staatliche Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker
01/2004 – 03/2004	Forschungspraktikum im Arbeitskreis von Prof. Dr. Eisenbrand, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie/Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern (TU) Thema: Beeinflussung der Glykogenphosphorylase durch Polyphenole.
09/2004	Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
10/2004 – 03/2005	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Eisenbrand, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie/Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern (TU) Thema: Bestimmung der Aktivität der Glykogenphosphorylase, der Glykogensynthase und des Glykogengehaltes in humanen Tumorzellen. Methodenetablierung und Validierung. Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin
06/2005 – 09/2007	wissenschaftliche Angestellte der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Marko
seit 06/2005	Promotionsarbeit
seit 02/2006	Weiterbildung zur Fachtoxikologin DGPT

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei

- ❖ Frau Prof. Marko für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.
- ❖ Herrn Prof. Metzler für die Übernahme des Koreferats.
- ❖ Melanie und Gudrun, deren wissenschaftliche Unterstützung großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte und deren Diskussionsfreudigkeit zu wichtigen Ideen und Erkenntnissen beigetragen hat.
- ❖ Melanie für die zügige Durchsicht des Manuskripts und ihre konstruktive Kritik.
- ❖ allen Kollegen und Kolleginnen der Abteilung Lebensmittelchemie /-toxikologie v. a. Ute, Melanie, Markus, Jessica, Gudrun, Joanna, Matthias, Nicole und Nadine für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und eine freundschaftliche Zusammenarbeit.
- ❖ meinen engagierten und motivierten Diplomanden Volker, Ute, Nicole und Nadine.
- ❖ den Professoren Dietrich, Winterhalter und Hofmann für die Bereitstellung der Apfel-extrakte, der Procyanidine und der Ellagannine.
- ❖ allen Babysittern für ihre starken Nerven und ihre Ausdauer.
- ❖ Ingo, dem weltbesten Formatierungskünstler.

Epilog

„Wollte ich Vollkommenheit anstreben,
würde mein Buch nie fertig“

Tai T`ung (chinesischer Gelehrte, 13. Jh.)

Trotz aller Bemühungen sind Fehler in dieser Arbeit unvermeidbar.
In diesem Sinne würde ich konstruktive Kritik begrüßen.

Hiermit bestätige ich, Diana Fridrich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Karlsruhe, 28. Mai 2008

Unterschrift *Diana Fridrich*