universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Modulation des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalelemente durch chlorogensäurereiche Extrakte und ausgewählte Inhaltsstoffe“

Verfasserin

Christine Krumböck

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 419
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Chemie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Theoretische Grundlagen 3
2.1. Kanzerogenese 3
2.2. Signalweiterleitung über Rezeptortyrosinkinasen 4
2.3. ErbB-Familie 6
2.3.1. Struktur der ErbB-Rezeptoren 7
2.3.2. Liganden 9
2.3.3. Aktivierung der ErbB-Rezeptoren 10
2.3.4. Adaptorproteine der aktivierten RTKs 13
2.4. Nachgeschaltete Signalwege 14
2.4.1. MAPK-Kaskade 14
2.5. Polyphenole 16
2.5.1. Flavonoide 17
2.5.1.1. Anthocyane 19
2.5.1.2. Bioverfügbarkeit der Anthocyane 20
2.5.1.3. Biologische Effekte der Anthocyane 23
2.5.2. Phenolcarbonsäuren 26
2.5.2.1. Hydroxyzimtsäuren 27
2.5.2.2. Bioverfügbarkeit von Hydroxyzimtsäuren 28
2.5.2.3. Biologische Eigenschaften von Chlorogensäure und einigen verwandten Derivaten 30
2.5.3. Heidelbeerextrakte 32
2.6. Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium durch Polyphenole 34
3. Problemstellung 35
4. Ergebnisse und Diskussion 37
4.1. Beeinflussung des Zellwachstums durch Heidelbeerextrakte und die ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure 37
4.1.1. Beeinflussung des Zellwachstums durch einen unverkapselten Heidelbeerextrakt 37
4.1.2. Beeinflussung des Zellwachstums durch einen verkapselten Heidelbeerextrakt 40
4.1.3. Beeinflussung des Zellwachstums durch die ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure 45
4.2. Einfluss ausgewählter Subfraktionen des Heidelbeerextrakts auf die Aktivität des EGF-Rezeptors 47

4.3. Einfluss von Chlorogensäure auf die Aktivität des EGF-Rezeptors und nachgeschaltete Signalelemente 54
4.4. Einfluss des Coinkubats auf die Aktivität des EGF-Rezeptors 61
4.5. Einfluss des rekonstituierten Extrakts AE02 auf die Aktivität des EGF-Rezeptors und nachgeschaltete Signalelemente 63
4.6. Einfluss von Chlorogensäure auf die Transkription ausgewählter über die MAPK-Kaskade-regulierte, wachstumsassoziierte Gene 72
4.7. Gesamtdiskussion 80
5. Zusammenfassung 88
6. Materialien und Methoden 91
6.1. Zellkultur 91
6.1.1. Zelllinie 91
6.1.2. Zellkultivierung 91
6.1.3. Mediumwechsel 92
6.1.4. Passagieren 92
6.1.5. Bestimmung der Zellzahl 93
6.2. Untersuchungen zum Zellwachstum mittels Sulforhodamin B (SRB) Test 95
6.3. Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung 96
6.4. Untersuchungen zur Modulation der Aktivität und Expression des EGF-Rezeptors sowie nachgeschalteter Signalelemente mittels Western Blot Analyse 97
6.4.1. Kultivierung der Zellen 97
6.4.2. Substanzinkubation 98
6.4.3. Aufarbeitung der Zellen und Gewinnung der Proteine 98
6.4.4. Proteinbestimmung nach Bradford 99
6.4.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese 100
6.4.6. Western Blot Analyse und Detektion mittels spezifischer Antikörper .. 104
6.5. Untersuchung der Gentranskription mittels RealTime-PCR 106
6.5.1. Inkubation 107
6.5.2. Isolierung der RNA 107
6.5.3. Bestimmung der Quantität und Reinheit der RNA 109
6.5.4. Reverse Transkription 109
6.5.5. RealTime-PCR 112
6.6. Geräte 116
6.7. Materialien 117
7. Literaturverzeichnis 120
8. Anhangverzeichnis 130

II. Abkürzungsverzeichnis

AE02	Polyphenolreicher Apfelsaftextrakt
AG1478	Spezifischer EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478
AIF	Arbeitskreis industrieller Forschungsvereinigungen
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AR	Amphiregulin
Arab	Arabinosid
Asn	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMK	große mitogen-aktivierte Proteinkinase
BSA	Bovineserumalbumin
BTC	Betacellulin
cAMP	cyclisches Adensoinmonophosphat
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Complementary DNA
c-fos	Onkogen
CGA	Chlorogensäure
Chk	Csk-homologous kinase
CR	cysteinreiche Domäne
Crk	Adapterprotein
Cy	Cyanidin
Del	Delphinidin
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dubelco´s modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECD	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR/ErbB1/Her1	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
Elk-1	Transkriptionsfaktor Ets-like kinase
Ephs	Ephrin Rezeptoren
EPR	Epiregulin
eps8	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8

ErbB2/Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
ErbB3/Her3	Human epidermal growth factor receptor 3
ErbB4/Her4	Human epidermal growth factor receptor 4
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
EtOAc	Ethylacetat
FGFR	Fibroblast Wachstumsfaktorrezeptor
FKS	fetales Kälberserum
HBE	Heidelbeerextrakt
HB-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlicher Faktor
HKG	Housekeeping Gen
HRP	horseradish peroxidase
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie
Gab1	GRB2-associated-binding protein 1
Gal	Galactosid
GDP	Guanosindiphosphat
Gew.-%	Gewichtsprozent
Glc	Glucosid
Glu	Glutamin
Grb2	Adapterprotein growth factor receptor-bound protein 2
Grb7	Adapterprotein growth factor receptor-bound protein 7
GTP	Guanosintriphosphat
Ig	Immunoglobulin
IGF-1R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 Rezeptor
Jak-2	Tyrosinkinase
JAK/STAT	c-Jun-N-terminale Kinase, stress-induzierbare MAPK
JM	Juxtamembranregion
JNK	c-Jun Amino-terminale Kinase
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
L	leucinreiche Domäne
LPH	Lactasephloridzinhydrolase
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEK1/2	MAPKK/ERK-Kinasen
Min	Multiple intestinal adenoma
Mv	Malvidin

MW	Mittelwert
NGF	nerve growth factor
NRG	Neuregulin
NTC	No-template-control
P	Phosphatrest
P/S	Penicillin/Streptomycin
p38/HOG	stress-aktivierte Proteinkinase
PAE	Procyanidinreicher Apfelextrakt
PBS	phosphate buffered saline
PCLγ	Phospholipase C
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktorrezeptor
Pg	Pelargonidin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
Pn	Peonidin
Poly	aufgereinigte Polymerfraktion (Subfraktion des Heidelbeerextrakts)
Pro	Prolin
PGPR	PolyGlycerol PolyRicinoleat
PTB	Phosphotyrosinbindungsdomäne
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatasen
pTyr	Phosphotyrosin
Raf	Rapidly growing fibrosarcomas
Ras	Rat sarcoma
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	cysteinreiche Domäne
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SGLT1	Natrium-Glucose-Kotransporter
SH-1	src homologe Domäne-1
SH-2	src homologe Domäne-2
Shc	Src/homology/collagen
SHP1 und 2	Proteintyrosinphosphatasen
Sos	Son of sevenless
SRB	Sulforhodamin B
Src	Humanes Homolog des Rous-Sarcoma Virusonkogens
SRE	serum responsive element
T/C	Test-over-Control
Taq	Thermus aquaticus
TBA	Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylendiamin
TGF-α	transformierter Wachstumsfaktor-α
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
VEGFa	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor a
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosinrest

1. Einleitung

Bösartige Tumorerkrankungen sind nach den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. In Österreich erkranken jährlich etwa 36.000 Menschen an Krebs, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind. Die häufigsten Tumorlokalisationen bei Männern sind die Prostata, die Lunge und der Dickdarm. Bei Frauen dominiert der Brustkrebs, gefolgt von Darmkrebs. Jedes Jahr werden zwischen 4.400 und 5.000 bösartige Tumore im Dickdarm beziehungsweise im Enddarm diagnostiziert, welches etwa 13 % aller Neuerkrankungen entspricht. Die Krebsmortalität für Dickdarm- und Enddarmkrebs liegt pro Jahr bei über 2.000 Fällen [Statistik Austria].

Doll und Peto postulierten schon 1981, dass es einen Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Krebsentstehung geben könnte. Ungefähr ein Drittel aller Krebsfälle ist wahrscheinlich auf Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen [Rafter et al., 2004]. Vor allem bei kolorektalen Krebserkrankungen scheint die Ernährung neben der genetischen Prädisposition und Umweltfaktoren einen großen Einfluss zu nehmen. Die Österreichische Gesellschaft für Ernährung empfiehlt deshalb eine abwechslungs- und ballaststoffreiche Ernährung, bei der Obst und Gemüse, sowie Milch und Milchprodukte enthalten sein sollten. Der Konsum von fettreichen Lebensmitteln, wie Fleisch und Wurst, zucker- und salzreichen Lebensmitteln sollte dabei eingeschränkt werden. Hierbei sind pflanzliche Fette und Öle mit ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren den tierischen mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren vorzuziehen. Viele Studien lassen zudem vermuten, dass die Einnahme von Obst und Gemüse negativ mit der Tumorinzidenz korreliert ist [Steinmetz und Potter, 1996; World Cancer Research Fund, 1999; Manach et al., 2005].

Krebs entsteht durch viele verschiedene Ursachen und involviert die Veränderungen von spezifischen Signalwegen. Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren sind in vielen menschlichen Tumorarten verändert. Maligne Transformationen, als eine Konsequenz der Rezeptor-Deregulierung, können in Menschen durch unterschiedliche Mechanismen auftreten. Beispiele sind Rezeptorüberexpression, aktivierende Mutationen, Veränderungen im Dimerisierungsprozess, Aktivierung von autokrinen Wachstumsfaktorschleifen und Modulation der Endozytose der aktivierten Rezeptoren. Überaktivierte Wachstumsfaktorrezeptoren können eine normale in eine maligne Zelle verwandeln, indem verstärkte Signale für die Zellproliferation, antiapoptotische Einflüsse, Angiogenese und Metastasenbildung, welches Grundeigenschaften von Krebs sind, geliefert werden [Sebastian et al., 2006].

Die Inhibierung der proliferationsassoziierten Signalwege ist eines der Ziele der Chemoprävention. Bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe, wie die Polyphenole in Obst und Gemüse, zeigten bereits hemmende Effekte auf die Aktivierung der Rezeptoren und können somit Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen [Kern et al., 2005, Fridrich et al., 2007a, Teller et al., 2009a]. Wichtige Lebensmittel für die Ernährung, die in höheren Mengen konsumiert werden, sind Äpfel und Beeren und daraus hergestellte Produkte. Viele Studien beschäftigten sich daher mit diesen, wobei Heidelbeer- und Apfelsaftextrakte bereits hemmende Effekte auf das Zellwachstum und die Aktivierung einer Vielzahl von Rezeptortyrosinkinasen zeigten.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft)/AIF (Arbeitskreis industrieller Forschungsvereinigungen) Clustervorhabens „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“. Im Rahmen der Diplomarbeit soll die Wirkung verschiedener chlorogensäurehaltiger Extrakte, wie Apfel- und Beerenextrakte, sowie die ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure auf ihren Einfluss auf das Zellwachstum und zelluläre Signalelemente, wie den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor, sowie die nachgeschaltete mitogen-aktivierte Proteinkinase Signalkaskade, die das Zellwachstum kontrolliert, untersucht werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Kanzerogenese

Der Prozess, bei dem aus einer normalen, gesunden Zelle ein Tumor entsteht, beinhaltet viele Schritte über eine längere Zeitperiode [Manson, 2003]. Genetische Veränderungen könnten die progressive Transformation lenken. Mutationen in bestimmten Onkogenen und Tumorsupressorgenen können früh in einigen Tumorentwicklungswegen und spät in anderen auftreten. Zur Ausbildung der Malignität müssen Zellen verschiedene Transformationscharakteristiken erreichen. Sie werden in Wachstumssignalen autark und haben ein unbegrenztes replikatives Potential, werden unempfänglich für antiproliferative Signale, umgehen die Apoptose, induzieren Angiogenese und halten diese aufrecht. Dadurch erhalten sie die Fähigkeit zu invadieren und metastasieren [Hanahan und Weinberg, 2000].

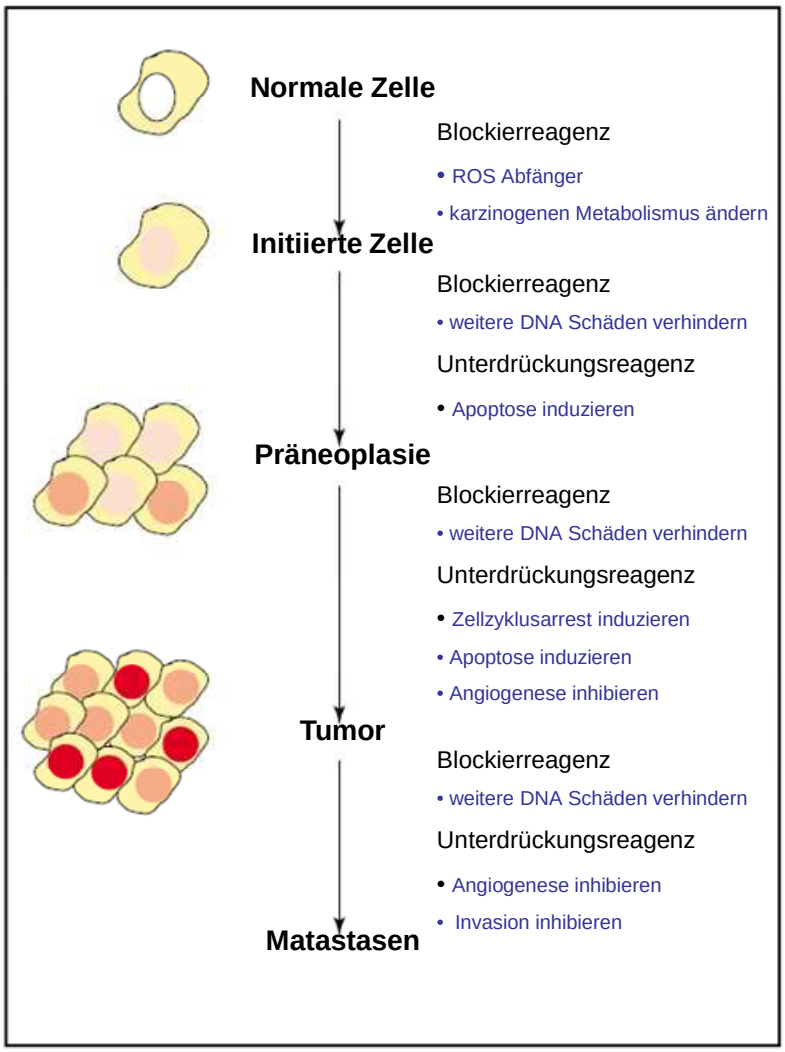


Abbildung 1 Potential zur Intervention in der Kanzerogenese [modifiziert nach Manson, 2003]; ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

Diese Abfolge an Ereignissen bietet viele Möglichkeiten für eine Intervention mit dem Ziel der Prävention, Verlangsamung oder Umkehr der Transformationsprozesse (siehe Abb. 1). Idealerweise würde Chemoprävention den Krebsprozess in einer frühen Phase halten, möglicherweise sogar die Bildung von präneoplastischen Läsionen verhindern [Manson, 2003]. Als chemopräventive Substanzen werden einzelne Nahrungsinhaltsstoffe diskutiert (siehe 2.5.).
Die Effekte dieser Nahrungsinhaltsstoffe sind abhängig vom Gewebe- oder Zelltyp, sowie der Konzentration. Allerdings sind viele potentielle Mechanismen, durch welche sie ihre Effekte vermitteln könnten, beschrieben:

- veränderte Signalwege durch die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) oder Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) und Proteinkinase B (PKB),
- modifizierte Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wie Aktivatorprotein-1 (AP-1) und
- Modulation von Schlüsselmolekülen, die in der Kontrolle des Zellzyklus [Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und ihre Inhibitoren] oder der Apoptose involviert sind [Manson, 2003].

Wegen ihrer Rolle als Wachstumsfaktorrezeptoren werden viele Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) mit dem Beginn oder der Progression von verschiedenen Krebsarten, entweder durch Mutationen des Rezeptors, welche zu einem Verlust der Funktion führen, oder durch Rezeptor/Ligand-Überexpression, in Verbindung gebracht [Burgees et al., 2003; Sebastian et al., 2006; Hubbard und Miller, 2007; Fuller et al., 2008].
Die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) in verschiedenen epithelialen Tumoren und des ErbB2-Gens in 30 % der invasiven Brusttumore ist mit einer verkürzten Überlebenszeit und zunehmender Aggressivität des Tumors korreliert [Gschwind et al., 2007; Fuller et al., 2008].
Als Konsequenz daraus sind RTKs und ihre Wachstumsfaktorliganden vielversprechende Ziele für eine therapeutische Intervention geworden [Gschwind, et al., 2004].

2.2. Signalweiterleitung über Rezeptortyrosinkinasen

Zellen sind fortlaufend diversen Stimuli ausgesetzt, die von löslichen endokrinen und parakrinen Faktoren bis zu Signalmolekülen von Nachbarzellen reichen [Olayioye et al., 2000]. Sie reagieren auf extrazelluläre Signale durch Weiterleitung intrazellulärer Signale [Robinson und Cobb, 1997]. Rezeptoren der Tyrosinkinasefamilie spielen eine entscheidende Rolle in dem Prozess der Signalweiterleitung. Bei der Bindung von spezifischen Peptidliganden sind sie fähig

diese externen Stimuli mit inneren Signaltranduktionswegen zusammenzuschließen, um die entsprechende Entwicklungs- oder Proliferationsantwort zu geben [Olayioye et al., 2000].

Eine große Gruppe von Genen in allen Eukaryonten kodiert für Proteine, die als membrandurchspannende Zelloberflächenrezeptoren fungieren. Membranrezeptoren können in verschiedene Familien eingeteilt werden. Diese Einteilung basiert auf den Liganden, der biologischen Antwort, die sie induzieren, und auf ihrer Primärstruktur [Schlessinger, 2000]. Eine Subklasse von Zelloberflächenrezeptoren, die mit einer intrinsischen, durch Liganden-kontrollierten Proteintyrosinkinaseaktivität ausgestattet sind, sind die RTKs [Schlessinger, 2000; Gschwind et al., 2004]. RTKs werden nur in Metazoa gefunden, während im Gegensatz dazu viele Serin/Threonin-Kinasefamilien in Eukaryonten erhalten geblieben sind und sowohl in unizellulären, als auch in multizellulären Organsimen zu finden sind [Bazley und Gullick, 2005]. Untersuchungen des menschlichen Genoms haben ergeben, dass 58 der 90 Tyrosinkinasesequenzen als RTKs identifiziert wurden, während es sich bei den restlichen 32 um Nicht-Rezeptortypen handelt [Bazley und Gullick, 2005; Hubbart und Miller, 2007]. Die 58 bekannten Mitglieder verteilen sich auf 20 Subfamilien [Gschwind et al., 2004]. RTKs sind einzelsträngige, Typ I Rezeptoren in der Plasmamembran [Olayioye et al., 2000; Hubbart und Miller, 2007]. Die RTK-Familie inkludiert unter anderem den EGFR, den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1 Rezeptor (IGF1R), den Blutplättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktorrezeptor (PDGFR), den Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR), den Fibroblast Wachstumsfaktorrezeptor (FGFR) und die Ephrin Rezeptoren (Ephs) [Hubbart und Miller, 2007; Teillet et al., 2007].

RTKs katalysieren den Transfer eines γ-Phosphats von ATP auf die Hydroxygruppen von Tyrosinen an den Zielproteinen [Schlessinger, 2000; Gschwind et al., 2004; Hubbard und Miller, 2007]. Diese single-pass Transmembranrezeptoren spielen eine Schlüsselrolle in vielen zellulären Prozessen, wie dem Zellzyklus, Zellmigration, Zellwachstum, Differenzierung, Metabolismus und Motilität [Schlessinger, 2000; Gschwind et al., 2004; Hubbard und Miller, 2007]. RTKs sind essentielle Komponenten der zellulären Signalwege, die während der embryonalen Entwicklung und adulten Homöostase aktiv sind und so die intrazelluläre Kommunikation während der Entwicklung regulieren [Gschwind et al., 2004; Hubbard und Miller, 2007]. Dieselbe RTK kann verschiedene Antworten induzieren, wenn sie in verschiedenen Zellen oder in verschiedenen Phasen der Differenzierung von einer spezifischen Zelllinie exprimiert wird [Schlessinger, 2000].

Trotz ihrer einzigartigen biologischen Aufgaben sind RTKs in ihrer Struktur sehr ähnlich aufgebaut (siehe Abb. 2, 2.3.1) [Gschwind et al., 2004]. Mit Ausnahme der Insulinrezeptor-Familie der RTKs, die aus über Disulfidbrücken-vernetzenden Dimeren bestehen, liegen alle bekannten RTKs als Monomere in der Zellmembran vor [Schlessinger, 2000; Burgees et al., 2003]. Die extrazelluläre Domäne weist eine oder mehrere Strukturmerkmale auf, z.B. cysteinreiche Domänen (EGFR) und Immunglobulin-ähnliche Domänen (PDGFR, VEGFR und FGFR) [Schlessinger, 2000; Teillet et al., 2007].
Die Bindung eines Polypeptidliganden (v.a. Wachstumsfaktoren) an die RTK induziert eine Dimerisierung der Rezeptoren und eine Autophosphorylierung von Schlüsseltyrosineinheiten in der Aktivierungsschleife der katalytischen Kinasedomäne, welche in der Stimulierung der Tyrosinkinaseaktivität resultiert [Schlessinger, 2000; Gschwind et al., 2004; Hubbard und Miller, 2007]. Wachstumsfaktorstimulation resultiert in einer schnellen Endozytose und dem Abbau von Rezeptor und Ligand [Schlessinger, 2000].

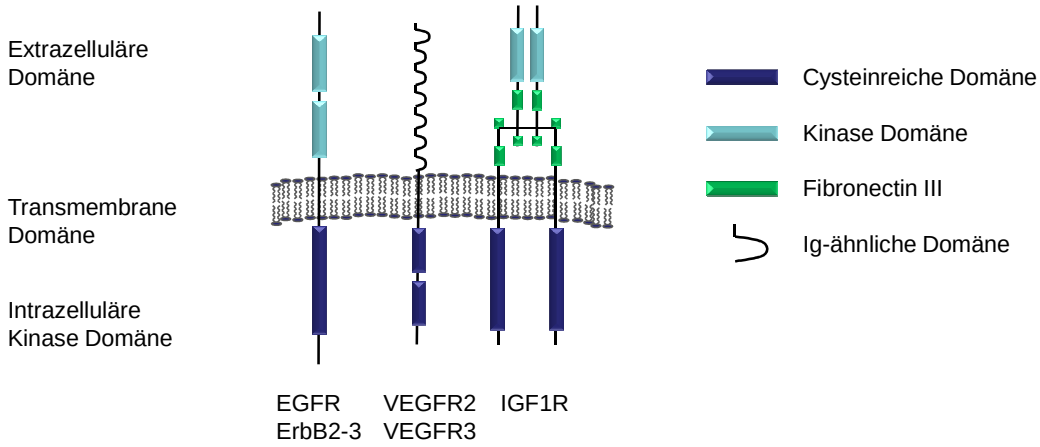


Abbildung 2 Unterfamilien ausgewählter RTKs. EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; ErbB2, -3: Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, 3, ; IGF1R: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 Rezeptor; VEGFR2, -3: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2, -3; Ig: Immunglobulin.

2.3. ErbB-Familie

Der EGFR war der erste RTK der von Carpenter et al. (1978) entdeckt wurde und ist einer der bestuntersuchten RTKs [Bazley und Gullick, 2005].
Heute besteht die ErbB-Familie aus vier Mitgliedern: EGFR (ErbB1, HER-1), ErbB2 [Neu, HER-2 (human EGFR-related2)], ErbB3 (HER-3) und ErbB4 (HER-4) [Olayioye et al., 2000; Schlessinger, 2000; Gschwind et al., 2004; Sebastian et al., 2006]. Alle haben ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa [Fuller et al., 2008].
Die ErbB-Rezeptoren werden in einer Vielfalt von Geweben von epithelialem, mesenchymalem und neuronalem Ursprung exprimiert, wo sie eine große Rolle in

der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung spielen. Die ErbB-Familie hat sich evolutionär von einer einzelnen Ligand-Rezeptor-Kombination in dem Wurm *Caenorhabditis elegans*, über die Fruchtfliege *Drosphila melanogaster* mit einem Rezeptor und vier Liganden in den Wirbeltieren entwickelt, wo vier ErbB-Rezeptoren an viele EGF-ähnliche Liganden binden, mit dem Ergebnis einer hohen Signaldiversität [Olayioye et al., 2000; Bazley und Gullick, 2005].

2.3.1. Struktur der ErbB-Rezeptoren

Die vier ErbB-Rezeptoren sind eng verwandte single-pass Glykoproteine mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne (ca. 620 Aminosäuren), einer single-pass Transmembrandomäne (ca. 23 Aminosäuren) und einer zytosolischen, intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (ca. 260 Aminosäuren), die an die Juxtamembranregion (ca. 40 Aminosäuren) und eine nicht-katalytische C-terminale regulatorische Region (ca. 232 Aminosäuen) grenzt (siehe Abb. 3) [Olayioye et al., 2000; Burgees et al., 2003; Bazley und Gullick, 2005; Fuller et al., 2007].

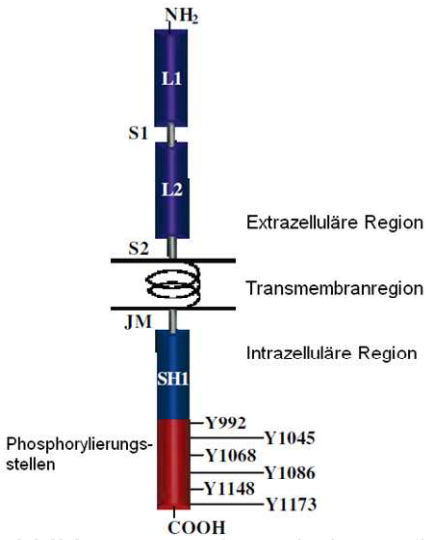


Abbildung 3 Schematischer Aufbau des EGFRs [modifiziert nach Bazley und Gullick, 2005]; L1, 2: Ligandenbindungsstellen; S1, 2: Cysteinreiche Domänen; JM: Juxtamembranregion; SH1: src homolge Domäne; Y: Tyrosinrest.

Die extrazelluläre Region des ErbB-Rezeptors ist glykosyliert. [Burgees et al., 2003]. Die Glykosylierungen werden für die Translokalisation der Rezeptoren an die Zelloberfläche und die anschließende Ausführung ihrer Funktion benötigt [Sebastian et al., 2006]. Die extrazelluläre Region des ErbB-Rezeptors ist aus vier verschiedenen Subdomänen aufgebaut. [Burgees et al., 2003; Bazley und Gullick, 2005; Sebastian et al., 2006]. Davon sind zwei, homologe große (L) Domänen und zwei, homologe cysteinreiche (CR) Domänen, die in der Reihenfolge L1-CR1-L2-

CR2 auftreten. Diese vier Domänen werden alternativ auch L1-S1-L2-S2 genannt [Burgees et al., 2003]. Die L-Domänen sind leucinreiche Domänen und bilden die Ligandenbindungsstellen [Bazley und Gullick, 2005; Fuller et al., 2007]. Die CR-Domänen bestehen aus kleinen Modulen, die untereinander durch eine oder zwei Disulfidbrücken quervernetzt sind [Burgees et al., 2003; Sebastian et al., 2006; Fuller et al., 2007]. Die Kristallstrukturen der extrazellulären Regionen der ErbB-Rezeptoren zeigen, dass ihre L- und CR-Domänen β-Helixfaltblattstrukturen einnehmen [Burgees et al., 2003; Fuller et al., 2007]. Die kurze α-helikale Transmembrandomäne ist reich an hydrophoben Aminosäuren und grenzt an der intrazellulären Seite an die Juxtamembranregion [Sebastian et al., 2006; Fuller et al., 2008]. Die Juxtamembranregion scheint, eine Zahl an regulatorischen Funktionen bei der Rezeptordimerisierung, Liganden-abhängigen Internalisierung, und Assoziation mit Proteinen, wie eps8 oder der interkompetitiven Assoziation mit Calmodulin und Proteinkinase C (PKC) zu haben [Sebastian et al., 2006]. Die katalytische Proteintyrosinkinase (PTK)-Subdomäne besitzt eine bilobäre Struktur, an der ATP gebunden werden kann [Fuller et al., 2008]. Die C-terminale Region besitzt sechs Tyrosintransphosphorylierungsstellen, welche bei der Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden und zur Rekrutierung von Adaptor/Effektorproteinen fähig sind [Bazley und Gullick, 2005; Sebastian et al., 200; Fuller et al., 2008]. Die zentrale Tyrosinkinasedomäne [scr homologe 1 (SH1) Domäne] ist für die Vermittlung der Transphosphorylierung von den sechs C-terminalen Tyrosinresten verantwortlich [Bazley und Gullick, 2005].

Humaner EGFR wird als ein aus 1210-Aminosäuren-bestehender Prorezeptor gebildet, der ein post translational-abgespaltenes N-terminales Signalpeptid aus 24 Aminosäuren inkludiert, um den Prorezeptor zu seiner korrekten zellulären Position in der Plasmamembran zu führen [Fuller et al., 2008]. Der reife EGFR besteht aus 1186 Aminosäuren [Sebastian et al., 2006; Fuller et al., 2008].

Der ErbB2-Rezeptor ist ein Transmembranglykoprotein mit 185 kDa, das aus 1255 Aminosäuren besteht [Bazley und Gullick, 2005]. Er ist in seiner Grundstruktur dem EGFR sehr ähnlich, aber kein Rezeptor im herkömmlichen Sinn, da bisher keine Liganden für den ErbB2-Rezeptor bekannt sind. Trotzdem besitzt er eine katalytisch aktive PTK-Subdomäne [Fuller et al., 2008]. Er ist ein Korezeptor, der mit anderen aktivierten ErbB-Familienmitgliedern dimerisiert [Bazley und Gullick et al., 2005; Fuller et al., 2008]. Die Kristallstrukturen der extrazellulären Domäne (ECD) von ErbB2-Rezeptoren lassen erkennen, dass in Abwesenheit von einer direkten Ligandenbindung der ErbB2-Rezeptor eine fixierte Konformation annimmt, die dem Liganden-aktivierten Status der weiteren ErbB-Mitglieder gleicht und als solcher permanent fähig ist, mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie zu

interagieren [Bazley und Gullick, 2005]. Der ErbB2-Rezeptor ist der bevorzugte Heterodimerisierungspartner von allen anderen ErbB-Rezeptoren und verstärkt deren Ligandenbindungsaffinität [Olayioye et al., 2000; Burgees et al., 2003; Gschwind et al., 2004; Bazley und Gullick, 2005; Fuller et al., 2008]. Dieses Phänomen kann durch die Bindungspräferenzen der bivalenten Liganden erklärt werden [Olayioye et al., 2000]. ErbB2/ErbB3-Heterodimere werden als die am häufigsten und mitogen-potentesten ErbB-Rezeptor/Ligand-Komplexe erachtet [Burgees et al., 2003]. Der ErbB2-Rezeptor reduziert die Rate von EGF (epidermaler Wachstumsfaktor-) Dissoziation vom EGFR, welches in einer verlängerten Aktivierung des EGFR-Signalweges resultiert. Die Konsequenz ist, dass Signale von ErbB2-Heterodimeren vermutlich stärker sind und länger anhalten als von anderen ErbB-Kombinationen [Fuller et al., 2008].
Der ErbB3-Rezeptor unterscheidet sich vom EGFR darin, dass obwohl er extrazelluläre Liganden bindet, seiner PTK-ähnlichen Subdomäne bestimmte entscheidende Aminosäuren fehlen, wodurch er katalytisch inaktiv ist. Die C-terminale Region enthält Tyrosinreste, die durch andere ErbB-Familienmitglieder durch Heterodimersierung phosphoryliert werden können [Fuller et al., 2008].

2.3.2. Liganden

Die vier ErbB-Rezeptoren werden zahlenmäßig von einer Vielzahl an extrazellulären Polypeptidliganden übertroffen, die an einen oder mehrere Rezeptoren binden können [Fuller et al., 2008]. Die Propeptidliganden werden normalerweise als Transmembranvorstufen synthetisiert, die anschließend proteolytisch gespalten werden [Olayioye et al., 2000; Fuller et al., 2008]. So entsteht aus einem Integralmembranprotein ein reifer Wachstumsfaktor mit 49 bis 85 Aminosäuren, der großteils aus einer EGF-ähnlichen Domäne besteht [Burgees et al., 2003]. Sie besteht aus drei durch Disulfidbrücken-vernetzten intramolekularen Domänen, die Bindungsspezifität gewähren, und zusätzlichen Strukturelementen, wie z.B. Immunglobulin-ähnlichen Domänen, Heparin-Bindungstellen und Glykosylierungsstellen [Sebastian et al., 2006]. Die Wachstumsfaktoren erreichen ihre Aktivität entweder in Lösung oder durch Bindung an Zelloberflächenproteoglykane [Bazley und Gullick, 2005]. Allerdings werden auch einige Wachstumsfaktoren sekretiert oder agieren in einer juxtakrinen Art.
Die 11 Liganden der ErbB-Rezeptoren können in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe mit EGF, Amphiregulin (AR), Epigen und transformierter Wachstumsfaktor–α (TGF-α) bindet spezifisch an den EGFR, während die zweite Gruppe mit Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Faktoren

(HB-EGF), Epiregulin (EPR) und Betacellulin (BTC) eine duale Spezifität für den EGFR und den ErbB4-Rezeptor aufweist. Die dritte und vierte Gruppe sind die Neureguline (NRG) oder Hereguline [Olayioye et al., 2000; Burgees et al., 2003; Sebastian et al., 2006; Fuller et al., 2008]. Sie sind Produkte von vier verschiedenen Genen (NRG1-NRG4) [Fuller et al., 2008]. NRG1 und NRG2 binden an den ErbB3- und den ErbB4-Rezeptor, während NRG3 und NRG4 nur an den ErbB4-Rezeptor binden [Olayioye et al., 2000; Burgees et al., 2003; Fuller et al., 2008]. Trotz der großen Zahl an Liganden, die für den ErbB1-, ErbB3- und ErbB4-Rezeptor identifiziert wurden, wurde noch kein direkter Ligand für den ErbB2-Rezeptor entdeckt [Olayioye et al., 2000; Burgees et al., 2003].
Signaldiversität, die von der ErbB-Familie ausgeht, wird durch das Repertoire an ErbB-Liganden und der Kombinationseigenschaften von induzierten Rezeptordimeren generiert [Olayioye et al., 2000]. So sind sie fähig einzigartige Signalantworten zu generieren [Burgees et al., 2003]. Mit der Ausnahme von EGF, welches in vielen Körperflüssigkeiten gefunden wird, agieren die ErbB-Liganden generell über kurze Distanzen als autokrine oder parakrine Wachstumsfaktoren. Die Verfügbarkeit von spezifischen Liganden ist deshalb ein Weg, um die Signalfähigkeit zu kontrollieren. In dieser Hinsicht demonstrieren die ErbB-Liganden unterschiedliche Expressionsmuster, die organ- und entwicklungsspezifisch sind [Olayioye et al., 2000].

2.3.3. Aktivierung der ErbB-Rezeptoren

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an die extrazelluläre Region der ErbB-Rezeptoren führt zur Bildung von Homo- und Heterodimeren aus den monomeren Rezeptoren, welche eine konformationelle Veränderung der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomänen induziert und so die Tyrosinkinaseaktivität der intrazellulären Domäne steigert. Die konformationelle Veränderung stabilisiert den aktiven Status der Kinase. Diese Positionierung ermöglicht es, dass Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne *trans*-autophosphoryliert werden [Olayioye et al., 2000; Burgees et al., 2003; Hubbard und Miller, 2007]. Diese und andere Phosphotyrosine dienen als Andockstelle für viele nachgeschaltete Signalproteine [Hubbard und Miller, 2007]. Zusätzlich können die ErbB-Rezeptoren auch durch Kinasen, wie Src oder Jak-2 transphosphoryliert werden [Jorissen et al., 2003]. Die meisten Tyrosinautophosphorylierungsstellen sind in den nichtkatalytischen Regionen des Rezeptormoleküls lokalisiert [Schlessinger, 2000]. Diese fungieren als Andockstellen für Src homologe-2 (SH2) oder Phosphotyrosinbindungsdomänen (PTB) [Schlessinger, 2000; Olayioye et al., 2000; Fuller et al., 2007; Hubbard und Miller, 2007]. Sekundäre Signalproteine erkennen

die standortspezifische Phosphorylierung und interagieren mit dem Rezeptor [Bazley und Gullick, 2005]. Sequenzunterschiede in der C-terminalen Regulationsregion der ErbB-Rezeptoren ergeben eine Vielfalt von Phosphotyrosinbindungstellen für die erwähnten Signalproteine (siehe 2.3.4) [Olayioye et al., 2000; Fuller et al., 2007].
Proteintyrosinphosphatasen (PTP) spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Aktivität der Rezeptoren und des Signalweges, den sie regulieren [Schlessinger, 2000]. Eine wichtige Phosphatase, die den EGFR spezifisch dephosphoryliert, ist die PTP1B [Tal et al., 2005; Zhu et al., 2007; Ishino et al., 2008; Eden et al., 2010; Yuan et al., 2010].

Extrazelluläre Aktivierung und Rezeptordimerisierung

In der Abwesenheit von Liganden befinden sich die monomeren Rezeptoren innerhalb der Zellmembran in einem inaktiven Zustand. Sobald ein Ligand in der Umgebung anwesend ist, wird die Rezeptorseite durch beispielsweise EGF besetzt. Sequentielle Rezeptordimeriserung und Oligomerisierung tritt auf [Bazley und Gullick, 2005]. Im autoinhibierten Zustand sind die Subdomänen L1 und L2 der ECD durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den Subdomänen CR1 und CR2 getrennt, welche die ECD in einer geschlossenen Konformation halten [Burgees et al., 2003; Fuller et al., 2008]. Diese Interdomänenanziehung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den cysteinreichen Regionen stabilisiert [Burgees et al., 2003]. Liganden binden unabhängig voneinander entweder an Subdomäne L1 oder aber bevorzugt an Subdomäne L3 der ECD mit einer geringen Affinität, aber diese Bindung bedingt eine Änderung in der Rezeptorkonformation [Sebastian et al., 2006; Fuller et al., 2008]. Diese Domänenneuanordnung resultiert in einer Ligandenbindung mit einer hohen Affinität an beide Subdomänen und in einem Bruch der intermolekularen Bindung zwischen Subdomäne CR1 und CR2 [Fuller et al., 2008]. Jeder Ligand bindet gleichzeitig an zwei Ligandenbindungsstellen in demselben EGFR-Molekül (siehe Abb. 4) [Burgees et al., 2003]. Die Konformationsänderung legt auch eine Dimerisierungsschleife in der Subdomäne CR1 (Aminosäuren 242-259 im EGFR) frei, welches folgende Homo- oder Heterodimerisierung erlaubt [Bazley und Gullick, 2005; Fuller et al., 2008]. Mutationen in dieser Region verhindern die Liganden-induzierte EGFR-Aktivierung komplett [Burgees et al., 2003].
Dimerisierungen könnten auch den direkten Kontakt zwischen den helikalen Transmembranregionen der Rezeptoren involvieren. Die Anziehungskräfte sind entweder Van-der-Waals-Interaktionen oder Wasserstoffbindungen [Bazley und Gullick, 2005].

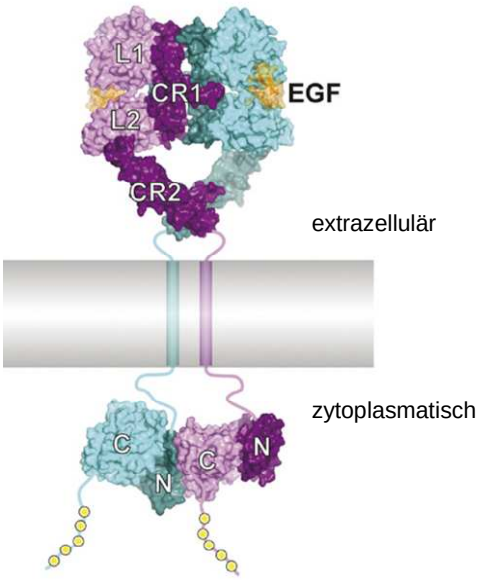


Abbildung 4 Struktur des EGFR-Homodimers mit zwei EGF Liganden [modifiziert nach Hubbart und Miller, 2000]; L1,2: Ligandenbindungsstellen; CR1,2: cysteinreiche Domänen; C: C-terminale Schleife; N: N-terminale Schleife.

Intrazelluläre Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität und Signalweiterleitung

Die Dimerisierung spielt auch eine wichtige Rolle in der Stimulierung der intrazellulären PTK-Aktivität der Rezeptoren. Im monomeren Status liegt die PTK-Subdomäne als eine inaktive autoinhibierte Konformation vor [Fuller et al., 2008]. Die Aktivierungsschleife, die sich innerhalb der zytoplasmatischen PTK-Domäne befindet, ist für Substrat und ATP unzugänglich und die entscheidenden katalytischen Seitenketten liegen in einer nicht-funktionellen Anordnung vor [Burgees et al., 2003; Bazley und Gullick, 2005]. Bei der Dimerisierung steigt die PTK-Aktivität effektiv an [Fuller et al., 2008]. Die Mehrheit der RTKs benötigen Tyrosinphosphorylierungen innerhalb ihrer Aktivierungsschleife für die katalytische Aktivität [Bazley und Gullick, 2005]. Aktivierungsschleifenphosphorylierung induziert normalerweise eine Änderung der Konformation, die die Inhibierung der Substratbindung entfernt und die katalytischen Gruppen ideal für den Phosphattransfer platziert [Burgees et al., 2003]. Die C-terminale Schleife von einem Monomer (Monomer 1) bindet an die N-terminale Schleife von einem anderen Monomer (Monomer 2). Monomer 1 agiert als ein allosterischer Aktivator von Monomer 2, indem eine Änderung der Konformation induziert wird, welche die α–C-terminale Helix von Monomer 2 in die korrekte Konformation für die Katalyse bringt [Olayioye et al., 2000; Hubbard und Miller, 2007; Fuller et al., 2008]. Dies erklärt auch, warum der ErbB3-Rezeptor mit seiner intrinsisch inaktiven Kinasedomäne fähig ist andere ErbB-Familienmitglieder in Heterodimeren zu aktivieren [Hubbard und Miller, 2007]. Viele Tyrosinreste in der C-terminalen

Region der ErbB-Rezeptoren sind dann durch die PTK-Subdomäne in dem Rezeptordimer *trans*-phosphoryliert und agieren als Bindungsstellen für Effektorproteine mit individuellen Phosphotyrosinresten [Fuller et al., 2008]. Die Tyrosineinheiten und die umgebenden Aminosäuren von jedem Mitglied der ErbB-Familie sind spezifisch maßgeschneidert, um mit einer einzigartigen Kollektion von sekundären Signalelementen zu interagieren, welche die spezifische biologische und biochemische Antwort präzise induzieren [Bazley und Gullick, 2005].

2.3.4. Adaptorproteine der aktivierten RTKs

Viele der Signalproteine, die SH2- und PTB-Domänen besitzen, enthalten intrinsische enzymatische Aktivitäten und Proteinmodule, die Interaktionen mit anderen Proteinen auslösen [Schlessinger, 2000]. Sie sollen das erhaltene Signal vom Rezeptor entweder ins Zytoplasma oder in den Zellkern weiterleiten [Bazley und Gullick, 2005]. Dies inkludiert Adaptorproteine, wie Shc, Crk, Grb2, Grb7 und Gab1, Kinasen wie Src, Chk und PI3K, und die PTPs SHP1 und SHP2 [Olayioye et al., 2000].

Die Spezifität der PTB-Domänenbindung wird durch die Sequenz Asn-Pro-X-pTyr (Asn: Asparaginsäure; Pro: Prolin; X: beliebige Aminosäure; pTyr: Phosphotyrosin) in dem N-terminalen Ende des aktivierten Rezeptors bestimmt [Bazley und Gullick, 2005; Schulze et al., 2005]. Umgekehrt bindet die SH2-Domäne spezifische Aminosäuresequenzen (1-6 Aminosäuren lang), die in der C-terminalen Sequenz direkt nach dem pTyr auftreten [Bazley und Gullick, 2005].

Eine große Familie von Proteinen, die SH2-Domänen beinhalten, besitzt intrinsische Enzymaktivitäten, wie PTK-Aktivität, PTP-Aktivität, Phospholipase-C-Aktivität oder Ras-GDP-Aktivität unter vielen anderen [Schlessinger, 2000]. Proteine, die SH2- oder SH3-Domänen enthalten, aber mangelnde enzymatische Aktivität haben, agieren als Adaptorprotein, wodurch der Rezeptor mit einer spezifischen Signalkaskade verbunden wird. Dies wird beispielsweise durch das Adaptorprotein Grb2 vermittelt [Bazley und Gullick, 2005]. Grb2 besteht aus zwei SH2-Domänen und einer SH3-Domäne, die seine Interaktion mit tyrosinphosphorylierten Motiven als auch mit prolinreichen Regionen von anderen Proteinen ermöglicht [Jorissen et al., 2003].

Alle ErbB-Familienmitglieder binden via Shc und/oder Grb2 an den MAPK-Signalweg [Olayioye et al., 2000]. Grb2 ist an den Ras Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos (Son of Sevenless) gebunden und befindet sich normalerweise im Zytosol [Jorissen et al., 2003; Bazley und Gullick, 2005]. Die SH2-Domäne von Grb2 kann an den aktivierten EGFR direkt *via* den Phosphotyrosinresten 1068 oder 1086, oder indirekt über eine Bindung an das, an

EGFR-assoziierte, tyrosinphosphorylierte Shc binden [Jorissen et al., 2003; Oda et al., 2005]. Shc ist durch seine PTB-Domäne mit EGFR verbunden. Es ist noch unklar, ob die beiden Arten der Bindung unterschiedliche Funktionen haben oder ob die Bevorzugung einer Bindung zellspezifisch ist [Jorissen et al., 2003]. In beiden Fällen wird die Relokalisation des Grb2/Sos-Komplexes an die Zellmembran und somit die Interaktion von Sos mit seinem Zielprotein Ras ermöglicht [Schlessinger, 2000; Jorissen et al., 2003; Bazley und Gullick, 2005].

2.4. Nachgeschaltete Signalwege

In Abhängigkeit von den Liganden und dem EGFR-Dimerisierungspartner können verschiedene Signalwege eingeschaltet werden [Sebastian et al., 2006]. Die bekanntesten inkludieren die MAPK-Kaskade und den PI3K-Signalweg, aber auch Phospholipase C-γ und der JAK/STAT Signalweg können aktiviert werden [Marshall, 1995; Sebastian et al., 2006]. Im Weiteren wird nur auf die MAPK-Kaskade eingegangen, da die anderen in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

2.4.1. MAPK-Kaskade

MAPKs interagieren untereinander und mit anderen Zellsignalsystemen. Dieser sogenannte Crosstalk zwischen den Signalwegen ist wichtig für eine koordinierte Antwort von Zellen [Robinson und Cobb, 1997]. Die MAPK-Kaskaden spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Genexpression und bei zytoplasmatischen Aktivitäten, wodurch metabolische Prozesse, Zellzyklus, Zellmigration und Zellform, als auch die Zellproliferation und Differentiation kontrolliert werden [Schaeffer und Weber, 1999; Schlessinger, 2000].

Es gibt vier Kaskaden, die durch verschiedene Stimuli aktiviert werden: die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase/mitogen-aktivierte Proteinkinase (ERK/MAPK) 1/2, die vor allem Zellwachstum und Differenzierung reguliert, c-Jun Amino-terminale Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase (JNK/SAPK), p38/HOG und die große Mitogen-aktivierte Proteinkinase/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (BMK/ERK) 5 [Robinson und Cobb, 1997; Schaeffer und Weber, 1999; Hazzalin und Mahadevan; 2002]. JNK/SAPK und p38 werden als Antwort auf Stress gebildet und steuern Entzündungen und Apoptose [Robinson und Cobb, 1997; Schaeffer und Weber, 1999]. Im Folgenden wird ausschließlich das mitogen-aktivierte Modul behandelt, da es in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

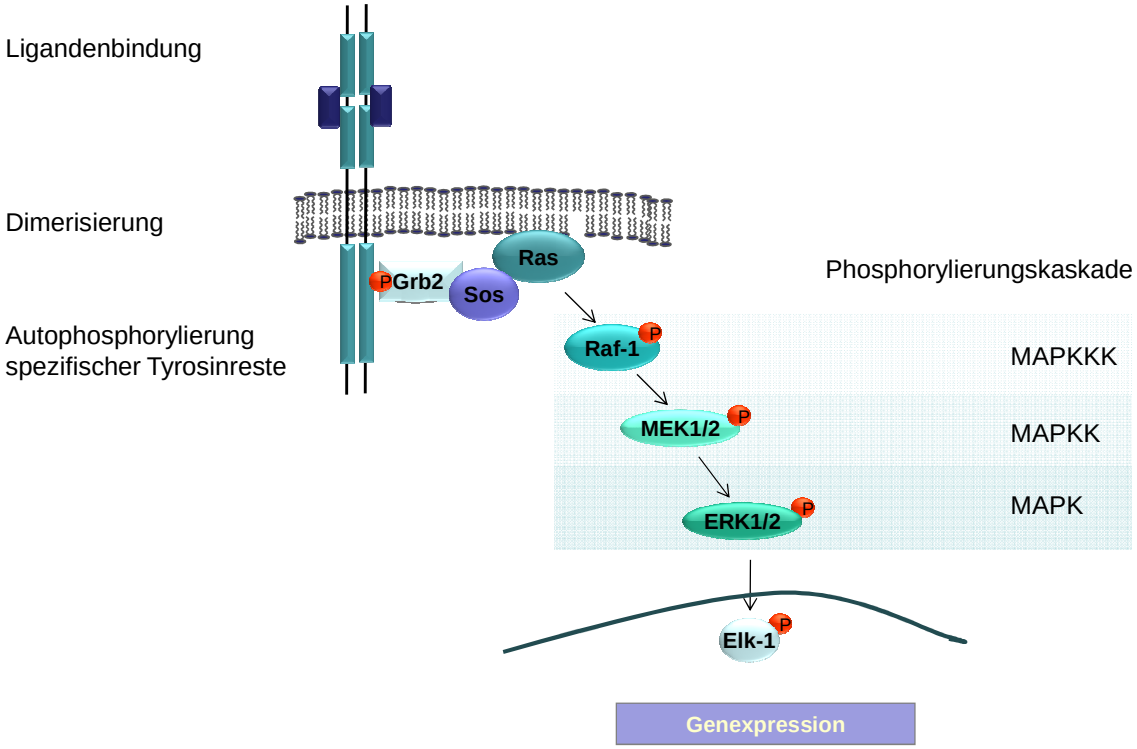


Abbildung 5 Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK)-Signalweg. Elk-1: Ets ähnliche Kinase 1; ERK1/2: Extrazellulär-regulierte Kinase 1/2; Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MAPKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase; MAPKKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase; MEK 1/2: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 1/2; Ras: Rat sarcoma; Sos: Son of sevenless; P: Phosphotyrosin.

Alle ErbB-Rezeptoren aktivieren die ERK1/2 MAPK-Kaskade (siehe Abb. 5), eine lineare drei-Schritt-Proteinkinase-Signalabfolge, die aus der Raf MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), der MAPK-Kinasen (MAPKK) MEK1 und MEK2 und den MAPKs ERK1 und ERK2 besteht. Adaptorproteine, wie Grb2 durch seine SH2-Domäne oder die Shc-Proteine durch ihre SH2/PTB-Domänen binden an spezifische Phosphotyrosinstellen im ErbB-Rezeptor. Die Shc-Proteine können durch die ErbB-Rezeptoren tyrosinphosphoryliert werden, so dass Grb2 oder andere Adaptoren auch an diese binden können. Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos besteht aus einem Komplex mit Grb2. Die Bindung von Grb2-Sos an die ErbB-Rezeptoren positioniert Sos an die Plasmamembran und ermöglicht seine Translokation, wobei es Ras aktiviert. Durch die Nähe kann der Austausch von GTP (Ras-GTP) durch GDP (Ras-GDP) in Ras katalysiert werden [Schlessinger, 2000; Gschwind et al., 2004; Fuller et al., 2008; Shin et al., 2009]. Aktiviertes GTP-gebundenes Ras binden die Raf-Kinase mit hoher Affinität und bedingt dessen Translokation zur Zellmembran, wo die Aktivierung stattfindet [Kolch, 2000; Shin et al., 2009]. Aktiviertes Raf stimuliert die MAPKK MEK-1 und MEK-2 durch Phosphorylierung von zwei Serinresten in der Aktivierungsschleife [Kolch, 2000; Schlessinger, 2000]. In unstimulierten Zellen liegen ERK1/2 im Zytoplasma vor und sind an das

Mikrotubulizytoskelett assoziiert [Khokhlatchev et al., 1998]. ERK1 und ERK2 weisen eine Strukturhomologie von 85 % mit einer höheren Übereinstimmung in der Region, die in der Substratbindung involviert ist, auf [Pearson et al., 2001]. Die beiden Isoformen von MEK, die Threonin und Tyrosin phosphorylieren können, aktivieren die MAPK ERK-1 und ERK-2 durch die Phosphorylierung einer Thr-Glu-Tyr-Einheit (Thr: Threonin; Glu: Glutamin; Tyr: Tyrosin) in der Aktivierungsschleife [Kolch, 2000]. ERK1/2, auch p44- und p42-MAPK genannt, sind Serin/Threonin-Kinasen mit mehr als 70 Substraten [Kolch, 2000; Shin et al., 2009]. Aktiviertes ERK1/2 phosphoryliert eine Vielzahl von zytoplasmatischen und membrangebunden Substraten (z.B. EGFR, Sos), wodurch es zu einer negativen Rückkopplung kommt [Schlessinger et al., 2000; Shin et al., 2009]. Zusätzlich translozieren ERK1/2 schnell in den Kern, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren [Karin und Hunter, 1995; Schlessinger et al., 2000]. ERK1/2 binden an den Transkriptionsfaktor Elk-1 über die sogenannte D Domäne von Elk-1 (Aminosäuren 310 bis 334) und phosphorylieren ihn [Karin, 1995; Schaeffer und Weber, 1999]. Phosphorylierung von Elk-1 ermöglicht die Bindung an die Promotorregion des SRE (serum responsive element), wodurch die Transkription von Onkogenen (z.B. c-fos) und anderen Proteinen (z.B. Cyclin D1) stimuliert werden kann [Karin, 1995; Treisman, 1996; Hazzalin und Mahadevan, 2002]. Aktiviertes ERK2, das an Tyrosin und Threonin phosphoryliert ist, bildet Dimere mit phosphorylierten und unphosphorylierten ERK2-Partnern. Die Dimerbildung scheint für die Akkumulierung in den Nukleus wichtig zu sein [Kholhlatchev et al., 1998].

2.5. Polyphenole

Epidemiologische Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Konsumation von Früchten oder Fruchtgetränken und der Prävention von Erkrankungen, wie z.B. Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen, hin [World Cancer Research Fund, 1999; Arts und Hollmann, 2005; Manach et al., 2005].

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe und zeigen eine große Diversität von Strukturen, die von einfachen Molekülen (Monomere und Oligomere) bis zu Polymeren reichen [Cheynier, 2005; Miniati, 2007]. Charakteristischerweise besitzen alle eine aromatische Ringstruktur mit mindestens einer Hydroxylgruppe [Arts und Hollmann; 2005].

Die Einteilung der Polyphenole erfolgt in Flavonoide, Phenolsäuren, Phenolische Alkohole und Nichtflavonoide (z.B. Stilbene und Lignane) [Scalbert und Williamson, 2000; Manach et al., 2004; Cheynier, 2005; D`Archivio et al., 2007].

Polyphenole sind in Früchten, Gemüse, Kräutern, Getreide und Saaten, und verarbeitetem Essen, wie in Säften, Weinen, Öl etc., weit verbreitet [Miniati, 2007]. Die Gesamtaufnahme wird auf 1 g/Tag pro Person geschätzt, hängt aber stark von den Ernährungsgewohnheiten ab. Phenolische Säuren sorgen für ungefähr ein Drittel der Gesamtaufnahme von Polyphenolen, und Flavonoide für zwei Drittel. Die Hauptklassen der Flavonoiden sind dabei Flavanole, Anthocyane und ihre Oxidationsprodukte [Scalbert und Williamson, 2000].
Die pflanzliche Polyphenolverteilung ist sehr unterschiedlich. Einige Verbindungen kommen ubiquitär vor, während andere nur in spezifischen Familien oder Spezies (z.B. Isoflavone in Leguminosen) zu finden sind. Innerhalb einer einzelnen Spezies können große Variationen auf Grund genetischer Faktoren, Umweltbedingungen und Wachstums- oder Reifungsphase auftreten [Cheynier, 2005; Harnly et al., 2006].

2.5.1. Flavonoide

Die größte Gruppe der Polyphenole, die in der Humanernährung vorkommen, sind die Flavonoide (Gehalte siehe Tab. 1) [Scalbert und Williamson, 2000]. Flavonoide teilen sind ein allgemeines Strukturelement, das Flavan, das aus zwei phenolischen Ringen und einem oxygenierten Heterozyklus besteht (siehe Abb. 6) [Cheynier, 2005; Harnly et al., 2006].

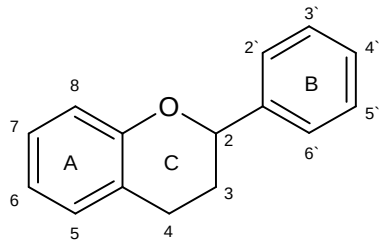
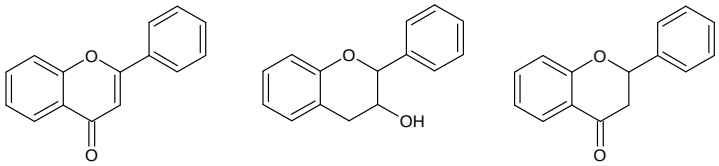


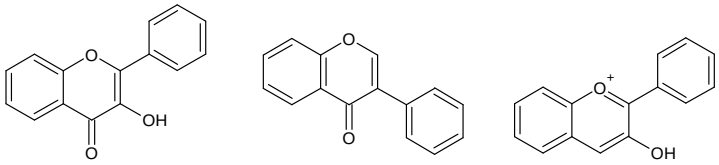
Abbildung 6 Grundgerüst des Flavonoide; Flavan (2-Phenylchroman).

Flavonoide werden in verschiedene Gruppen eingeteilt, die sich im Oxidationsstatus des heterozyklischen Pyranringes unterscheiden (siehe Abb. 7): Flavone, Flavonole, Isoflavone, Anthocyane, Flavanole (Catechine und Procyanidine) und Flavanone [Scalbert und Williamson, 2000; Williams und Grayer, 2004; Cheynier, 2005; D`Archivio et al., 2007]. Es wurden bisher mehr als 9000 Flavonoide in Pflanzen identifiziert [Williams und Grayer, 2004]. Die strukturelle Diversität ist gegeben, da nicht nur Unterschiede in der Struktur des Kohlenstoffskeletts und dem Oxidationsstatus des Heterozyklus von Flavonoiden, sondern auch verschiedene Substitutionsmuster auftreten. Die Hydroxylgruppen können durch Glykosylgruppen ersetzt oder mit phenolischen Säuren acetyliert

werden [Scalbert und Williamson, 2000; Manach et al., 2004; Williams und Grayer, 2004; Cheynier, 2005]. Außerdem liegen Flavanole auch als Oligomere und Polymere vor, welche als kondensierte Tannine oder Procyanidine bezeichnet werden [Cheynier, 2005].



Flavon Flavan-3-ol Flavanon



Flavonol Isoflavon Anthocyanidin

Abbildung 7 Grundstrukturen der Flavonoide [modifiziert nach Manach et al., 2004].

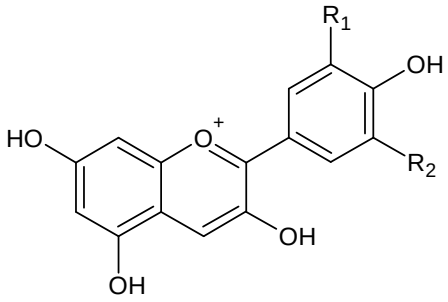
Die meisten Polyphenole sind glykosyliert, mit Ausnahme der Flavan-3-ole, die meist als Aglyka oder mit Gallussäure verestert vorliegen [Scalbert und Williamson, 2000]. Der Zucker ist oft Glucose oder Rhamnose, kann aber auch Galactose, Arabinose, Xylose, Glucoronsäure oder ein anderer Zucker sein. Die Grundstruktur ist meist mit einem Zucker am C-3 beta-ständig verknüpft, es können aber auch mehrere Zucker gebunden sein. Die Glykosylierung beeinflusst die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Polyphenole [Scalbert und Williamson, 2000].

Tabelle 1 Flavonoidgehalte [modifiziert nach Manach et al., 2004].

Verbindungsklasse		Quelle	Flavonoidgehalt [mg/100 g Frischgewicht oder mg/100 ml]
Anthocyane	Cyanidin	Brombeere	100-400
	Pelargonidin	schwarze Johannesbeere	130-400
	Peonidin	Heidelbeeren	25-500
	Delphinidin	rote Weintrauben	30-750
	Malvidin	Kirsche	35-450
Flavonole	Quercetin	Zwiebel	35-120
	Kaempferol	Grünkohl	30-60
	Myricetin	Lauch	3-22
Flavone	Apigenin	Petersilie	24-185
	Luteolin	Selerie	2-14
Flavanone	Hesperetin	Orangensaft	20-70
	Naringenin	Grapefruitsaft	10-65
Isoflavone	Daidzein	Sojamehl	80-180
	Genistein	Sojabohnen, gekocht	20-90
Monome Flavanole	Catechin	Bohnen	35-55
	Epicatechin	Marille	10-25

2.5.1.1. Anthocyane

Anthocyane sind die wichtigste Gruppe von wasserlöslichen Pigmenten in Pflanzen und lösen rote, violette oder blaue Färbung von Früchten und Gemüse aus [Clifford, 2000a; Cheynier, 2005; Wu et al., 2006; Wang und Stoner, 2008]. Sie kommen in Kirschen, Zwetschken, Erdbeeren, Himbeeren, Brombeeren, Weintrauben, Ribisel und schwarzen Johannesbeeren vor (siehe Tab. 1) [Scalbert und Williamson, 2000; Wang und Stoner, 2008]. Die tägliche Aufnahme von Anthocyanen pro Einwohner soll in den USA 12,5 mg und in Deutschland 2,7 mg betragen [Wu et al., 2006; Watzl et al., 2002]. Die mittlere Aufnahme in Finnland wird auf 82 mg/Tag geschätzt [Manach et al., 2005]. Diese Werte können jedoch durch Nahrungsergänzungsmittel bei weitem übertroffen werden [Wu et al., 2006].



Name	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH_3	H
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH_3	H
Malvidin	OCH_3	OCH_3

Abbildung 8 Grundstruktur der Anthocyanidine (2-Phenyl-benzo[b]pyran).

Anthocyane, Derivate von 2-Phenyl-benzo[b]pyran (siehe Abb. 8), kommen natürlich in Früchten und Gemüse als Glykoside, mit Glucose, Galactose, Rhamnose, Xylose oder Arabinose an das Aglykon gebunden, vor [Hou et al., 2004; Keppler und Humpf, 2005; Wang und Stoner, 2008]. Es handelt sich meist um 3-Glykoside oder 3,5-Diglykoside [Kowalczyk et al., 2003; Wang und Stoner, 2008]. Im Unterschied zu den anderen Flavonoiden tragen die Anthocyane eine positive Ladung in saurer Lösung und liegen als Kationen vor [Hou et al., 2004; Wang und Stoner, 2008]. Sie sind wasserlöslich und in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Anwesenheit von chelatisierenden Metallionen unterschiedlich gefärbt. Die deglykosylierte Form, das Aglykon der Anthocyane, wird als Anthocyanidin bezeichnet und wird kaum in pflanzlichem Material gefunden [Kowalczyk et al., 2003; Hou et al., 2004; Keppler und Humpf, 2005; Wang und Stoner, 2008]. Die sechs häufigsten Anthocyan-Grundstrukturen sind Cyanidin, Delphinidin, Pelargonidin, Malvidin, Petunidin und Peonidin [Hou et al., 2004; Wang und Stoner, 2008].

Die Anthocyane kommen in den Vakuolen im Gleichgewicht von vier Molekülspezies vor [Clifford, 2000a; McGhie und Walton, 2007]. Diese sind die rot gefärbte Hauptstruktur des Flavyliumkations und drei sekundäre Strukturen

[Clifford, 2000a]. Das rote Flavyliumkation ist die häufigste molekulare Form, bei pH < 2. Wenn der pH-Wert ansteigt, verliert es schnell ein Proton und die blaue Chinoid-Struktur wird gebildet. Gleichzeitig tritt auch eine viel langsamere Hydratisierung auf, wobei aus dem Flavyliumkation die farblose Hemiketal-Form erhalten wird, die durch eine Ringöffnung am C-Ring weiter zum Chalcon (*cis* und *trans*) tautomerisiert [McGhie und Walton, 2007]. Anthocyane sind sehr reaktive Spezies. Wenn sie in Wasser aufgelöst werden, wird das rote Flavyliumkation in einige andere Formen über Protonentransfer und Hydratisierungsreaktionen umgewandelt [Cheynier, 2005]. Die Formen, die im Gastrointestinaltrakt auftreten sind noch nicht genau bekannt. Es ist möglich, dass das Kation nur im Magen (pH-Wert im Bereich von 1-2) existiert und die anderen Formen im unteren Teil des Gastrointestinaltrakts (Dünn- und Dickdarm mit einem neutralen pH-Wert) überwiegen (und in den Geweben, wenn sie absorbiert werden) [Clifford, 2000a; McGhie und Walton, 2007]. Der generelle Effekt des pH-Wertes auf das Gleichgewicht für ein nicht-acyliertes Monoglykosid ist in Abbildung 9 gezeigt [Clifford, 2000a].

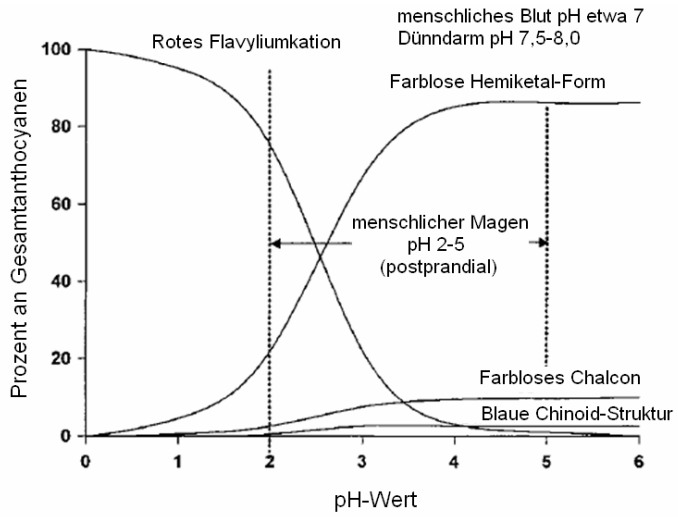


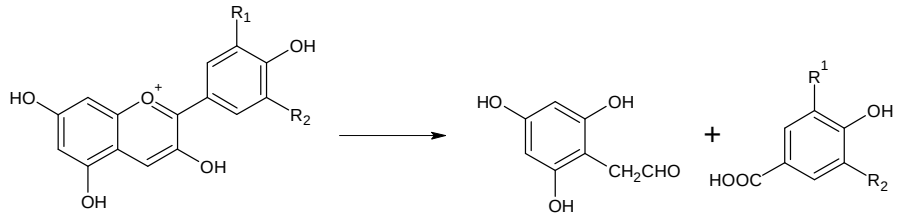
Abbildung 9 Effekt des pH-Wertes auf das Anthocyan-Gleichgewicht [modifiziert nach Clifford, 2000a].

2.5.1.2. Bioverfügbarkeit der Anthocyane

Die Bioverfügbarkeit des intakten phenolischen Pflanzenstoffes ist ein fundmentaler Faktor für seine biologischen Funktionen [Scalbert und Williamson, 2000; Keppler und Humpf, 2005]. Die Bioverfügbarkeit hängt von endogenen und exogenen Faktoren ab. Die endogenen scheinen mit der Matrix, Größe, chemischen Struktur und der aufgenommen Menge verknüpft zu sein, während die exogenen die

Enzymaktivitäten, Gallenexkretion und Biotransformation in der Leber, Niere, Gastrointestinalepithel und Darmmikroflora beinhalten [Azzini et al., 2007].
Die Bioverfügbarkeit der Anthocyane liegt meist bei unter 0,1 % der verabreichten Dosis in Humanstudien und verschiedenen Tiermodellen [Manach et al., 2004; Kay et al., 2005; McGhie und Walton, 2007]. Bioverfügbarkeitsstudien zeigen, dass die Anthocyane schnell im Kreislaufsystem und in verschiedenen Geweben auftauchen [McGhie und Walton, 2007]. Die höchsten Plasmakonzentrationen sind im Durchschnitt nach 1,5 h zu detektieren [Manach et al., 2004; Kay et al., 2005]. Daraus wird gefolgert, dass Anthocyane im Magen und auch im Dünndarm absorbiert werden könnten [McGhie und Walton, 2007]. Die Aglyka, die Anthocyanidine, könnten die Zellmembran durchdringen und so im Magen und Dünndarm absorbiert werden. Jedoch liegen die meisten Verbindungen in Form ihrer Glykoside vor und können nicht passiv durch die Zellen diffundieren [Clifford, 2000a; Manach et al., 2004; Miniati, 2007]. Aber es muss andere Mechanismen geben, da einige Tierstudien die Absorption der intakten Glykoside nachweisen konnten [Tsunda et al., 1999; Matsumoto et al., 2001; McGhie und Walton, 2007]. Die Wechselwirkung der Anthocyane mit der Bilitranslocase wird als möglicher Mechanismus für die Absorption im Magen diskutiert [Passamonti et al., 2002]. Einige Studien gehen auch davon aus, dass der Natrium-Glucose-Kotransporter (SGLT1) an der Absorption im Jejunum beteiligt sein könnte [Clifford, 2000a; McGhie und Walton, 2007]. Weiters gibt es Anhaltspunkte, dass einige Flavonoidglykoside im Dünndarm hydrolysiert werden. Wenn die Glykoside in die Enterozyten gelangen können, werden sie durch β-glykosidische Enzyme hydrolysiert. Die Lactasephloridzinhydrolase (LPH) soll diese Hydrolyse zumindest bei einigen Flavonoidglykosiden bedingen, unklar ist noch in wieweit dies auch die Anthocyane betrifft [Walle, 2004].
Die Absorption der Anthocyane ist meist gering und hängt sowohl von der Grundstruktur als auch von den gebundenen Zuckern, sowie der Anwesenheit von acetylierten Gruppen ab [Clifford, 2000a; Scalbert und Williamson, 2000; Miniati, 2007]. In Ratten werden beispielsweise Delphinidinglykoside besser als Malvidinglykoside und Galactoside besser als Arabinoside absorbiert [McGhie et al., 2003]. Die absorbierten Moleküle treten nach der Passage durch die Leber in den systemischen Kreislauf ein, wo sie möglicherweise metabolisiert werden und über den Urin ausgeschieden werden [Miniati, 2007; McGhie und Walton, 2007]. Im Plasma wurden Methylderivate und Glycuronsäurekonjugate in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen, während Sulfatkonjugate und die Aglyka nicht aufgetreten sind [Keppler und Humpf, 2005; Kay et al., 2005]. Trotz der geringen Bioverfügbarkeit können verschiedene Studien Plasmakonzentrationen der

Anthocyane im nM-Bereich nachweisen [Cooke et al., 2006; Thomasset et al., 2009]. Auch die Ausscheidung über den Urin wird meist als gering beschrieben und liegt in den meisten Studien bei unter 0,1 % der verabreichten Dosis [Manach et al., 2004; Manach et al., 2005; McGhie und Walton, 2007]. Cooke et al. (2006) konnten auch im Urin Anthocyankonzentrationen von einigen µM nach der Verabreichung eines Heidelbeerextrakts an *Apc*^{Min}-Mäusen detektieren.
Die nichtabsorbierten Anthocyane gelangen nach der Dünndarmpassage in den Kolon. In einer Humanstudie zeigten Kahle et al. (2006), dass bis zu 85 % der verabreichten Anthocyane unmetabolisiert den Kolon nach dem Konsum von Heidelbeeren erreichen.



Anthocyanidin | Phloroglucinolaldehyd | Phenolische Säure

Anthocyanidin	korrespondierende phenolische Säure
Cyanidin	Protocatechussäure
Malvidin	Syringasäure
Peonidin	Vanillinsäure
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoesäure
Delphinidin	Gallussäure

Abbildung 10 Zerfall der Anthocyane und Bildung der korrespondierenden phenolischen Säuren [modifiziert nach Fleschhut et al., 2006].

Im Kolon spalten die Mikroorganismen Glykosid- und Methylbindungen und setzen Anthocyanidine frei. Diese sind unter sauren Bedingungen stabil, jedoch unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH-Wert instabil und zerfallen zu Phenolsäuren und Aldehyden durch die Spaltung des Kohlenstoffringes (siehe Abb. 10) [Keppler und Humpf, 2005; Fleschhut et al., 2006]. Die entstehenden Phenolsäuren variieren je nach Anthocyan-Grundstruktur, während der Aldehyd immer Phloroglucinolaldehyd ist [Kern et al., 2007].
Die Wiederfindung im Fäzes ist sehr niedrig. Diese Resultate lassen eine extensive Biotransformation der Anthocyane nach der oralen Aufnahme und Absorption vermuten [Keppler und Humpf, 2005].
Obwohl die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen gering erscheint, könnte sie unterschätzt worden sein. Der Hauptgrund ist, dass wichtige Metabolite nicht berücksichtigt wurden und die Analysenmethoden optimiert werden sollten. In den meisten Studien werden Analysen mit UV-Detektion durchgeführt, welche nur das

gefärbte Flavyliumkation, aber nicht die weiteren Formen, detektieren [Manach et al., 2005].

2.5.1.3. Biologische Effekte der Anthocyane

Während der letzten zwei Dekaden hat eine wachsende Anzahl an Studien die verschiedenen Gesundheitsvorteile und Schutzeffekte von Anthocyanen in verschiedenen Früchten und Gemüse untersucht. Die therapeutischen Nutzen, die den Anthocyanen zugerechnet werden, beinhalten antioxidativen Schutz und die Erhaltung der DNA-Integrität [Bagchi et al., 2004]. Die antioxidative Funktion wird mit ihren antiarteriosklerotischen, antikanzerogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften verknüpft [Keppler und Humpf, 2005]. Eine erfolgsversprechende Strategie der Chemoprävention beschäftigt sich mit dem Einfluss von Beereninhaltsstoffen auf die RTKs.
Im Besonderen soll hier die Wirkung auf RTKs diskutiert werden, da sie Gegenstand der vorliegenden Diplomarbeit sind.

In vitro

Die Aglyka Cyanidin (Cy), Delphinidin (Del) und Malvidin (Mv) führen zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Wachstums in verschiedenen humanen Tumorzelllinien. Die potenteste Wachstumshemmung zeigten Del und Cy, gefolgt von Mv [Meiers et al., 2001; Marko et al., 2004]. Die weiteren Anthocyanidine Peonidin (Pn) und Pelargonidin (Pg) hemmten das Wachstum ebenfalls, aber weniger stark, wodurch sich eine Abhängigkeit vom Substitutionsmuster am B-Ring ableiten lässt [Marko et al., 2004]. Für die potente Wachstumshemmung scheinen freie Hydroxygruppen am B-Ring essentiell zu sein. Del, eine Verbindung mit vier Hydroxygruppen, besitzt die größten Wachstumshemmeffekte. Eine Abnahme der Anzahl an Hydroxygruppen, wie in Cy, reduziert signifikant die Wachstumshemmung. Methoxygruppen in der 3`- und 5`-Position verringerten ebenfalls die Hemmeigenschaften stark. Die Glykoside Cyanidin-3-galactosid (Cy-3-gal) und Malvidin-3-glucosid (Mv-3-glc) hatten bis zu Konzentrationen von 100 µM keine Hemmeffekte auf die beiden Zelllinien LXFL529L (großzellinge humane Lungenxenograft-Zelllinie) und A431 (humane Vulvacarzinomzellinie). Gebundene Zucker in Position 3 eliminieren die Wachstumshemmung möglicherweise auf Grund einer limitierten Aufnahme in die Zelle [Meiers et al., 2001]. Anthocyanidine scheinen daher potentere Inhibitoren als Anthocyane zu sein. Die Zellproliferation wird durch die Fähigkeit der Anthocyane, verschiedene Phasen des Zellzyklus zu blockieren, gehemmt [Wang und Stoner, 2008].

Die Unterdrückung der Aktivierung des EGFRs wird mit einer Wachstumshemmung in Tumorzellen assoziiert [Meiers et al., 2001; Depeint et al., 2002].
Eine Reihe von Anthocyanidinen konnte als potente Inhibitoren der EGFR-Aktivität im zellfreien System nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine Struktur-Wirkungsbeziehung, wie sie auch schon bei der Wachstumshemmung sichtbar wurde. Die Anwesenheit von vicinalen Hydroxysubstituenten am B-Ring ist bedeutend für die Interaktion mit dem EGFR, während eine einzelne Hydroxygruppe, sowie die Anwesenheit von Methoxygruppen die EGFR-Hemmwirkung fast komplett vermindert [Marko et al., 2004, Teller et al. 2009b]. Auch im zellulären System zeigten Anthocyanidine potente inhibitorische Effekte dem EGFR gegenüber. Die Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit Del resultiert in einer konzentrationsabhängigen Hemmung der EGFR-Phosphorylierung mit einem IC_{50}-Wert von 54 ± 11 µM. Auch in A431-Zellen unterdrückt Del die Aktivität des EGFRs. Darüber hinaus wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der ErbB2-Rezeptorphosphorylierung in A431-Zellen detektiert. Das methoxylierte Anthocyanidin Mv beeinflusst die Autophosphorylierung dieser beiden RTKs bis zu einer Konzentration von 100 µM nicht. Dem EGFR-nachgeschaltete Signalelemente sind ERK1/2, die über die MAPK-Kaskade, die das Zellwachstum reguliert, aktiviert werden (siehe 2.4.1.). Del reduziert auch phosphoryliertes ERK1 und ERK2 in HT29-Zellen bei einer Konzentration von 30 µM signifikant, wodurch eine Weiterleitung des gesetzten Signales sichtbar wird [Fridrich et al., 2008]. Afaq et al. (2008) zeigten ebenso eine konzentrationsabhängige Verringerung der EGFR-Aktivität und MAPK-Phosphorylierung durch Del nach 3 h Inkubation in humanen Brustkrebszellen AU-565 und humanen MCF-10A-Zellen.
Der Zerfall der Anthocyane und die Bildung der phenolischen Säuren während der Inkubation von HT29-Zellen wurden mit HPLC/DAD bestimmt. DEL war nach 30 Minuten der Inkubation nicht mehr detektierbar. Ein beträchtlicher Abbau war auch für die anderen Anthocyanidine Cy, Pg, Pn und Mv beobachtbar [Kern et al., 2007]. Dies muss bei der Inkubation mit den verschiedenen Anthocyanidinen berücksichtigt werden und die Inkubationszeit dementsprechend kurz gehalten werden.
Del inhibiert nicht nur die Kinaseaktivität des EGFRs potent, sondern auch weitere strukturverwandte Rezeptoren (ErbB2-, ErbB3-Rezeptor, VEGFR-2, VEGFR-3 und IGF-1R), so dass hier eine Breitbandhemmung von RTKs vermutet werden kann. In A431-Zellen wurde die EGF-stimulierte Phosphorylierung von EGFR (IC_{50} = 33 ± 14 µM) und ErbB2-Rezeptor (IC_{50} = 51 ± 23 µM) in einem vergleichbaren Masse unterdrückt, während die Heregulin-stimulierte Aktivierung des ErbB3-

Rezeptors (IC_{50} ~ 0,1 µM) noch effektiver gehemmt wurde. Zusätzlich nimmt der endogene Proteinstatus des ErbB3-Rezeptors konzentrationsabhängig ab einer Konzentration von 0,1 µM ab, während jene von EGFR und ErbB2-Rezeptor unverändert bleiben. Dieses lässt darauf schließen, dass auch die Endozytose beeinflusst werden könnte [Teller et al., 2009b]. Lamy et al. (2008) konnten zusätzlich die Inhibierung der Phosphorylierung von PDGFR-β durch Del in humanen Endothelzellen (HUVEC) nachweisen.
Innerhalb der RTK-Familie sind die VEGFRs Schlüsselregulatoren der Angiogenese und Lymphangiogenese. In Schweineaorten-Endothelzellen (PAE), die mit VEGFR-2 und -3 transfiziert wurden, reduzierte Del den Phosphorylierungsstatus von VEGFR-2 ab einer Konzentration von 5 µM (IC_{50} ~ 50 µM). Ein noch größerer Effekt von Del auf die Liganden-induzierte VEGFR-3-Phosphorylierung wurde mit einer kompletten Hemmung bei 50 µM beobachtet [Teller et al., 2009b]. Lamy et al. (2006) konnten ebenfalls die Inhibierung der VEGFR-2-Phosphorylierung durch Del in HUVEC-Zellen nachweisen.
Vergleichbare Effekte, wie jene von Del, wurden mit komplexen anthocyanreichen Extrakten gezeigt [Teller et al., 2009a].
Den RTK innerhalb der MAPK-Kaskade nachgeschaltet ist der Transkriptionsfaktor Elk-1 (siehe 2.4.1.). Die Phosphorylierung von Elk-1 wurde mit einem Reportergenassay untersucht. 30 µM Del konnten die Luciferaseaktivität auf 50 % senken. Cy und Mv waren weniger aktiv, zeigten aber auch eine konzentrationsabhängige Hemmung der Luciferaseexpression. Durch die Behandlung mit Cy-3-gal und Mv-3-glc bis 100 µM wurde keine signifikante Hemmung erreicht, während Cy-3-gal die Luciferaseaktivität bei Konzentrationen über 20 µM signifikant erhöhte [Meiers et al., 2001]. Das Signal wird von den Rezeptoren, über die MAPK-Kaskade bis zu dem Transkriptionsfaktor Elk-1 weitergeleitet.
Anthocyane und Anthocyanidine zeigen also *in vitro* inhibitorische Effekte auf verschiedene RTKs und nachgeschaltete Elemente wichtiger zellulärer Signalkaskaden.

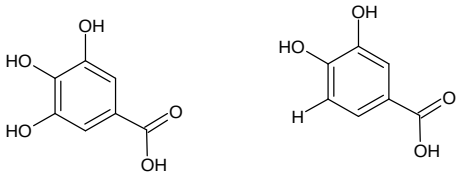
In vivo

In vivo zeigten Apc^{Min}-Mäuse, die ein gut etabliertes Modell der humanen Kolonkarzinogenese darstellen, bei der Fütterung mit Anthocyanen oder Cy signifikant weniger Adenome im Caecum als jene Mäuse, die eine Kontrolldiät erhielten. Die Adenomanzahl im Kolon und die Tumorhäufigkeit im Dünndarm wurde in dieser Studie durch die Behandlung nicht signifikant beeinflusst [Kang et al., 2003]. In einem anderen Versuch wurde die Nahrung von 4 Wochen alten

Apc^{Min}-Mäusen mit einer anthocyanreichen Mischung aus der Heidelbeere, oder Cy-3-glc für 12 Wochen supplementiert. In beiden Fällen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Adenome im Dünndarm. Bei der höchsten Konzentration (0,3 %) von Cy-3-glc und dem Beerenextrakt wurden die Adenomanzahl um 45 % bzw. um 30 % im Vergleich zur Kontrolle verringert [Cooke et al., 2006]. Die Studien zeigten ebenfalls, wie die *in vitro* Versuche, eine wachstumshemmende Wirkung auf die Adenome im Tiermodell. Dies könnte auf ein mögliches chemopräventives Potential von Anthocyanen oder anthocyanreichen Mischungen hindeuten.
Im Gegensatz zu den *in vivo* Tiermodelstudien haben epidemiologische Studien in Menschen bisher keine überzeugenden Beweise für die anti-kanzerogenen Effekte von Anthocyanen liefern können. Obwohl epidemiologische Studien nicht gezeigt haben, dass eine Anthocyaneinnahme das Krebsrisiko in Menschen reduziert, so deuten sie an, dass die Anthocyaneinnahme gewisse Parameter von oxidativen Schäden reduzieren könnte [Wang und Stoner, 2008].
Eine Pilotstudie von Thomasset et al. (2009) liefert nun erste vielversprechende Ergebnisse. Patienten, die an Kolonkrebs erkrankt waren, erhielten einen anthocyanreichen Blaubeerextrakt täglich für eine Woche vor der Operation. Die Proliferation des Tumorgewebes von allen Patienten war um 7 % im Vergleich mit präinterventiven Werten verringert.

2.5.2. Phenolcarbonsäuren

Phenolische Säuren sind reichlich in Lebensmitteln vorhanden und werden in Benzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren unterteilt [Scalbert und Williamson, 2000; Manach et al., 2004; Cheynier, 2005; D`Archivio et al., 2007].
Hydroxybenzoesäuren, wie Gallussäure und Protocatechusäure, sind nur in wenigen Pflanzen, die für die menschliche Ernährung von Bedeutung sind, zu finden (siehe Abb. 11) [Manach et al., 2004; D`Archivio et al., 2007]. Eine Ausnahme bilden rote Früchte, wie schwarzer Rettich und Zwiebeln, die Konzentrationen von einigen zehn Milligramm pro Kilogramm Frischgewicht enthalten [Manach et al., 2004]. Da ihre Aufnahme durch die Nahrung begrenzt ist, waren sie bisher von geringerem Interesse [Manach et al., 2004; D`Archivio et al., 2007]. Aber es sollte bedacht werden, dass die Protocatechusäurekonzentration *in vivo* höher als die aufgenommene Menge sein könnte, da diese Verbindung einer der Hauptmetabolite der Anthocyane, wie z.B. von Cyanidin-3-glucosid, ist [Vitaglione et al., 2007].



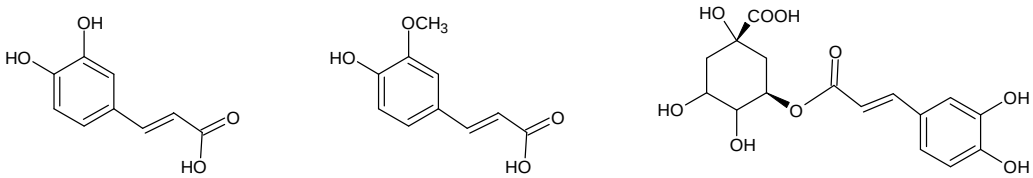
Gallussäure Protocatechusäure

Abbildung 11 Struktur von Gallussäure und Protocatechusäure.

2.5.2.1. Hydroxyzimtsäuren

Die häufigsten Hydroxyzimtsäuren sind Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure (siehe Abb. 12). Die Säuren werden aber selten in der freien Form gefunden, sondern liegen meist mit organischen Säuren, Zuckern oder Lipiden verestert vor [Clifford, 2000b; Nardini et al., 2002; Manach et al., 2004; D`Archivio, 2007]. Die gebundenen Formen sind glykosylierte Derivate oder Ester der Chinasäure, Shikimisäure oder Weinsäure. Kaffee- und Chinasäure bilden die Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure), welche in vielen Früchten und in hohen Konzentrationen im Kaffee vorliegt (siehe Abb. 12) [Clifford, 2000b; Scalbert und Williamson, 2000; Manach et al., 2004; D`Archivio, 2007]. Eine einzelne Tasse Kaffee enthält bis zu 350 mg Chlorogensäure. Die Früchte mit den höchsten Konzentrationen (Blaubeeren, Kiwis, Pflaumen, Kirschen, Äpfel) enthalten 0,5 – 2 g Hydroxyzimtsäuren / kg Frischgewicht. Kaffeesäure (frei und gebunden) ist die weit verbreiteste phenolische Säure und macht 75-100 % der Gesamtmenge an Hydroxyzimtsäuren in den meisten Früchten aus [Manach et al., 2004; D`Archivio, 2007].

Die Aufnahme von Hydroxyzimtsäuren schwankt stark in Abhängigkeit vom Kaffeekonsum. Viele Personen, die einige Tassen pro Tag trinken, nehmen 500-800 mg Hydroxyzimtsäuren pro Tag auf, während andere, die keinen Kaffee trinken und wenig Obst und Gemüse essen, weniger als 25 mg/Tag zu sich führen [Manach et al., 2004; Manach et al., 2005]. Eine deutsche Studie schätzt die tägliche Aufnahme von Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren auf 211 und 11 mg/Tag. Die Kaffeesäure-Aufnahme beläuft sich danach auf 206 mg/Tag mit der hauptsächlichen Quelle Kaffee, Früchte und Fruchtsäfte [Manach et al., 2004].



Kaffeesäure Ferulasäure Chlorogensäure

Abbildung 12 Struktur von Kaffeesäure, Ferulasäure und Chlorogensäure.

2.5.2.2. Bioverfügbarkeit von Hydroxyzimtsäuren

Die Bioverfügbarkeit von phenolischen Säuren ist höher als von anderen Polyphenolen [Scalbert et al., 2002]. Die freien phenolischen Säuren werden dabei besser aufgenommen, als die veresterten Formen (z.B. Kaffeesäure in Chlorogensäure) [Azuma et al., 2000].

Phenolische Säuren, wie Kaffeesäure, können aus der Nahrung absorbiert und im Dünndarm aufgenommen werden [Kern et al., 2003; Lafay et al., 2006b]. Die Aufnahme könnte über einen Natrium-Glucose-Kotransporter (SGLT1) erfolgen [Clifford, 2000b]. Hydroxyzimtsäuren werden nach der Absorption durch Phase-II-Reaktionen glucoronidiert und/oder sulfatiert und können über den Urin ausgeschieden werden. Die absorbierte Kaffeesäure wird vornehmlich mittels Catechol-O-methyltransferasen zu Ferulasäure und Isoferulasäure methyliert [Kern et al., 2003; Lafay et al., 2006b; Azzini et al., 2007].

Die Bioverfügbarkeit von Chlorogensäure wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien wurde Chlorogensäure im Plasma detektiert, welches eine Absorption ohne Metabolisierung vermuten lässt. Andere Autoren konnten wiederum keine Chlorogensäure im Plasma von Ratten und Mensch nach dessen Aufnahme messen.

Die schnelle Detektion von Chlorogensäure im Plasma lässt vermuten, dass eine frühe Absorption von Chlorogensäure im Magen oder im initialen Intestinalteil auftritt [Lafay et al., 2006a; Monteiro et al., 2007; Farah et al., 2008]. Lafay et al. (2006a) wiesen die Absorption von Chlorogensäure im Magen von Ratten nach und konnten Chlorogensäure in der Magenvene und Aorta identifizieren. Chlorogensäure könnte dabei über die Bilitranslocase, welche wahrscheinlich auch in den Transport von Anthocyanen im Magen involviert ist, oder durch andere noch nicht identifizierte organische Anionentransporter absorbiert werden [Lafay et al., 2006a]. Im Dünndarm kann die Chlorogensäure absorbiert oder eventuell gespalten werden. Stalmach et al. (2008) haben gezeigt, dass ein Drittel der verabreichten Chlorogensäure in Kaffee im Dünndarm von Menschen absorbiert wird. Farah et al. (2008) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis bei der Gabe eines Grünkaffeeextrakts und auch Lafay et al. (2006b) zeigten, dass 8 % der verabreichten Chlorogensäure im Dünndarm absorbiert wurde. Diese Resultate stehen jedoch im Widerspruch zu einigen Experimenten, die eine geringe Absorption von Chlorogensäure in Ratten und Menschen bestimmt haben (unter 0,1 %) [Azuma et al., 2000]. Die Esteraseaktivität zur Spaltung der Chlorogensäure soll über den Dünn- und Dickdarm verteilt sein, welches eine frühe Hydrolyse im Dünndarm erklären würde [Nardini et al., 2003; Andreasen et al., 2001]. Lafay et al. (2006b) berichten von der Anwesenheit von Gewebeesterasen in der oberen Intestinalmucosa, betonen aber,

dass der Hauptmetabolismus im Caecum und Kolon stattfindet. Andere Autoren konnten keine Esteraseaktivität außerhalb des Dickdarms in Ratten und Menschen nachweisen [Nardini et al., 2002].

Die Wiederfindung der Chlorogensäure im Plasma nach der Absorption wird kontrovers diskutiert. Lafay et al. (2006b), Azzuma et al. (2000) und Nardini et al. (2002) konnten im Plasma von Ratten und Menschen nach der Aufnahme von Chlorogensäure keine detektieren, d.h. die Chlorogensäure muss gespalten oder metabolisiert worden sein. Dies wird durch die Ergebnisse von Nardini et al. (2002) und Monteiro et al. (2008) erklärt, die einen signifikanten Anstieg an freier und gebundener Kaffeesäure im Plasma bereits eine Stunde nach dem Kaffeekonsum feststellten, obwohl im Kaffee keine freie Kaffeesäure vorhanden war. Azzini et al. (2007) konnten wiederum Chlorogensäure nach der Verabreichung von gekochten Artischocken im Menschen messen und auch Monteiro et al. (2007) wiesen nach dem Konsum von Kaffee Chlorogensäure im Plasma nach. Die gemessenen Plasmakonzentrationen liegen dabei im ng/ml-Bereich [Azzini et al., 2007, Monteiro et al., 2007]. Die relativ niedrige Plasmakonzentration an Chlorogensäure lässt vermuten, dass der Großteil der Chlorogensäure der Biotransformation unterliegt [Azzini et al., 2007].

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Wiederfindung von Chlorogensäure im Urin. Olthof et al. (2003), Lafay et al. (2006a), Monteiro et al. (2007) und Ito et al. (2005) konnten Chlorogensäure nach dessen Aufnahme im Urin identifizieren, während Nardini et al. (2002) keine Chlorogensäure im Urin detektiert haben. Die Konzentrationen im Urin liegen im Bereich von einigen µM und Olthof et al. (2003) konnten beispielsweise 1,7 % der verabreichten Chlorogensäure unverändert im Urin nachweisen.

Der Großteil der Chlorogensäure, der nicht im Dünndarm absorbiert oder metabolisiert wird, wird im Gastrointestinaltrakt durch Esterasen in der Darmmukosa oder Darmmikroflora hydrolysiert, wobei Kaffeesäure und Chinasäure als mögliche Metabolite freigesetzt werden [Nardini et al., 2002; Olthof et al., 2003; Lafay et al., 2006b]. Esteraseaktivität, um Hydroxyzimtsäuren zu hydrolysieren, besitzen von den humanen Fäkalbakterien *Escherichia coli*, *Bifidobacterium lactis* und *Lactobacillus grasseri* [Couteau et al., 2001]. Als weitere Metabolite sind Ferulasäure, Isoferulasäure, Dihydroxyferulasäure und Vanillinsäure, sowie kleinere Mengen an Gallussäure und p-Cumarsäure im Plasma von Menschen detektiert worden [Azzini et al., 2007; Monteiro et al., 2007; Farah et al., 2008]. Olthof et al. (2003) konnten Hippursäure als Hauptmetabolit von Chlorogensäure nachweisen.

Eine große interindividuelle Variation existiert in der Absorption, dem Metabolismus und der Kinetik von Chlorogensäure im Mensch und benötigt weitere Untersuchung, um Unterschiede, bedingt durch beispielsweise genetische Polymorphismen, aufzuklären [Farah et al., 2008].

2.5.2.3. Biologische Eigenschaften von Chlorogensäure und einigen verwandten Derivaten

Chlorogensäure besitzt eine gut charakterisierte antioxidative und antiinflammatorische Aktivität *in vitro* [Belkaid, 2006; Granado-Serrano et al., 2007]. In Hep3B-Leberkrebszellen zeigte Chlorogensäure nach 24 h erst ab 200 µg/ml zytotoxische Eigenschaften [Jin et al., 2004]. Langzeitinkubationen (72 h) zeigten bereits bei 80 µM Chlorogensäure eine signifikante Verringerung der Proliferation von der humanen Lungenkrebszelllinie A549. Jedoch hatte die Chlorogensäure keinen Effekt auf das Wachstum von murinen Epidermalzellen JB6 bei derselben Konzentration [Feng et al., 2005].

AP-1-Signaltransduktionswege sind wichtige molekulare Ziele für chemopräventive Strategien. Die Aktivierung von AP-1 induziert die Expression von Zielgenen, die in vielen Krankheitsprozessen, wie Entzündung, Tumorprogression, Metastasierung und Angiogenese, involviert sind. Die Komponenten von AP-1 werden durch drei verschiedene aber parallele MAPKs aktiviert: ERKs, JNKs und p38 Kinasen [Feng et al., 2005].

Feng et al. (2005) untersuchten den Effekt von Chlorogensäure auf die 12-O-Tetradecanoylphobol-13-acetat (TPA)- oder UVB-induzierte AP-1-Aktivität mit einem Reportergenassay. Die Vorbehandlung der JB6-Zellen mit Chlorogensäure (1 h) hemmte die TPA-induzierte AP-1 Aktivität signifikant. Chlorogensäure allein hatte jeodoch keinen Effekt auf die AP-1-Aktivität. Vorbehandlung der JB6-Zellen mit Chlorogensäure resultierte auch in einer signifikanten Inhibierung der AP-1-Transaktivierung, die durch UVB-Bestrahlung induziert wurde [Feng et al., 2005].

Die UVB-induzierte JNKs- und p38-Aktivierung wurde nach der Vorbehandlung der Zellen mit Chlorogensäure schon bei einer Konzentration von 15 µM signifikant inhibiert, während eine höhere Dosis für die Inhibierung der ERK-Aktivität nötig war. Chlorogensäure hemmt auch die TPA-induzierte JNKs- und p38-Aktivierung, aber zeigte bis zu einer Konzentration von 160 µM keine Inhibierung der ERK-Aktivierung [Feng et al., 2005]. Diese Resultate geben einen Hinweis darauf, dass die Chlorogensäure vor durch Umweltkarzinogene-induzierter Krebsentstehung schützen könnte, indem sie die AP-1- und MAPK-Aktivierung unterdrückt. Dies

könnte möglicherweise ein Indiz für eine chemopräventive Wirkung der Chlorogensäure darstellen.

Hwang et al. (2010) zeigten, dass 3-Caffeoyl-4-dihydrocaffeoylchinasäure, ein natürliches Chlorogensäurederivat aus *Salicornia herbacea*, die Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und JNK konzentrationsabhängig (1-10 µM) 30 Minuten nach der Phorobol-12-myristat-13-acetat-Behandlung in HT-1080-Zellen inhibiert. Die Untersuchungen zeigen einen Einfluss des Chlorogensäurederivats auf den MAPK-Signalweg. Jedoch könnten diese Effekte auf die Akkumulierung von Wasserstoffperoxid zurückgehen, da in diesen Versuchen keine Katalase zugesetzt wurde (siehe 2.6.).

Belkaid et al., (2006) konnten zeigen, dass Chlorogensäure die Spingosin-I-phosphat (S1P)-induzierte ERK-Phosphorylierung in U-87-Gliomazellen hemmt. S1P ist ein bioaktives Lipid, das das Wachstum von Gliomazellen stimuliert und durch eine Familie von fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, S1P-Rezeptoren (S1PR) genannt, die Signale leitet. S1P löst intrazelluläre Signalwege, zum Teil über den MAPK-Signalweg. S1P triggert eine schnelle Phosphorylierung von ERK innerhalb der ersten 15 Sekunden der Inkubation. Interessanterweise schützt Präinkubation der Zellen mit 100 µM Chlorogensäure für 30 Minuten vor der schnellen Phosphorylierung von ERK und verzögert sie bis zu 60 Sekunden [Belkaid et al., 2006].

Die meisten Studien, die Zellkultursysteme verwenden, haben sich auf die antioxidativen Effekte von Polyphenolen nach der Exposition der Zellen mit Prooxidanten konzentriert. Aber es gibt wenig Literatur, die die Effekte dieser Polyphenole alleine auf Zellkulturlinien beurteilen [Granado-Serrano et al., 2007].

Granado-Serrano et al. (2007) konnten bei der Behandlung der menschlichen Leberkrebszelllinie HepG2 für 18 h mit Chlorogensäure keinen Effekt auf die Aktivität von ERK1 und ERK2 im getesteten Konzentrationsbereich (1-100 µM) feststellen.

Der NGF (nerve growth factor) bindet an den Trk-Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors wird auf Signalproteinen, wie PLCγ, PI3K, das shc-Protein und auf ERK weitergeleitet. Diese Signalkaskade ist für die Indizierung von neuritischem Wachstum verantwortlich. Die durch NGF-induzierte Aktivierung vom Ras-MAPK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von PC12-Phäochromozytomzellen. Die Western Blot Analyse zeigte, dass (-)-3,5-Dicaffeoyl-*muco*-chinasäure die Erk1/2 Phosphorylierung stimuliert [Hur et al., 2004].

Zur Modulation der Aktivität verschiedener ErbB-Rezeptoren oder verwandter RTKs gibt es derzeit noch keine Veröffentlichungen für die Einzelsubstanz Chlorogensäure. Aber chlorogensäurereiche Apfelsaftextrakte zeigten bereits

hemmende Wirkungen auf die Aktivierung verschiedener RTKs und nachgeschalteter Signalelemente [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007b].

2.5.3. Heidelbeerextrakte

In der vorliegenden Arbeit wurde ein unverkapselter Heidelbeerextrakt, sowie eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion, die mit dem Heidelbeerextrakt befüllt war, untersucht. Dieser wird in dem folgenden Abschnitt näher charakterisiert. Weiters wurde der unverkapselte Heidelbeerextrakt in verschiedene Fraktionen aufgetrennt, die im Weiteren ebenso getestet wurden.

Polyphenolische Komponenten in Heidelbeeren sind Flavonoide (Anthocyane, Flavonole, Flavanole), Tannine (Procyanidine, Ellagtannine, Gallotannine), phenolische Säuren (Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren), Lignane und Stilbene [Häkkinen et al., 1999; Kähkönen et al., 2004; Määtä-Riihinen et al., 2004; Olsson et al., 2004; Seeram et al., 2006; Neto, 2007; McDougall et al., 2008; Seeram, 2008]. Heidelbeeren enthalten meist einen hohen Anteil an Anthocyanen und sind reich an Flavonolglykosiden (z.B. Quercetin und seine Glykoside) und Chlorogensäure [Määtä-Riihinen et al., 2004; Neto, 2007]. Weiters ist bekannt, dass Heidelbeeren vornehmlich kondensierte Tannine (Procyanidine) und weniger hydrolysierbare Tannine (Ellagtannine und Gallotannine) enthalten [Seeram et al., 2006].

Der in dieser Arbeit untersuchte Heidelbeerextrakt kann in drei Hauptfraktionen eingeteilt werden. Die Hauptbestandteile des Extrakts mit ca. 60 % sind die Anthocyane, wobei die Glykoside von Delphinidin [Del-3-glc, Del-3-gal, Del-3-arab (-arabinosid)] und Cyanidin (Cy-3-glc, Cy-3-gal, Cy-3-arab) überwiegen. Weiters sind Petunidinglykoside (Pt-3-glc, Pt-3-arab, Pt-3-gal), Peonidinglykoside (Peo-3-glc, Peo-3-gal, Peo-3-arab) und Malvidinglycoside (Ma-3-glc, Ma-3-gal, Ma-3-arab) in geringeren Mengen enthalten [persönliche Mitteilung, Technische Universität Braunschweig].

In der Phenolcarbonsäurefraktion, die ca. 15 % des Gesamtextrakts ausmacht, sind die in Tabelle 2 aufgelisteten Verbindungen identifiziert, aber noch nicht quantifiziert worden.

Die Polymerfraktion, die ca. 20 % des Gesamtextrakts umfasst, ist noch nicht weiter charakterisiert worden. Zusätzlich sind auch im Wasser unlösliche Bestandteile, wie Zellreste von Pflanzen im Extrakt enthalten, die sich mikroskopisch nachweisen lassen [persönliche Mitteilung, Technische Universität Braunschweig].

Tabelle 2 Identifizierte Inhaltsstoffe der Phenolcarbonsäurefraktion des HBE [modifiziert nach Technische Universität Braunschweig].

Flavonole und ihre Glykoside	Anthocyanidine	Flavan-3-ole	Hydroxyzimtsäuren und Derivate	Hydroxybenzoe-säuren	Weitere Verbindungen
Quercetin	Malividin	Epicatechin	p-Cumarsäure	Protocatechussäure	Phloroglucinolaldehyd
Myricetin	Peonidin	Catechin	Kaffeesäure	Gallussäure	5-Hydroxyvanillinsäure
Quercetin-rhamnosid	Petunidin		Cumarsäure-Derivat		Depsid*
Quercetin-arabinosid	Cyanidin		Chlorogensäure		
Quercetin-glucuronid	Delphinidin		Cumaryl-iridoid		
Quercetin-galactosid					
Myricetin-glucosid					
Myricetin-galactosid			* 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylessigsäure		

Der Heidelbeerextrakt wurde an der Technischen Universität Braunschweig am Institut für Lebensmittelchemie in verschiedene Subfraktion mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgetrennt (siehe Abbildung 13).

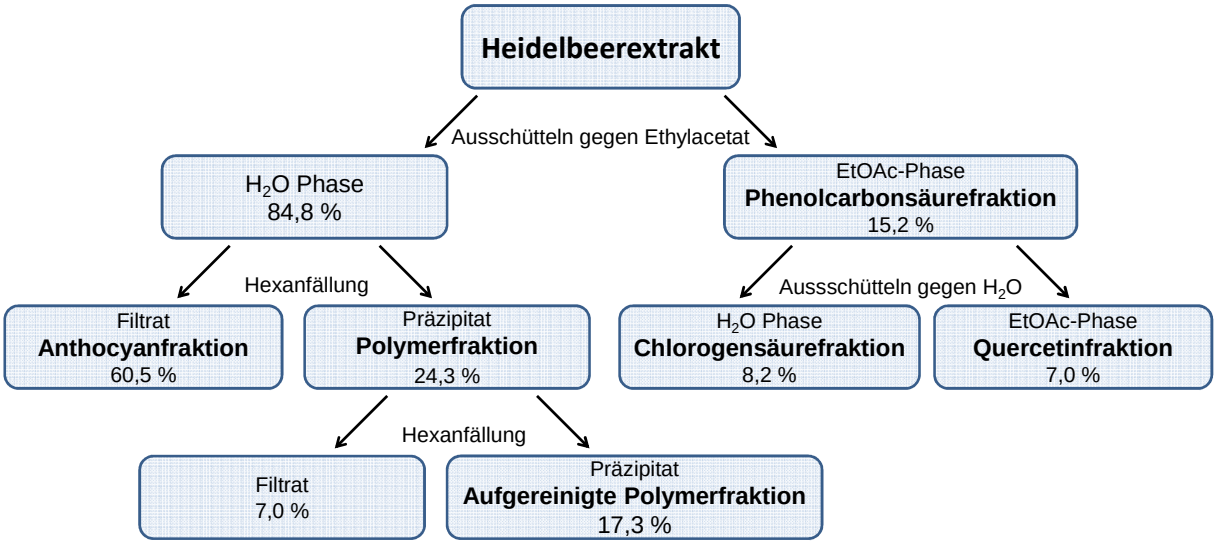


Abbildung 13 Fraktionierung des Heidelbeerextrakts durch Lösungsmittelextraktion und Fällungen ohne perfluorierte Reagenzien; H_2O: Wasser; EtOAc: Ethylacetat [modifiziert nach Technische Universität Braunschweig].

Eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion, in welche der Extrakt eingearbeitet war, wurde am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich Lebensmittelverfahrenstechnik (LVT) hergestellt. Die Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion war folgendermaßen aufgebaut:

- Die innere wässrige Phase (12 Gew.-%) enthielt 5 % Pektin Amid CB 025-E und 2,0 % Heidelbeerextrakt, wobei der pH-Wert mit Zitronensäure auf 3,5 eingestellt wurde.
- Die Ölphase (28 Gew.-%) setzte sich aus Miglyol 812 N und 2,3 % PGPR 90+ (PolyGlycerol PolyRicinoleat) zusammen.

- Die äußere wässrige Phase (60 Gew.-%) bestand aus 2,1 % Konjugat bzw. Gemisch Dex 500, 0,01 % NaN_3 und 0,8 % Pektin.

Die HBE-Konzentration im Gesamtsystem betrug daher 0,24 Gew.-%. Zusätzlich zu dieser Doppelemulsion wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion hergestellt, die keinen HBE enthielt, sonst aber gleich aufgebaut war [persönliche Mitteilung, KIT].

2.6. Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium durch Polyphenole

Polyphenole interagieren mit noch unbekannten Bestandteilen der verwendeten Zellkulturmedien und generieren hohe Konzentrationen von Wasserstoffperoxid. Diese Wasserstoffperoxid-Bildung könnte viele der berichteten Effekte von Polyphenolen auf Zellkulturen erklären [Long et al., 2000]. Zum Beispiel kann Wasserstoffperoxid Transkriptionsfaktoren aktivieren, die Expression von bestimmten Genen unterdrücken, die Zellproliferation modulieren, zytotoxisch sein und Signaltransduktionswege beeinflussen [Long et al., 2000; Lapidot et al., 2002]. Es ist auch bekannt, dass die Antwort von Zellen auf Wasserstoffperoxid von unterschiedlichen Faktoren abhängt. Beispielsweise hat die untersuchte Zellart, die Konzentration an Katalase und anderen Wasserstoffperoxid-vermindernden Enzymen, sowie die gebildete Menge an Wasserstoffperoxid einen Einfluss [Long et al., 2000]. Zudem nimmt das Level von Wasserstoffperoxid, das produziert wird, mit der Zeit und der Konzentration an phenolischen Verbindungen, die zugefügt werden, zu, d.h. sie ist zeit- und konzentrationsabhängig [Long et al., 2000; Lapidot et al., 2002; Bellion et al., 2009].

Außerdem kann Wasserstoffperoxid die Stabilität der Testverbindungen modulieren [Kern et al., 2007]. Viele Resultate könnten daher auf die artifizielle Erzeugung von oxidativem Stress durch gebildetes Wasserstoffperoxid beruhen. Deshalb wird vorgeschlagen, um solche Artefakte zu vermeiden, Katalase oder ein anderes reduzierendes Agens zuzusetzen, damit Wasserstoffperoxid abgebaut und so die Erzeugung von anderen reaktiven Sauerstoffspezien unterdrückt wird, um die Effekte in der Zellkultur sicher auf die Wirkung der Polyphenole zurückführen zu können [Lapidot er al., 2002].

3. Problemstellung

Aufgrund der hohen Inzidenz an kolorektalen Tumoren in den westlichen Industrieländern und dem postulierten Zusammenhang zwischen den Ernährungsgewohnheiten und der Entstehung von Krebs gibt es ein hohes Interesse, Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe zu identifizieren, die möglicherweise für einen chemopräventiven Einsatz in Frage kommen.

Die Tumorentstehung wird vielfach mit Veränderungen der Aktivität von Oberflächenrezeptoren beziehungsweise der Modulation der nachgeschalteten zellulären Signaltransduktionskaskaden verknüpft. Deregulierte Expressionen und Aktivitäten von Rezeptoren der ErbB-Familie werden mit der Entwicklung und Malignität vieler menschlicher Tumorarten in Verbindung gebracht. Die Aktivierung dieser Rezeptoren sowie die Weiterleitung des Signals über die MAPK-Kaskade sind von herausragender Bedeutung für die Regulation der Zellproliferation. Ein Ziel der Chemoprävention ist es daher, die Aktivität der Rezeptoren der ErbB-Familie durch Nahrungsmittel beziehungsweise spezifische Inhaltsstoffe zu hemmen. Verschiedene Studien mit Apfelsaft- und Heidelbeerextrakten führten zu einer Hemmung des Zellwachstums und sie zeigten sich als Breitbandhemmstoffe für verschiedene RTKs und deren nachgeschaltete Signalelemente.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden Heidelbeerextrakte und ihre ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure auf die Beeinflussung des Zellwachstums mittels Sulforhodamin-B-Test untersucht. Die Versuche werden in der humanen Kolonkrebszelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase, um die Bildung von Wasserstoffperoxid in noch nicht identifizierten Reaktionen von Polyphenolen mit dem Zellkulturmedium zu verhindern, durchgeführt. Dabei werden die antiproliferativen Eigenschaften eines unverkapselten Heidelbeerextrakts mit einem verkapselten verglichen. Dazu wird eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion mit dem Heidelbeerextrakt befüllt. Die Verkapselung soll die Freisetzung der bioaktiven Verbindungen am Wirkort (z.B. Kolon) verbessern und die Verbindungen am Weg dorthin vor einem möglichen Abbau schützen.

Weiters soll mittels Western Blot Analyse der Einfluss von chlorogensäurereichen Extrakten und der Chlorogensäure auf die Aktivität des EGFRs, sowie der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 untersucht werden. Der erwähnte Heidelbeerextrakt zeigte in früheren Untersuchungen eine potente Hemmung der Aktivität des EGFRs [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko]. Um die bioaktiven Inhaltsstoffe bzw. Verbindungsklassen zu identifizieren, wird der Heidelbeerextrakt an der Technischen Universität Braunschweig fraktioniert. Zwei dieser Fraktionen (aufgereinigte Polymerfraktion und Chlorogensäurefraktion),

sowie die Leitverbindung Chlorogensäure und ein rekonstituierter chlorogensäurereicher Apfelsaftextrakt werden auf ihren Einfluss auf ausgesuchte Signalelemente untersucht. Die Modulation der Transkription verschiedener Wachstumsfaktoren, sowie ihrer Liganden wird über die MAPK-Kaskade reguliert. Mittels RealTime PCR soll die Leitverbindung Chlorogensäure auf die Beeinflussung der Transkription der Gene für die ErbB-Rezeptoren, deren Ligand, sowie jene des Zellzyklusregulators Cyclin D1 und des Onkogens c-fos getestet werden.
Im Mittelpunkt der Arbeit steht damit die Frage, ob und wie die ausgewählte Leitverbindung Chlorogensäure wachstumsassoziierte Signalkaskaden modulieren kann und welchen Einfluss sie innerhalb komplexer Extrakte spielt, um zu untersuchen, ob sie ein mögliches chemopräventives Potential aufweist.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Beeinflussung des Zellwachstums durch Heidelbeerextrakte und die ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure

4.1.1. Beeinflussung des Zellwachstums durch einen unverkapselten Heidelbeerextrakt

Für eine Vielzahl von anthocyanreichen Beerenextrakten konnte eine wachstumshemmende Wirkung in verschiedenen humanen Tumorzelllinien bereits nachgewiesen werden [Ferguson et al., 2004; Olsson et al., 2004; Zhang et al., 2005; Seeram et al., 2006; McDougall et al., 2008; Faria et al., 2010]. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass diese Versuche meist ohne Zusatz von Katalase durchgeführt wurden (siehe 2.6.).

Die Untersuchungen zum Zellwachstum wurden mittels SRB-Test nach Skehan et al. (1989) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml), um die Wasserstoffperoxid-akkumulation zu verhindern, in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt. Die Inkubation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen eines unverkapselten Heidelbeerextrakts (HBE) in serumhaltigem [10 % FKS (fetales Kälberserum)] Medium in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Endkonzentration 1 %). Um den Zeitverlauf zu untersuchen, wurden drei verschiedene Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h) gewählt.

Beim Vergleich der Inkubationszeiten lässt sich eine signifikante Hemmung der Zellproliferation sowohl nach einer Inkubation von 48 h, als auch nach einer von 72 h in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO erkennen, während nach einer Inkubation von 24 h kein Einfluss auf das Zellwachstum gemessen wird (siehe Abb. 14).

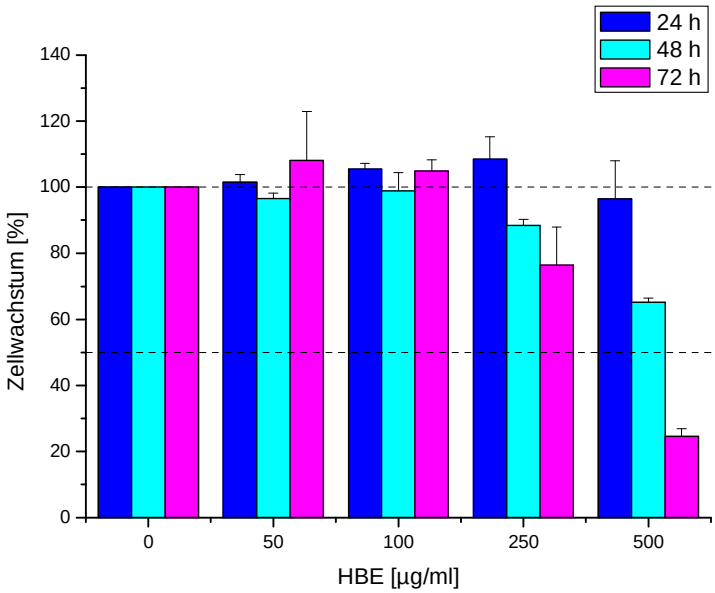


Abbildung 14 Einfluss des Heidelbeerextrakts (HBE) auf das Wachstum von HT29-Zellen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils einer Vierfachbestimmung.

Der getestete HBE beeinflusst das Zellwachstum nach der 24 h Inkubation nicht. Die höchste getestete Konzentration von 500 µg/ml HBE hemmt die Zellproliferation nach 48 h Inkubation auf 65,2 ± 1,2 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Eine noch potentere Wachstumshemmung wird nach der 72 h Inkubation beobachtet, wobei das Zellwachstum auf 24,6 ± 2,3 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO gesenkt wird. Der IC_{50}-Wert des HBE nach 72 h Inkubation liegt bei einer Konzentration von etwa 380 µg/ml.

McDougall et al. (2008) konnten keine Zellwachstumshemmung durch einen Heidelbeerextrakt nach 72 h bei der Inkubation von humanen zervikalen Krebszellen (HeLa) bei einer Konzentration von 50 µg/ml Gesamtextrakt beobachten. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten in diesem Konzentrationsbereich ebenso keine Modulation. Seeram et al. (2006) stellten jedoch nach 48 h Inkubation von HT29-Zellen mit einem Heidelbeerextrakt eine Hemmung des Wachstums auf etwa 50 % bei der höchsten Konzentration von 200 µg/ml fest. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den hier vorgelegten, wo eine HBE-Konzentration von 250 µg/ml nach 48 h Inkubation lediglich eine Hemmung von 10-15 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bewirkte. Die Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, dass die Zusammensetzung der beiden Heidelbeerextrakte unterschiedlich ist und somit auch andere Ergebnisse liefert, oder dass die Hemmung der Zellproliferation bei Seeram et al. auf die Generierung von Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist, da diese keine Katalase

zugesetzt haben. In früheren Versuchen des Arbeitskreises konnte die Beeinflussung des Zellwachstums durch Wasserstoffperoxid auch an Mirtocyan, einem HBE, gezeigt werden. Bei der Inkubation von HT29-Zellen mit Mirtocyan wurde der IC_{50}-Wert mit Katalase bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml nicht erreicht, während der IC_{50}-Wert ohne Zusatz von Katalase bei 176,9 ± 9,8 µg/ml lag [Dissertation Jessica Fritz, 2008]. Polyphenole, zu welchen die Anthocyane gezählt werden, können aber mit dem Zellkulturmedium interagieren und Wasserstoffperoxid generieren, welches selbst einen Effekt auf das Zellwachstum haben kann (siehe 2.6.) [Long et al., 2000].

Verschiedene Inhaltsstoffe des HBE können einen Beitrag zur Wachstumshemmung haben. Beeren enthalten eine Vielfalt an Phytochemikalien, die bioaktive Effekte vermitteln können (siehe 2.5.3.) [Neto, 2007]. Der in dieser Arbeit untersuchte HBE besteht hauptsächlich aus Anthocyanen, wobei die Glykoside von Delphinidin und Cyanidin überwiegen. Er enthält auch eine Phenolcarbonsäurefraktion (15 % des Gesamtextrakts) und eine Polymerfraktion (20 % des Gesamtextrakts), die zur Wirkung des Extraktes einen Beitrag leisten könnten (siehe 2.5.3.) [persönliche Mitteilung, Universität Braunschweig].

Die Hemmung der Zellproliferation durch den HBE wird nicht allein durch die wachstumshemmenden Eigenschaften der Anthocyane ausgelöst, sondern es könnten auch andere Verbindungen einen Einfluss haben. Weiters sollte auch ein synergistischer Effekt zwischen den einzelnen polyphenolischen Verbindungen nicht außer Acht gelassen werden und auch die Abbauprodukte der Primärverbindungen (siehe 2.5.1.2.) liefern möglicherweise einen Beitrag. Abbauprodukte, wie Gallussäure, produzieren beispielsweise ebenso große Mengen an Wasserstoffperoxid [Kern et al., 2007], wodurch das Zellwachstum moduliert werden könnte. Anthocyane und ihre Aglyka, die Anthocyanidine, haben in vielen Studien gezeigt, dass sie antiproliferative Effekte aufweisen, wobei Anthocyanidine meist eine stärkere Hemmwirkung als Anthocyane aufweisen [Meiers et al., 2001; Marko et al., 2004; Olsson et al., 2004; Reddy et al., 2005; Zhang et al., 2005].

Die meisten Autoren berichten, dass Chlorogensäure in den verschiedenen untersuchten Zelllinien marginale wachstumshemmende Effekte hatte oder die IC_{50}-Werte über 500 µM liegen [Zheng et al., 2002; Iwai et al., 2004; Kutara et al., 2007]. Zu einem anderen Ergebnis der Beeinflussung des Zellwachstums durch Chlorogensäure kamen Hsu et al. (2006), die die antiproliferativen Effekte in 3T3-L1 Präadipozyten nach 72 h Inkubation untersuchten und einen IC_{50}-Wert von 72,3 µM berechneten. Dieses könnte damit erklärt werden, dass interzelluläre Unterschiede auftreten können und sich Präadipozyten in ihrer Wirkung von

anderen humanen Tumorzelllinien möglicherweise mehr unterscheiden. Einen weiteren Einfluss auf die Zellproliferation könnten die Flavonole und ihre Glykoside liefern, vor allem Quercetin, jedoch weniger ihre Glykoside (z.B. Rutin), zeigten eine potente Wirkung [Ranelletti et al., 1992; Agullo et al., 1994; Kuo, 1996; Nguyen et al., 2004; Alia et al., 2006; Fridrich et al., 2008]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass oligomere Procyanidinkomplexe und procyanidinreiche Extrakte das Zellwachstums in verschiedenen Zelllinien hemmten [Schmidt et al., 2004; Mantena et al., 2006; Neuwirth et al., 2008].
Yi et al. (2005) trennten einen Heidelbeerextrakt in verschiedene Fraktionen (phenolische Säuren, Tannine, Flavonole und Anthocyane) auf. Die Flavonol- und Tanninfraktion hemmten die Zellproliferation in HT29-Zellen, während die phenolische Säurefraktion geringe Bioaktivität zeigte. Die größten Effekte lieferte aber die Anthocyanfraktion.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der HBE zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Abnahme der Zellproliferation führt. Die antiproliferativen Effekte können aber nicht nur den Anthocyanen zugeschrieben werden, sondern auch die Flavonole und ihre Glykoside sowie die Procyanidine liefern möglicherweise einen Beitrag zur Hemmwirkung. Zusätzlich könnten synergistische und additive Effekte eine Rolle spielen beziehungsweise sich Effekte der Einzelverbindungen überlagern und somit teilweise abschwächen.

4.1.2. Beeinflussung des Zellwachstums durch einen verkapselten Heidelbeerextrakt

Verschiedene verkapselte Extrakte des anthocyanreichen HBE werden in der Arbeitsgruppe in *in vitro* Untersuchungen getestet. Diese Techniken werden angewendet, um die Verbindungen zu stabilisieren und gezielt am Wirkort freizusetzen. Auch die Stabilität der Anthocyane im Zellkulturmedium ist beschränkt und es kommt zu einem Abbau in phenolische Säuren (siehe 2.5.1.3.) [Kern et al., 2007]. Durch die Verkapselung könnte die Bioverfügbarkeit verbessert werden.
In diesem Zusammenhang wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion, in welche der Extrakt eingearbeitet war, in Bezug auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften im Vergleich zum unverkapselten HBE untersucht. Zusätzlich zu dieser Doppelemulsion wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion hergestellt, die keinen HBE enthielt, sonst aber gleich aufgebaut war (siehe 2.5.3.). Die mit HBE-befüllte Emulsion wird im Weiteren als Heidelbeeremulsion und die nicht befüllte als Referenzemulsion bezeichnet.

Die Untersuchungen zum Zellwachstum wurden mittels SRB-Test nach Skehan et al. (1989) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an Emulsion in serumhaltigem (10 % FKS) Medium in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Endkonzentration 1 %) für 24 h (siehe Abb. 15) und für 72 h (siehe Abb. 16). Es wurde sowohl die Referenzemulsion als auch die Heidelbeeremulsion in ansteigenden Konzentrationen untersucht, wobei die Referenzemulsion in gleichen Mengen wie die Heidelbeeremulsion eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde bei einer weiteren Messung (später als Emulsionsgemisch bezeichnet) mit einer Mischung aus Referenz- und Heidelbeeremulsion inkubiert, wobei die Emulsionsmenge immer die gleiche war und sich nur die Extraktkonzentration änderte, d.h. im Vergleich zur Messung mit der Heidelbeeremulsion wurde die Emulsionsmenge ausgeglichen.
Die Ergebnisse zeigen, dass bei beiden Inkubationszeiten ein möglicher Einfluss der in dem verkapselten HBE-enthaltenen bioaktiven Verbindungen auf die Hemmung der Zellproliferation erkannt werden kann (siehe Abb. 15 und 16).

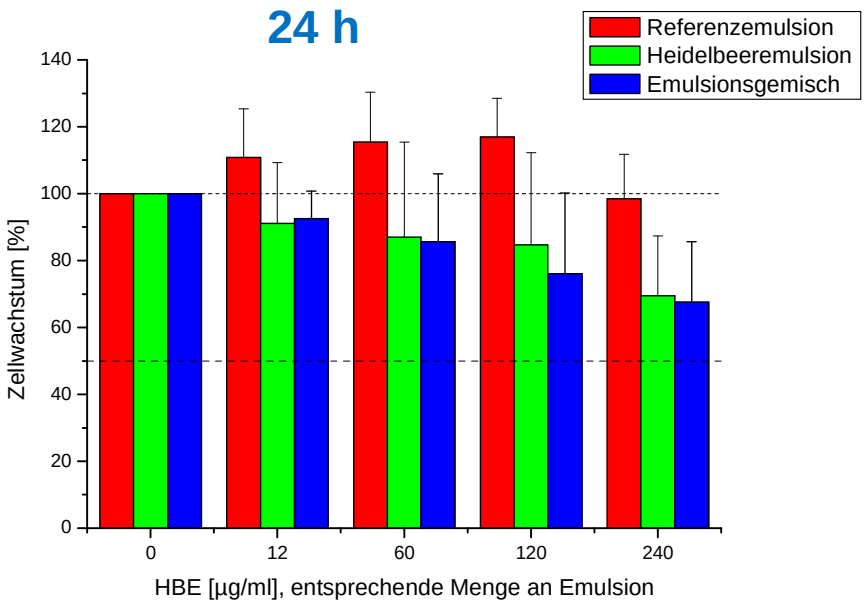


Abbildung 15 Einfluss der mit HBE-befüllten Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion (Heidelbeeremulsion) und einer nicht mit HBE-befüllten Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion (Referenzemulsion) sowie einer Mischung der beiden mit konstanter Emulsionsmenge (Emulsionsgemisch) auf das Wachstum von HT29-Zellen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium für 24 h unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils einer Vierfachbestimmung.

Nach der 24 h Inkubation ist eine leichte konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums durch die Heidelbeeremulsion zu beobachten. Die höchste

getestete Konzentration von 240 µg/ml HBE führt zu einer Wachstumshemmung auf 69,5 ± 17,8 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Der Verlauf der Effekte des Emulsionsgemisch, wo die Emulsionsmenge mit Hilfe der Referenzemulsion im Vergleich zur Messung der Heidelbeeremulsion ausgeglichen wurde, entspricht der Heidelbeeremulsion mit einer Hemmung der Zellproliferation von 67,7 ± 18,0 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in der höchsten gemessenen Konzentration von 240 µg/ml HBE. Die Referenzemulsion, die keinen HBE enthält, führt in den niedrigen Konzentrationen (entsprechende Menge an Emulsion bei einer HBE-Konzentration von 12-120 µg/ml) zu einer leichten Stimulierung des Zellwachstums auf 110-120 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, während die höchste Konzentration an Referenzemulsion im Bereich der Lösungsmittelkontrolle DMSO liegt.
Es kann gefolgert werden, dass die Zellwachstumshemmung wahrscheinlich durch den HBE und nicht durch andere Bestandteile der Emulsion ausgelöst werden, weil die Referenzemulsion geringe Effekte auf das Zellwachstum zeigt und die Hemmeffekte der Heidelbeeremulsion und des Emulsionsgemisches ähnliche Effekte ergeben. Die Hemmung des Zellwachstums wird vermutlich durch die Freisetzung des HBE vermittelt.

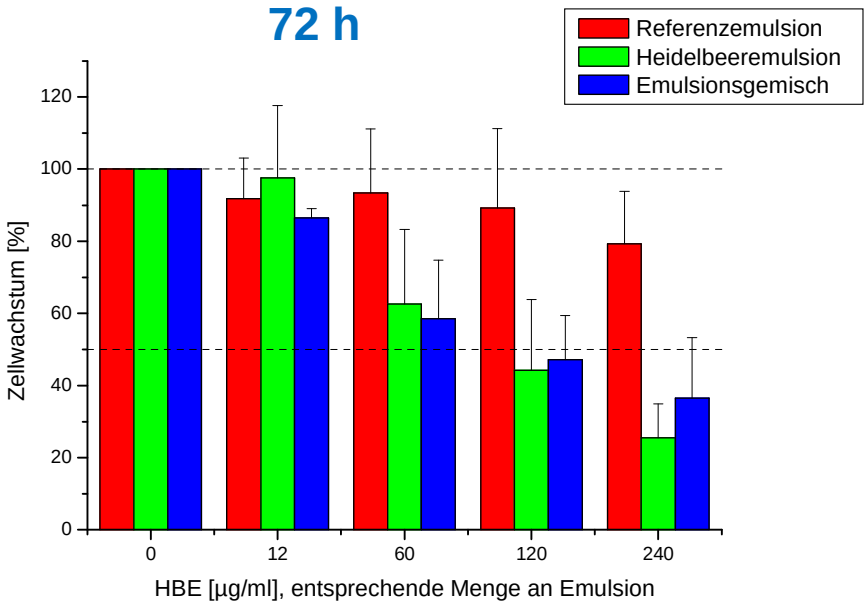


Abbildung 16 Einfluss der mit HBE-befüllten Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion (Heidelbeeremulsion) und einer nicht mit HBE-befüllten Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion (Referenzemulsion) sowie einer Mischung der beiden mit konstanter Emulsionsmenge (Emulsionsgemisch) auf das Wachstum von HT29-Zellen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium für 72 h unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils einer Vierfachbestimmung.

Die Heidelbeeremulsion hemmt die Zellproliferation konzentrationsabhängig bis auf 25,5 ± 9,4 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Der IC_{50}-Wert der Heidelbeeremulsion liegt bei einer Konzentration von etwa 110 µg/ml HBE. Das Emulsionsgemisch zeigt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation auf 36,5 ± 16,8 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bei der höchsten Konzentration von 240 µg/ml HBE. Der IC_{50}-Wert des Emulsionsgemisches beträgt etwa 115 µg/ml HBE. Die Referenzemulsion, die keinen HBE enthält, führt zu einer leichten konzentrationsabhängigen Hemmung des Zellwachstums auf 79,3 ± 14,6 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in der höchsten getesteten Konzentration.
Das Zellwachstum des Emulsionsgemisches sollte theoretisch in den Konzentrationen von 12-120 µg/ml unter jenem der Heidelbeeremulsion liegen, da die Referenzemulsion einen marginalen Effekt auf das Zellwachstums zeigt und hier die Emulsionskonzentration ausgeglichen wurde, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied im Zellwachstum gemessen. Es könnte sein, dass die Wirkung der anderen Emulsionsbestandteile durch die bioaktiven Verbindungen des HBE inhibiert wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es sich bei der Verringerung des Zellwachstums durch die Referenzemulsion um experimentelle Artefakte handelt. Deshalb kann auch nach einer Inkubation von 72 h gefolgert werden, dass wahrscheinlich der Großteil der Zellwachstumshemmung durch den HBE und nicht durch andere Bestandteile der Emulsion ausgelöst werden. Obwohl die Referenzemulsion geringe wachstumshemmende Effekte zeigt, liegen die Hemmeffekte der Heidelbeeremulsion und des Emulsionsgemisches in einem ähnlichen Bereich.
Beim Vergleich der beiden Inkubationszeiten fällt auf, dass es bei den drei Emulsionen (Referenzemulsion, Heidelbeeremulsion und Emulsionsgemisch) zu einer stärkeren Wachstumshemmung nach 72 h im Vergleich zur Inkubation von 24 h kommt. Die Referenzemulsion zeigt bei 24 h eher eine wachstumsstimulierende Wirkung, während sie bei 72 h eine konzentrationsabhängige Hemmung, um etwa 20 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in der höchsten gemessenen Konzentration bewirkt. Für die Heidelbeeremulsion und für das Emulsionsgemisch gilt ähnliches. Es kommt bei beiden Inkubationszeitpunkten zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung, die von etwa 30 % nach 24 h auf etwa 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO nach einer Inkubation von 72 h ansteigt.
Es sollte noch untersucht werden, ob die geringere Zellzahl bei der Inkubation mit der Referenzemulsion in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO auf einer

wachstumshemmenden oder zytotoxischen Wirkung beruht. Daher sollte in weiteren Untersuchungen ein Zellviabilitätstest angeschlossen werden.
Beim Vergleich des unverkapselten HBE und der mit HBE-befüllten Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsionen kann erkannt werden, dass der HBE in der verkapselten, in Emulsionen verpackten Form wesentlich stärkere antiproliferative Effekte ausübt als der unverkapselte Extrakt. Beim unverkapselten Extrakt kommt es nach einer Inkubation von 24 h zu keiner Beeinflussung des Zellwachstums, während der verkapselte Extrakt die Zellproliferation um 30 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO verringert. Beim Vergleich der IC_{50}-Werte nach einer Inkubation von 72 h fällt auf, dass der IC_{50}-Wert des unverkapselten Extrakts (~380 µg/ml HBE) mehr als das Dreifache des IC_{50}-Wertes der Emulsionen (~110 µg/ml) beträgt (siehe 2.1.1.).
Die Gründe für eine Steigerung der biologischen Aktivität in Bezug auf die Wachstumshemmung durch die Verkapselung in Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsionen des HBE können diverse Gründe haben. Die Diffusion der bioaktiven Verbindungen, vornehmlich der Anthocyane, aus der Doppelemulsion in das Zellkulturmedium könnte möglicherweise verlangsamt sein, sodass zwar die effektive Konzentration am Wirkort verringert, aber dafür die Wirkzeit verlängert wird. Somit könnte die Gesamtwirkung des HBE gesteigert werden, indem eine erhöhte Stabilität der bioaktiven Inhaltsstoffe vorliegen könnte. So ist bekannt, dass Anthocyane rasch im Zellkulturmedium bei der Inkubation von HT29-Zellen zerfallen und die entsprechenden phenolischen Säuren gebildet werden [Kern et al., 2007], die möglicherweise geringere wachstumshemmende Eigenschaften aufweisen. Durch die Emulsion selbst oder gewisse Bestandteile darin könnte es zu einer Stabilisierung der Anthocyane im Vergleich zum unverkapselten Extrakt kommen. Die innere wässrige Phase besitzt einen pH-Wert von 3,8 und könnte so die Stabilität der Anthocyane im Vergleich zum Zellkulturmedium mit einem neutralen pH-Wert erhöhen (siehe 2.5.1.1.) und so einem Zerfall entgegenwirken.
Ein weiterer Punkt ist, dass es innerhalb der Inkubationszeit nach einigen Stunden zu einem Aufrahmen der öligen Phase der Emulsion gekommen ist und eine homogene Verteilung im Zellkulturmedium nicht mehr gegeben war. Inwiefern dies die Messung beeinflusst hat, muss noch geklärt werden.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die mit HBE-befüllten Emulsionen eine konzentrations- und zeitabhängige Wachstumshemmung bewirken, wobei die Wirkung vorwiegend durch die im HBE-enthaltenen Inhaltsstoffe und nur in geringem Masse bei einer längeren Inkubation von anderen Emulsionsbestandteilen ausgeht. Die Wachstumshemmung des in Doppelemulsionen-verkapselten HBE ist wesentlich potenter im Vergleich zum

unverkapselten HBE. Dies könnte durch eine verlangsamte Freisetzung und eine Stabilisierung der bioaktiven Inhaltsstoffe, vor allem der Anthocyane, bedingt sein.

4.1.3. Beeinflussung des Zellwachstums durch die ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure

Als eine Leitsubstanz im HBE wurde Chlorogensäure auf die Beeinflussung des Zellwachstums mittels SRB-Test unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Um den Zeitverlauf zu untersuchen, wurden drei verschiedene Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h) gewählt. Die untersuchten Konzentrationen entsprechen jenen, die auch im Folgenden Western Blot Assay (siehe 4.3.) getestet wurden.

Beim Vergleich der Inkubationszeiten kann eine leichte wachstumsstimulierende Wirkung nach einer Inkubation von 72 h beobachtet werden, während bei den Inkubationszeiten von 24 und 48 h keine Beeinflussung des Zellwachstums zu erkennen ist (siehe Abb. 17).

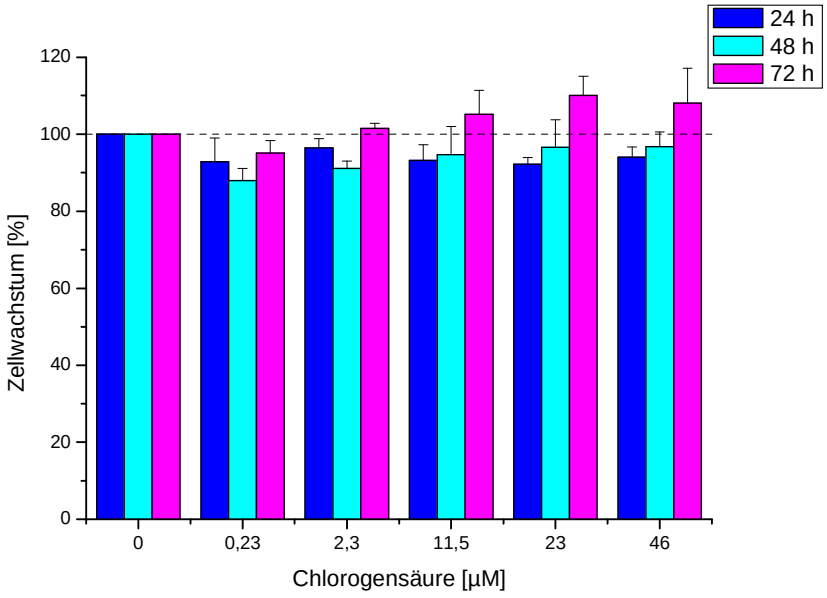


Abbildung 17 Einfluss der Chlorogensäure auf das Wachstum von HT29-Zellen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD aus mindestens vier unabhängigen Versuchen mit jeweils einer Vierfachbestimmung.

Die Zellproliferation wird durch die getestete Leitsubstanz Chlorogensäure nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 h nicht signifikant beeinflusst. Chlorogensäure stimuliert jedoch das Zellwachstums in einem geringen Ausmaß nach einer Inkubation von 72 h. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,23 µM

Chlorogensäure liegt das Zellwachstum bei 95,2 ± 3,1 % und steigt bis auf 110,1 ± 4,9 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bei einer Konzentration von 23 µM Chlorogensäure an, wobei der Wert bis zur höchsten getesteten Konzentration annähernd konstant bleibt.
Bei früheren Untersuchungen des Arbeitskreises wurde bei einer 72 h Inkubation von HT29-Zellen durch Chlorogensäure ohne Zusatz von Katalase ein IC_{50}-Wert von über 200 µM erhalten, wobei ein leichter Wachstumsstimulus bei 100 µM erkannt werden könnte [Dissertation Melanie Kern, 2006]. Es wurde jedoch zum einen in diesen Untersuchungen keine Katalase zugesetzt, um die Wasserstoffperoxidbildung zu unterdrücken, und zum anderen höhere Konzentrationen als in dieser Arbeit untersucht. Die Wachstumshemmung in höheren Konzentrationen geht möglicherweise auf die Generierung von Wasserstoffperoxid durch eine Reaktion von Chlorogensäure mit bisher unbekannten Bestandteilen des Zellkulturmediums zurück (siehe 2.6.).
Iwai et al. (2004) untersuchten die antiproliferative Aktivität von Chlorogensäure und anderen Hydroxyzimtderivaten, die sie aus grünen Kaffeebohnen isoliert hatten, nach einer Inkubationszeit von 24 h an verschiedenen Krebszelllinien. Bei vier Zelllinien (U937, MCF-7, WI38 und WI38VA) wurden IC_{50}-Werte von über 700 µM Chlorogensäure bestimmt. Nur in der Zelllinie KB (humane orale Karzinomzelllinie) lag der IC_{50}-Wert bei 140 ± 20 µM Chlorogensäure. Granado-Serrano et al. (2007) konnten nach einer Inkubation von HepG2-Zellen keinen Einfluss auf das Zellwachstum nach 18 h feststellen. Auch Jin et al. (2005) berichten, dass Chlorogensäure keine Effekte auf das Zellwachstum der Leberkrebszelllinie Hep3B nach einer 24 h Inkubation bis zu Konzentrationen von 100 µM Chlorogensäure zeigte. Diese Autoren bestätigen die hier vorgelegten Messergebnisse. Bei hohen Konzentrationen (> 500 µM) sollte die Wasserstoffperoxidbildung, da bei den meisten Untersuchungen keine Katalase zugesetzt wurde, und eine eventuelle Zytotoxizität von Chlorogensäure nicht unbeachtet bleiben.
Zheng et al. (2002) konnten ebenfalls keine Beeinflussung des Wachstums von Chlorogensäure nach einer Inkubation von 48 h feststellen. Feng et al. (2005) stellten nach einer Inkubationszeit von 72 h bei einer Konzentration von 80 µM Chlorogensäure eine signifikante Unterdrückung des Zellwachstum der humanen Lungenkrebszelllinie A 549 fest. Jedoch zeigte Chlorogensäure wenig Effekte auf das Wachstum von JB6-Zellen (murine Epithermalzelllinie) bei derselben Konzentration. Daraus folgerten Feng et al., dass Chlorogensäure möglicherweise bevorzugt Tumorzellwachstum inhibieren könnte. Diese These wird jedoch von Kutara et al., 2007 wiederlegt, die in verschiedenen Zelllinien bis zu

Konzentrationen von 100 µM Chlorogensäure keine Wachstumshemmung nach einer Inkubation von 72 h feststellten. Chlorogensäure scheint daher eine starke zelllinienspezifische Wirkung auf das Wachstum auszuüben. In dem untersuchten Konzentrationsbereich haben auch andere Arbeitsgruppen keine Wachstumshemmung nach einer Inkubation von 72 h messen können.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Chlorogensäure in dem getesteten Konzentrationsbereich zu keiner Wachstumshemmung führt, sondern eher leicht wachstumsstimulierend nach einer Inkubation von 72 h wirkt.

4.2. Einfluss ausgewählter Subfraktionen des Heidelbeerextrakts auf die Aktivität des EGF-Rezeptors

Der EGFR, aber auch andere ErbB-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellwachstums. Die Unterdrückung der Aktivierung, gemessen an der Phosphorylierung von EGFR kann zu einer Hemmung der Signalwege, wie MAPK-Kaskade, führen und wird mit einer Wachstumshemmung in Tumorzellen assoziiert [Meiers et al., 2001; Kern et al., 2005].

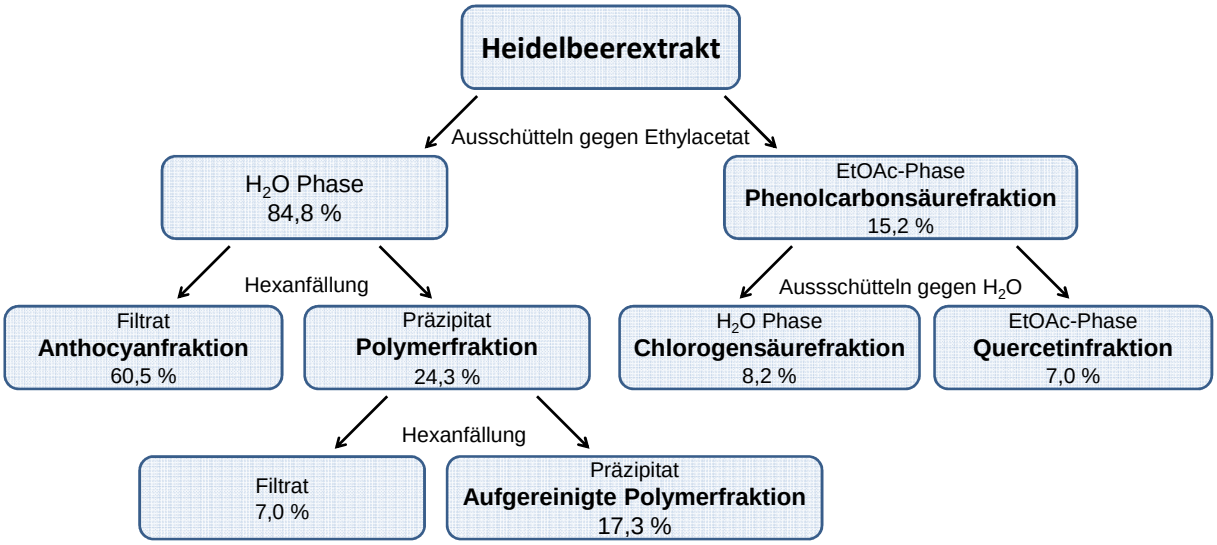
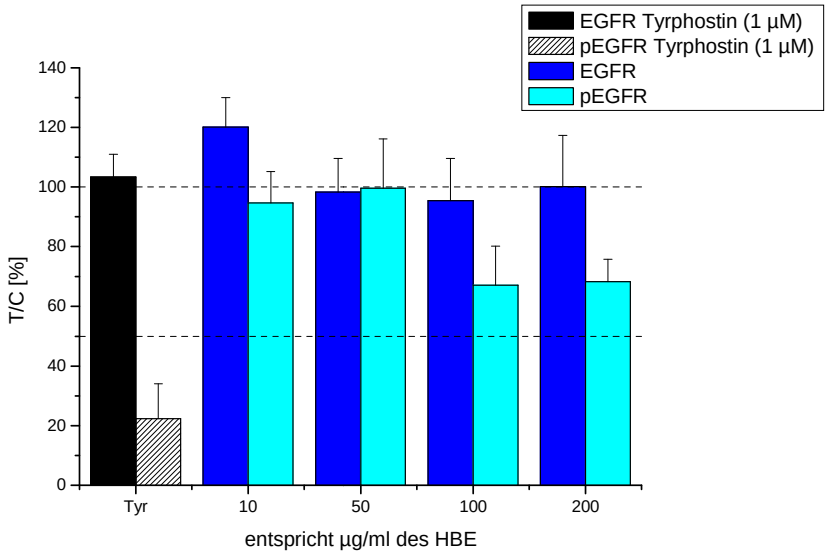


Abbildung 18 Fraktionierung des Heidelbeerextrakts durch Lösungsmittelextraktion und Fällungen ohne perfluorierte Reagenzien. H_2O: Wasser; EtOAc: Ethylacetat [modifiziert nach Technische Universität Braunschweig].

Vorherige Untersuchungen im Arbeitskreis haben gezeigt, dass der unverkapselte HBE nicht nur eine signifikante Wirkung auf das Zellwachstum hat (siehe 4.1.), sondern auch die Aktivierung des EGFRs mit einem IC_{50}-Wert von etwa 100 µg/ml signifikant unterdrückt [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko]. Der HBE wurde deshalb an der Technischen Universität Braunschweig in verschiedene Subfraktion mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgetrennt (siehe Abbildung 18), um

die Substanzklassen zu identifizieren, die für die potente Hemmung der Aktivität des EGFRs im HBE verantwortlich sein könnten.

Ausgewählte Subfraktionen (Chlorogensäurefraktion und aufgereinigte Polymerfraktion) wurden mittels Western Blot Analyse auf deren biologische Aktivität gegenüber dem EGFR untersucht. Die Konzentration der Subfraktionen wurde dabei als entsprechende Konzentration im Gesamtextrakt angegeben, um die erhaltenen Ergebnisse besser vergleichen und auf die Werte des HBE beziehen zu können.
Die Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs wurde mittels Western Blot Analyse unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht.
Die 45-minütige Inkubation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen der aufgereinigten Polymerfraktion, einer Subfraktion des HBE (17,3 % des HBE), in serumfreien Medium in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Endkonzentration 1 %). Als Positivkontrolle wurde der spezifische EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 (1 µM) bei jedem Versuch mitgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Stimulierung der EGFR-Phosphorylierung mit dem spezifischen Wachstumsfaktor EGF (100 ng/ml). Wichtig ist, dass der Proteingehalt unter den einzelnen Proben konstant gehalten wird. Dies wurde mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt und mittels der Beladungskontrolle α-Tubulin bei jedem Experiment überprüft. Aufgrund des großen Unterschiedes im Molekulargewicht der untersuchten Proteine EGFR (170 kDa) und α-Tubulin (54 kDa) konnten sie nicht in einem Gel aufgetrennt werden. Daher wurde für die Beladungskontrolle ein zusätzliches 12 %iges Polyacrylamidgel mitgeführt, während der endogene Status, sowie der phosphorylierte Rezeptor in einem 7 %igen Gel aufgetrennt wurden. Die Detektion erfolgte nach dem Western Blot mittels polyklonaler Antikörper.
Zusätzlich wurde die Zellviabilität bestimmt, wobei dieselben Bedingungen wie beim Western Blot gewählt wurden. Die Zellviabilität wurde durch Auszählen der toten und lebenden Zellen mittels Trypanblautest bestimmt (siehe 6.3.). Sie veränderte sich bei der Inkubation mit der Testsubsubstanz aufgereinigte Polymerfraktion in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO nicht signifikant (Daten nicht gezeigt), wodurch eine zytotoxische Wirkung in den getesteten Konzentrationen ausgeschlossen werden kann.
Die Ergebnisse des Western Blot aus sechs unabhängigen Versuchen sind in der Abbildung 19 dargestellt.



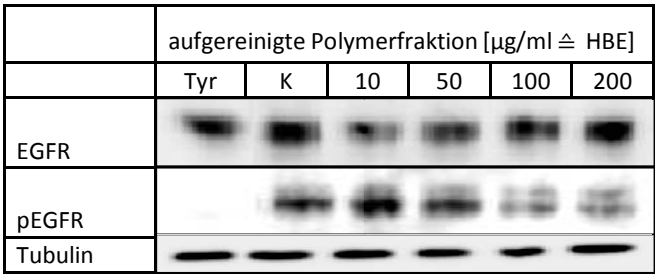


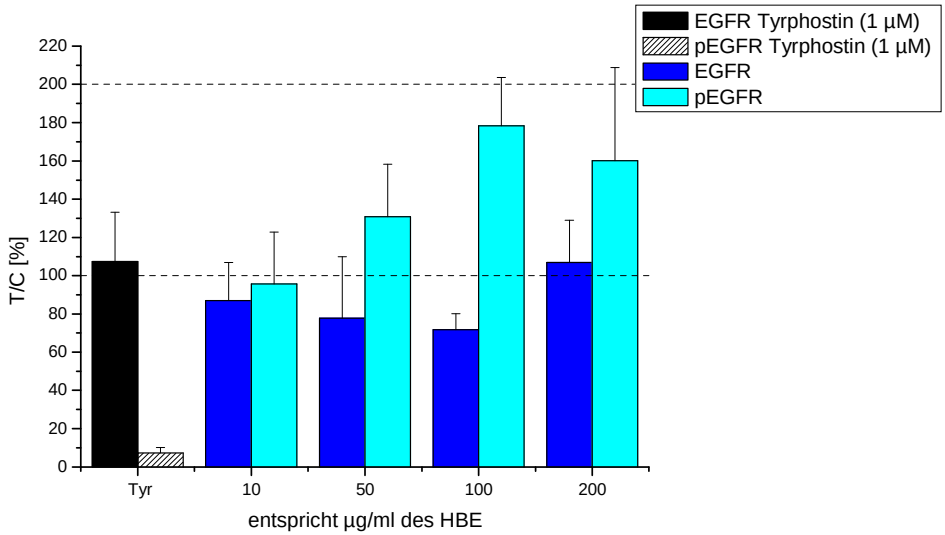
Abbildung 19 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch die aufgereinigte Polymerfraktion des Heidelbeerextrakts in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); K: Kontrolle DMSO (1 %); MW ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen.

Die Positivkontrolle Tyrphostin beeinflusst den endogenen Status des EGFRs nicht, während der Gehalt des phosphorylierten Rezeptors auf knapp 20 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO gehemmt wird. Der Gesamtproteingehalt des EGFRs bleibt bei der Inkubation mit der aufgereinigten Polymerfraktion in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO über den gesamten Konzentrationsbereich annähernd konstant. Bei der niedrigsten untersuchten Konzentration (10 µg/ml ≙ HBE) wird ein geringer Anstieg beobachtet, der jedoch auf Schwankungen innerhalb der Western Blot Analyse zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung des Rezeptors nimmt jedoch ab einer Konzentration von 100 µg/ml entsprechend des HBE ab und wird bei der höchsten Testkonzentration (200 µg/ml ≙ HBE) auf 68,2 ± 7,6 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO reduziert.
Die aufgereinigte Polymerfraktion enthält vor allem oligomere Procyanidine. Diese Verbindungen können die Aktivität des EGFRs verringern, welches die hier vorgelegten Daten bestätigt. So zeigten Fridrich et al. (2007b) das das trimere

Procyanidin PC1 in HT29-Zellen potent die EGFR-Autophosphorylierung mit einem IC_{50}-Wert von 35 ± 15 µM hemmt, während das tetramere Procyanidin PA2 keine signifikante Auswirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs bis zu einer Konzentration von 50 µM hat. Dies lässt vermuten, dass die Effektivität oligomeren Procyanidine auf den EGFR in intakten Zellen durch das ansteigende Molekulargewicht limitiert wird. Weiters konnte ein procyanidinreicher Apfelsaftextrakt, der 78,4 % Procyanidine mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad enthielt, die Aktivität des EGFRs in der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 bei Zusatz von Katalase (100 U/ml) konzentrationsabhängig verringern, wobei der endogene Status des EGFRs in der höchsten getesteten Konzentration von 200 µg/ml ebenfalls signifikant reduziert wurde. Der IC_{50}-Wert wurde auf 160 ± 25 µg/ml berechnet [Dissertation Nicole Teller, 2009].

Im Folgenden wurde die Chlorogensäurefraktion, eine Subfraktion des HBE (8,2 % des HBE) mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen auf die Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs untersucht (siehe Abb. 20).
Um zytotoxische Einflusse auszuschließen wurde auch hier eine Bestimmung der Zellviabilität unter Bedingungen des Western Blots vorangestellt. Die Zellviabilität veränderte sich bei der Inkubation mit der Testsubstanz in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle nicht signifikant (Daten nicht gezeigt), wodurch eine zytotoxische Wirkung in den getesteten Konzentrationen ausgeschlossen werden kann.
Die Positivkontrolle Tyrphostin beeinflusst den endogenen Status des EGFRs nicht, während der Gehalt des phosphorylierten Rezeptors auf knapp 10 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO gehemmt wird. Der Gesamtproteingehalt des EGFRs wird durch die Chlorogensäurefraktion in den meisten Konzentrationen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO leicht verringert, die stärkste Verringerung ist bei 100 µg/ml entsprechend des HBE zu erkennen. Eine zytotoxische Wirkung, die die Verringerung des endogenen Status des EGFRs erklären würde, wurde jedoch mittels Zellviabilitätstest ausgeschlossen. Die Phosphorylierung des Rezeptors nimmt ab einer Konzentration von 50 µg/ml entsprechend des HBE erkennbar zu und steigt bei der Testkonzentration von 100 µg/ml entsprechend des HBE auf 178,3 ± 25,3 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO an. Bei der höchsten Konzentration (200 µg/ml ≙ HBE) fällt der Phosphorylierungsstatus wieder um etwa 20 % auf 160,2 ± 48,2 % in

Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO ab. Bei diesem Wert ist die Standardabweichung mit 48 % jedoch höher.



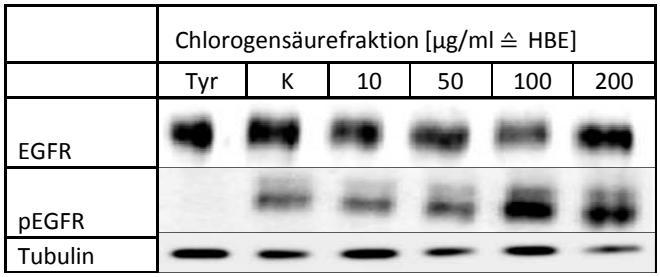


Abbildung 20 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch die Chlorogensäurefraktion des Heidelbeerextrakts in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); K: Kontrolle DMSO (1 %); MW ± SD aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen.

Zur Modulation der Aktivität des EGFRs durch Chlorogensäure konnten keine vergleichbaren Daten in der Literatur eruiert werden. Deshalb wird dieser Versuch zur Bestätigung des Ergebnisses, dass Chlorogensäure zu einer Aktivierung der EGFR-Autophosphorylierung führt, mit der Einzelsubstanz Chlorogensäure weiter untersucht (siehe 4.3.).

Im Arbeitskreis wurden weitere Subfraktionen des HBE (Phenolcarbonsäurefraktion, Anthocyanfraktion, Polymerfraktion und Quercetinfraktion) auf die Modulation der Aktivität des EGFRs untersucht. Die Anthocyanfraktion und die Polymerfraktion führten zu einer potenten, konzentrationsabhängigen Unterdrückung der EGFR-Aktivität ohne den endogenen Status signifikant zu beeinflussen. Die Phenolcarbonsäurefraktion konnte die

Phosphorylierung des EGFRs auch konzentrationsabhängig auf etwa 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle verringern, während die Quercetinfraktion die Aktivität des EGFRs nicht signifikant modellierte. Der endogene Status des EGFRs wurde dabei nicht signifikant verändert [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko]. Um die Subfraktionen untereinander und mit dem HBE besser vergleichen zu können, sind die Ergebnisse der Modulation der Aktivität des EGFRs durch die jeweils höchste getestete Konzentration (200 µg/ml ≙ HBE) in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Einfluss der getesteten Subfraktionen und des Heidelbeerextrakts auf die Phosphorylierung des EGFRs in der höchsten getesteten Konzentration (200 µg/ml ≙ HBE) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle, angegeben als T/C in [%] und die prozentuelle Verteilung im HBE [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko].

	[% des HBE]	pEGFR [%]
Heidelbeerextrakt	100	35,4 ± 6,7
Phenolcarbonsäurefraktion	15,2	68,9 ± 11,8
Anthocyanfraktion	60,5	50,7 ± 28,6
Polymerfraktion	24,3	51,7 ± 8,4
aufgereinigte Polymerfraktion	17,3	68,2 ± 7,6
Chlorogensäurefraktion	8,2	160,2 ± 48,2
Quercetinfraktion	7,0	100

Alle Subfraktionen, außer die Chlorogensäurefraktion und die Quercetinfraktion, senken die Aktivität der Autophosphorylierung des EGFRs in mindestens den beiden höchsten getesteten Konzentrationen (100 und 200 µg/ml ≙ HBE). Die Quercetinfraktion hat in den getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aktivität des EGFRs, während die Chlorogensäurefraktion als einzige zu einer erhöhten Phosphorylierung des EGFRs, in den untersuchten Konzentrationen, führt.

Der HBE wurde in die vier Subfraktionen Anthocyanfraktion, Polymerfraktion, Chlorogensäurefraktion und Quercetinfraktion aufgetrennt (siehe Abb. 18). Für die folgende hypothetische Berechnung werden mögliche synergistische und antagonistische Effekte der Fraktionen untereinander, sowie jegliche Wechselwirkungen vorerst außer Acht gelassen. Dafür sind die Mittelwerte verwendet und die Standardabweichung vernachlässigt worden. Es wird die Summe der Phosphorylierungsstati der vier Subfraktionen in der höchsten Konzentration (siehe Tab. 3) in [%] gebildet und durch die Anzahl der Subfraktionen dividiert. Dabei wird eine theoretische durchschnittliche Aktivität des EGFRs, nach Inkubation mit den Einzelfraktionen, von 90 % berechnet. Diese kann mit der Wirkung des Gesamtextrakts verglichen werden. Die gemessene

Autophosphorylierung des EGFRs durch den HBE liegt bei 35,4 ± 6,7 %, was einer Differenz von etwa 55 % im Vergleich zu dem berechneten Wert von 90 % entspricht. Der Unterschied, zwischen Gesamtextrakt und der theoretisch errechneten Gesamtwirkung der einzelnen Fraktionen, könnte mit synergistischen Effekten einzelner Fraktionen, wie Polymerfraktion und Anthocyanfraktion, erklärt werden, oder dass der antagonistische Effekt der enthaltenen Chlorogensäure durch andere Inhaltsstoffe abgeschwächt oder sogar aufgehoben wird. Die Phenolcarbonsäurefraktion, wie bereits erwähnt wurde, führte zu einer Senkung der Aktivität des EGFRs auf ca. 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko]. Diese wurde weiter in die Chlorogensäurefraktion und die Quercetinfraktion aufgetrennt. Die Quercetinfraktion enthält vor allem die Flavonole Quercetin und Myricetin und deren Glykoside, während die Chlorogensäurefraktion größtenteils aus Chlorogensäure besteht, aber auch noch kleinere Mengen anderer Hydroxyzimtsäuren enthält. Nach der Fraktionierung ist nicht nur ein Verlust der Hemmwirkung auf die Phosphorylierung des EGFRs, sondern eine starke Aktivitätserhöhung durch die Chlorogensäurefraktion zu beobachten. Dies ist schwierig zu erklären, möglicherweise könnte die Chlorogensäure als Einzelsubstanz, bei Fehlen weiterer Verbindungen, ihre aktivitätssteigernde Wirkung auf den EGFR ausüben, während weitere Inhaltsstoffe der Phenolcarbonsäurefraktion, wie z.B. die Quercetinglykoside, diese Wirkung unterdrücken. Antagonistische Effekte der verschiedenen Verbindungen sind eine mögliche Erklärung, was jedoch weiterer Untersuchungen bedarf.

Es gibt auch weitere Indizien, dass es zu antagonistischen und sich überlagernden Wirkungen im Gesamtextrakt kommt. Es ergibt sich eine rechnerisch deutlich höhere Hemmung der Subfraktionen Anthocyanfraktion, Polymerfraktion und Phenolcarbonsäurefraktion im Vergleich zum Gesamtextrakt, wenn statt der Chlorogensäurefraktion und der Quercetinfraktion die Phenolcarbonsäurefraktion betrachtet wird (siehe Abb. 18 und Tab. 3). Wie bereits erwähnt, findet sich diese rechnerisch höhere Aktivitätsminderung im gesamten HBE nur in abgeschwächter Form wieder, um aber nähere Aussagen treffen zu können, sollten die Fraktionen noch genauer charakterisiert und rekonstituierte Mischungen hergestellt werden, um die hier beobachteten Effekte und zugrundeliegenden Wirkmechanismen besser erfassen zu können.

4.3. Einfluss von Chlorogensäure auf die Aktivität des EGF-Rezeptors und nachgeschaltete Signalelemente

Um die Ergebnisse der Aktivitätssteigerung des EGFRs durch die Chlorogensäurefraktion, eine Subfraktion des HBE, zu bestätigen, wird der Versuch mit der Reinsubstanz Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) durchgeführt. Um die beiden Messungen besser vergleichen zu können, wird angenommen, dass die Chlorogensäurefraktion zu 100 % aus Chlorogensäure besteht. Daraus werden die Konzentrationen berechnet, die dann im Western Blot eingesetzt werden, um dieselben Absolutmengen zu erhalten. Die entsprechenden getesteten Konzentrationen betragen demnach 46 µM, 23 µM, 11,5 µM und 2,3 µM Chlorogensäure.

Die Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs durch Chlorogensäure wurde mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht (siehe Abb. 21).

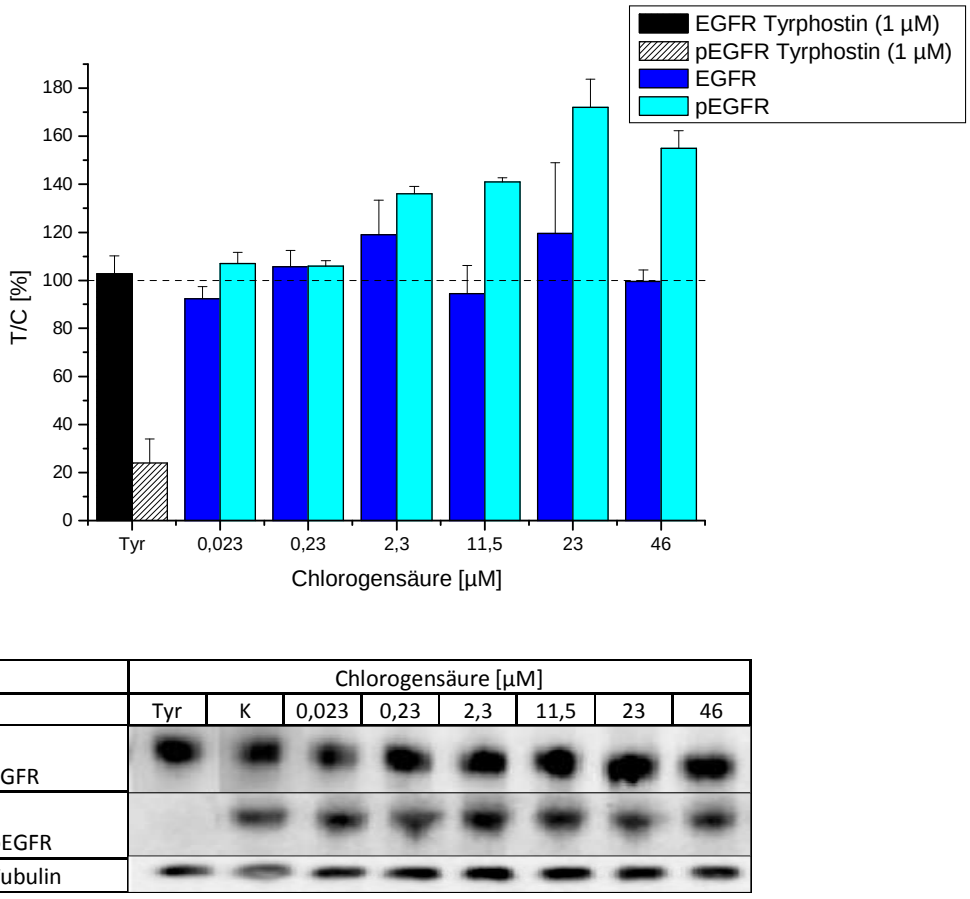


Abbildung 21 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); K: Kontrolle DMSO (1 %); MW ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Die Positivkontrolle Tyrphostin beeinflusst den endogenen Status des EGFRs nicht, während der Gehalt des phosphorylierten Rezeptors auf knapp 25 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle gehemmt wird. Der Gesamtproteingehalt des EGFRs bleibt bei der Inkubation mit Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO über den gesamten Konzentrationsbereich annähernd konstant. Die Phosphorylierung des Rezeptors steigt jedoch ab einer Konzentration von 2,3 µM Chlorogensäure an. Sie erreicht bei einer Konzentration von 23 µM Chlorogensäure mit 171,7 ± 11,7 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO die höchste Aktivität und liegt bei der höchsten getesteten Chlorogensäurekonzentration (46 µM) bei 155,2 ± 7,3 %.
Um die Ergebnisse zur Aktivierung des EGFRs durch Chlorogensäure und die Chlorogensäurefraktion zu vergleichen, ist in Abbildung 22 der jeweilige Phosphorylierungsstatus aufgetragen.

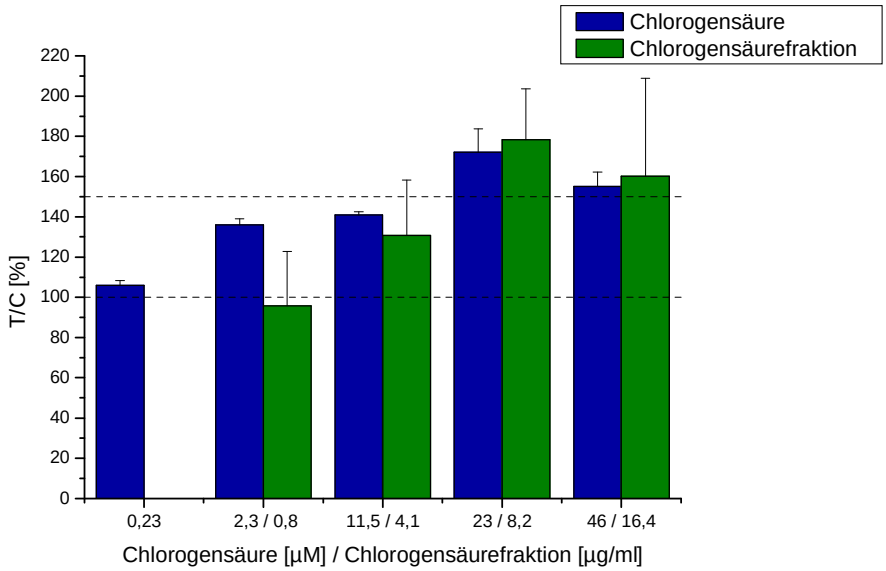


Abbildung 22 Vergleich der Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure und die Chlorogensäurefraktion in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO.

Die Aktivierung des EGFRs durch die Chlorogensäure und die Chlorogensäurefraktion unterscheidet sich nicht signifikant, sodass gefolgert werden kann, dass die aktivierende Wirkung der Chlorogensäurefraktion hauptsächlich auf Chlorogensäure zurückgeht. Weiters ist zu erkennen, dass die Standardabweichungen der Reinsubstanz im Vergleich zur Fraktion deutlich geringer sind. Die Chlorogensäurefraktion ist komplexer aufgebaut und es

überlagern sich möglicherweise aktivierende und deaktivierende Effekte auf den EGFR, wodurch die erhöhte Standardabweichung erklärt werden könnte.
Die durchgeführten Messungen bekräftigen also die Annahme, dass Chlorogensäure zu einer Aktivitätssteigerung des EGFRs führt. Es gibt mehrere Ansätze, um dies zu erklären.
Eine Möglichkeit wäre, dass Chlorogensäure in die Freisetzung der EGFR-Liganden eingreift und deren Proteolyse beeinflusst (siehe 2.3.2.). Eine Freisetzung beispielsweise des EGFR-Liganden EGF könnte dann die Aktivierung des Rezeptors bedingen.
Die Modulation der Phosphorylierung von EGFR durch Chlorogensäure (46 µM) wurde mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen ohne Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor EGF untersucht (siehe Abb. 24). Die Ergebnisse zeigen, dass ohne eine Aktivierung des EGFRs durch den Wachstumsfaktor EGF kein Unterschied zwischen der Lösungsmittelkontrolle DMSO und Chlorogensäure (46 µM) zu erkennen ist.

	Chlorogensäure		
	K	K	CGA
EGF-Stimulierung	+	-	-
pEGFR			

Abbildung 23 Repräsentativer Western Blot mit Antikörper gegen pEGFR nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure (46 µM) mit und ohne EGF-Stimulierung. K: Kontrolle DMSO (1 %); CGA: Chlorogensäure (46 µM).

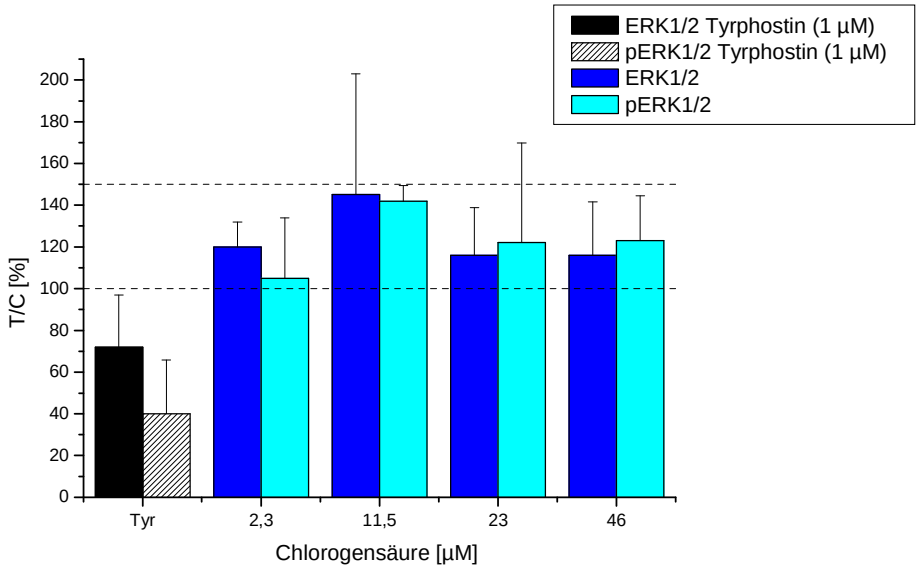
Demnach scheint der Einfluss der Chlorogensäure auf die Freisetzung von EGF höchstwahrscheinlich gering zu sein. Die potente Steigerung der Aktivität des EGFRs durch Chlorogensäure auf über 150 % ist demnach wahrscheinlich nicht auf eine Freisetzung von EGF zurückzuführen.
RTKs, die nach der Aktivierung durch Wachstumsfaktoren an ihrer intrazellulären Domäne tyrosinphosphoryliert werden, sind vorwiegend zwei regulierenden Mechanismen ausgesetzt: Dephosphorylierung, durch die PTPs vermittelt, und Endozytose [Stuible et al., 2010]. Die Hypothese, dass Chlorogensäure durch eine Hemmung des Rezeptor-Recyclings zur Aktivitätssteigung des EGFRs führt, ist unwahrscheinlich, da eine gleichzeitige Erhöhung des endogenen Status des EGFRs im Western Blot nicht beobachtet worden ist. Der Einfluss von Chlorogensäure auf die Endozytose wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer untersucht.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Steigerung der Phosphorylierung des EGFRs beitragen könnte, wäre eine Modulation der PTPs.
Die PTP-Superfamilie an Enzymen fungiert in einer koordinierten Art mit PTKs, um die Signalwege zu kontrollieren, die ein breites Spektrum von fundamentalen physiologischen Prozessen kontrollieren [Tonks, 2006]. PTPs, welche Membran-gebundene Rezeptortypen und zytoplasmatische Formen inkludieren, sind Enzyme, die Phosphat von phosphorylierten Tyrosinen in Proteinen entfernen. PTPs sollen auf die Aktionen von PTKs antagonistisch wirken, die Phosphate an Tyrosinen in Proteinen hinzufügen [Tal et al., 2006; Yuan et al., 2010]. RTKs, wie der EGFR, können auch durch PTP-Inhibitoren aktiviert werden [Schlessinger et al., 2000]. Tal et al. (2006) bewiesen diesen Mechanismus für Zn^{2+}.
In der Literatur werden verschieden PTPs erwähnt, die EGFR als Substrate haben. Beispiele für PTPs, die den EGFR dephosphorylieren, sind PTP1B, PTPN9, PTPN6/Shp-1, PTPN13, LAR, PTP-σ und T-cell PTP [Östman und Böhmer, 2001; Tal et al., 2006; Yuan et al., 2010]. Die PTP1B wird für die weiteren Tests ausgewählt, da Zhu et al. (2007) nachweisen konnten, dass die PTP1B in HT29-Zellen exprimiert wird. Die PTP1B ist eine Nicht-Transmembrane PTP und wurde in vielen Studien auf die direkte Phosphorylierung und negative Regulierung von RTKs miteinbezogen [Tonks et al., 2006; Stuible et al., 2010].
Muthusamy et al. (2010) konnten die PTP1B-Inhibierung durch Chlorogensäure (von 1 pg bis 10 mg) mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat und einer Änderung der Absorption bei 405 nm messen. Sie gaben an, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der PTP1B-Enzymaktivität gekommen ist und ein IC_{50}-Wert von 3,12 µg berechnet wurde. Diese Angabe des IC_{50}-Wertes ist ungewöhnlich, da das Ergebnis auf kein Volumen bezogen wird.
In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof. Dirsch wurden Chlorogensäure und einige andere chlorogensäurehaltige Mischungen auf die Hemmung der PTP1B-Aktivität im zellfreien System getestet. Chlorogensäurehaltige Mischungen waren die Chlorogensäurefraktion (Subfraktion des HBE, siehe 4.2.), ein Apfelsaftextrakt der Ernte 2002 (AE02, siehe 4.5. bezüglich der Zusammensetzung) und die rekonstituierten Extrakte des AE02 mit (A) und ohne (B) Chlorogensäure (siehe 4.5. bezüglich der Zusammensetzung).
Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Muthusamy et al. zeigte Chlorogensäure in den getesteten Konzentrationen von 10 bis 200 µM keine Hemmung der PTP1B-Aktivität. Die Chlorogensäurefraktion wurde in den Konzentrationen, die im Western Blot untersucht wurden, getestet und führte in der höchsten Konzentration (200 µg/ml ≙ HBE) zu einer Hemmung der PTP1B-Enzymaktivität um ca. 30 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Diese Hemmung kann auf andere

Verbindungen in dieser Fraktion, aber nicht auf Chlorogensäure, zurückgeführt werden, da diese selbst zu keiner Hemmung führte. Der Apfelsaftextrakt AE02, der in einer Konzentration von 500 µg/ml getestet wurde, zeigte eine potente Hemmung der PTP1B-Aktivität auf unter 10 %. Auch die beiden rekonstituierten Extrakte mit und ohne Chlorogensäure (1-500 µg/ml) bewirkten eine konzentrationsabhängige Inhibierung der PTP1B-Aktivität auf unter 5 % in der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml, wobei beide Extrakte ähnliche Effekte lieferten [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Dirsch]. Dies bestätigt die Annahme, dass Chlorogensäure keinen Einfluss auf die PTP1B-Enzymaktivität hat und vermutlich weitere Bestandteile des AE02 für die PTP1B-hemmenden Eigenschaften verantwortlich zu sein scheinen.
Durch die Messungen konnte geklärt werden, dass Chlorogensäure zu keiner Hemmung der PTP1B-Aktivität führt und somit dies nicht der zugrundeliegende Mechanismus ist, der für die Aktivierung des EGFRs verantwortlich ist.
Aber es stellt sich die weitere Frage, welche Verbindung im rekonstituierten Extrakt zu so einer potenten Hemmung der PTP1B-Aktivität fähig ist. Deshalb wurden die restlichen Inhaltsstoffe (mit der Ausnahme von Phloridzin) auf die Hemmung der Enzymaktivität von der PTP1B getestet. Dazu wurden die Verbindungen so eingewogen, dass sich jene Konzentrationen ergaben, in welcher sie in der höchsten Konzentration (500 µg/ml) im rekonstituierten Extrakt vorgelegen sind.
Kaffeesäure, (-)-Epicatechin, Quercitrin, Hyperosid, Isoquercitrin und Rutin beeinflussten die Enzymaktivität der PTP1B in einem geringen Ausmaß oder gar nicht, während die Procyanidine in einer Konzentration von 41,8 µg/ml zu einer potenten Hemmung von unter 10 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO führten. Für die Procyanidine wurde ein IC_{50}-Wert von 2,34 µg/ml bestimmt.
Dieses Ergebnis muss noch hinterfragt werden, da die Procyanidine eine gefärbte Lösung ergeben und diese mit der Absorptionsmessung zur Bestimmung der Enzymaktivität interferieren kann. Weiters sind Procyanidine Gerbstoffe, die an Proteine binden können [Hensen et al., 2004], was die Messung beeinflussen könnte.
Durch diese Versuche konnte der Mechanismus der EGFR-Aktivierung durch Chlorogensäure und ausgewählte chlorogensäurereiche Mischungen also nicht aufgeklärt werden.
Eine andere Möglichkeit wäre, dass der EGFR zusätzlich auch durch Kinasen, wie Src oder Jak-2 transphosphoryliert wird [Jorisson et al., 2003]. Chlorogensäure könnte die Kinasen aktivieren und so zu einem Anstieg des Phosphorylierungsstatus des EGFRs führen.

Die EGFR-Transaktivierung wird jedoch nicht nur durch Kinasen, wie Src, reguliert, sondern auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, PKC, intrazelluläres Calcium und cAMP können einen Einfluss haben [Bassa et al., 2007]. Bassa et al. zeigten an Lysophosphatylcholin, ein Hauptbestandteil von oxidiertem low density Lipoprotein, in humanen Mesangialzellen, dass die induzierte Phosphorylierung des EGFRs mit einer Aktivierung der Src-Kinase einhergeht. Durch eine Aktivierung von Src wurde die EGFR-Transaktivierung stimuliert. Ob dieses in dem hier aufgetretenen Fall auch eine Erklärung sein könnte, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.
Wie bereits erwähnt, haben Agonisten von einigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z.B. Endothelin, Angiotensin und Thrombin) gezeigt, dass die Tyrosinphosphorylierung von z.B. EGFR stimuliert wird [Schlessinger, 2000]. Hierzu wurde aber nichts Näheres in Bezug auf die Chlorogensäure oder verwandte Verbindungen in der Literatur gefunden.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Chlorogensäure und einzelne chlorogensäurereiche Extrakte den Phosphorylierungsstatus des EGFRs ohne Beeinflussung des endogenen Status erhöhen. Es müssen jedoch noch weitere Untersuchungen folgen, um den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären.

Weiters wird der Einfluss von Chlorogensäure auf die nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 untersucht. Es soll die Modulation der Aktivität der dem EGFR-nachgeschalteten Signalelementen ERK1/2 durch Chlorogensäure untersucht werden, um zu zeigen, ob es zu einer Weiterleitung des aktivierten Signals des EGFRs kommt oder dieses bis zu ERK1/2 unterbrochen wird.
Die Modulation des Phosphorylierungsstatus und des Gesamtproteingehalt von ERK1/2 wurde mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Die Inkubation mit Chlorogensäure erfolgte in den entsprechenden Konzentrationen wie beim Western Blot zur Modulation des EGFRs. Auch die Bedingungen für die Inkubation und Stimulierung, sowie die Positivkontrolle und die Beladungskontrolle wurden entsprechend gewählt (siehe Abb. 24).
Die beiden Banden von ERK1/2 liegen bei 42 bzw. 44 kDa und wurden bei der Elektrophorese gut aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte aber über beide Banden, da die Peaks nicht basisliniengetrennt waren.



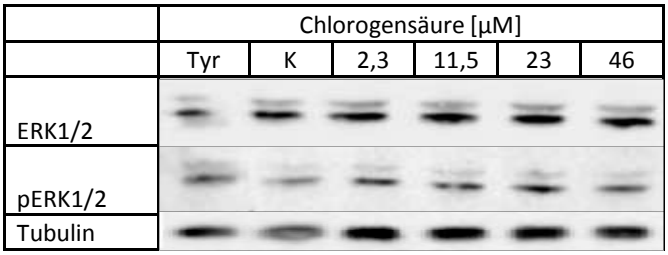


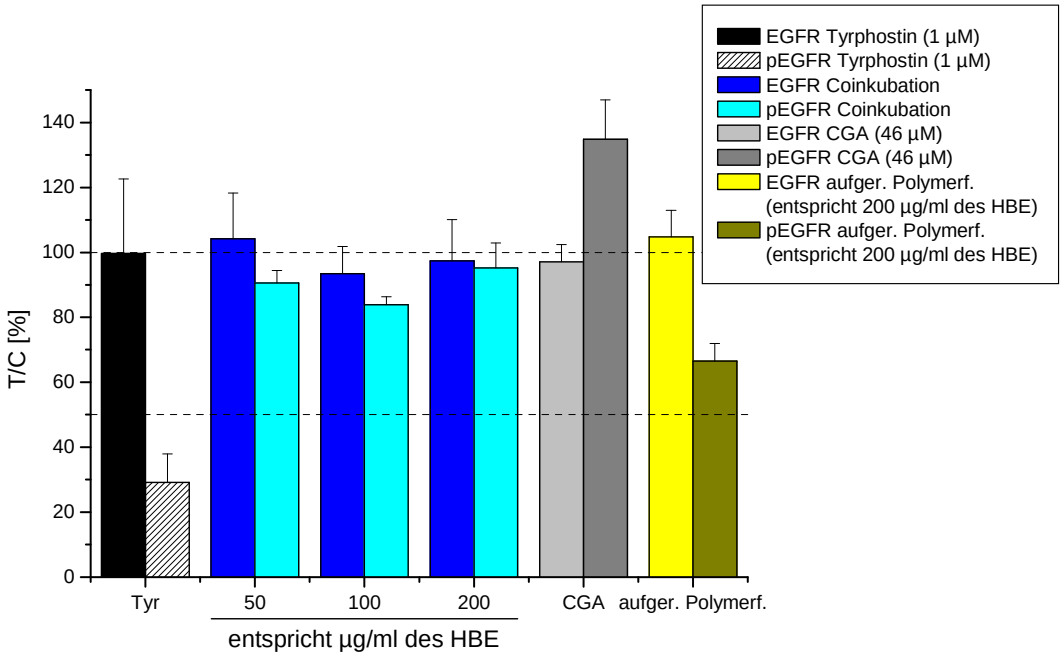
Abbildung 24 Modulation des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); K: Kontrolle DMSO (1 %); MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Tyrphostin führt zu einer leichten Senkung des Gesamtproteingehalts von ERK1/2 und der Phosphorylierungsstatus geht auf etwa 40 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO zurück. Der endogene Status von ERK1/2 wird durch die Inkubation mit Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO leicht um 10-20 % erhöht. Bei einer Chlorogensäurekonzentration von 11,5 µM wird sogar ein Anstieg auf ca. 140 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle gemessen, wobei die Standardabweichung bei diesem Messwert mit über 50 % sehr hoch ist. Auch der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 ist im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöht, wobei die höchste Aktivierung mit 142,0 ± 7,4 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bei einer Konzentration von 11,5 µM Chlorogensäure erreicht wird. Die höhere Standardabweichung könnte auch damit erklärt werden, dass die Signalelemente ERK1/2 in der Signalkaskade nachgeschaltet liegen und sie durch andere Signalwege stärker beeinflusst werden können.

Aus den hier dargelegten Daten kann darauf geschlossen werden, dass der endogene Status und auch die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 durch Inkubation mit Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO ansteigen. Das Verhältnis von endogenem Status zu phosphoryliertem ERK1/2 bleibt jedoch annähernd konstant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Der Anstieg des endogenen Status kann nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückgeführt werden, da Tubulin als Beladungskontrolle mitgeführt wurde und konstant blieb. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Chlorogensäure die Transkription von ERK1/2 steigert, was auf Grund der kurzen Inkubationsdauer aber unwahrscheinlich ist, jedoch durch weitere Versuche abgesichert werden sollte.
Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die starke Aktivierung des EGFRs bis zu den weiteren Signalelementen ERK1/2 abgeschwächt wird, aber der endogene Status ansteigt. Der phosphorylierte Status der nachgeschalteten Signalelemente steigt durch die Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO an, d.h. das die dem EGFR-nachgeschaltete Signalweiterleitung stattfindet.

4.4. Einfluss des Coinkubats auf die Aktivität des EGF-Rezeptors

Nach den Untersuchungen der Reinsubstanz Chlorogensäure wird im Folgenden die Beeinflussung der Signalelemente EGFR und ERK1/2 durch die Chlorogensäure in Kombination mit weiteren Verbindungen untersucht. Zu diesem Zweck wird eine Coinkubation der Chlorogensäure mit der aufgereinigten Polymerfraktion durchgeführt. Die unter 4.2. untersuchte aufgereinigte Polymerfraktion, eine Subfraktion des HBE, wird deshalb mit Chlorogensäure versetzt. Das Coinkubat soll jene Konzentration an aufgereinigter Polymerfraktion und Chlorogensäure haben, die im HBE bei einer Konzentration von 200 µg/ml enthalten sind. Die verschiedenen Konzentrationen werden durch Verdünnung mit DMSO hergestellt, wobei sich die Absolutkonzentration ändert, aber das Verhältnis zwischen aufgereinigter Polymerfraktion und Chlorogensäure konstant bleibt.
Die Modulation des Phosphorylierungsstatus von EGFR wurde mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Die Inkubation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen des Coinkubats, das aus aufgereinigter Polymerfraktion und Chlorogensäure zusammengesetzt war. Als Kontrollen wurden die aufgereinigte Polymerfraktion (200 µg/ml ≙ HBE) und die Chlorogensäure (46 µM) in der höchsten im Coinkubat vorliegenden Konzentrationen mitgeführt (siehe Abb. 25).



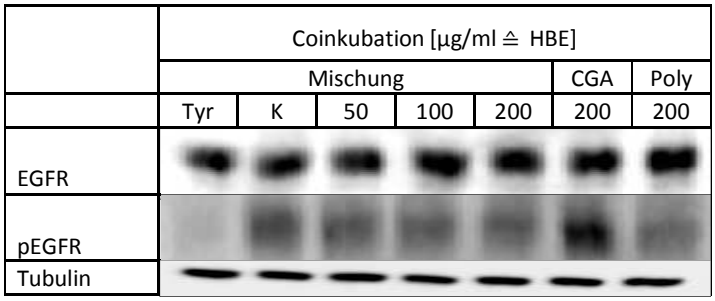


Abbildung 25 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch die mit Chlorogensäure versetzte aufgereinigte Polymerfraktion des HBE in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Als weitere Kontrollen wurden Chlorogensäure und die aufgereinigte Polymerfraktion in der höchsten Konzentration mitgeführt. Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); K: Kontrolle DMSO (1 %); CGA: Chlorogensäure; Poly: aufgereinigte Polymerfraktion; MW ± SD aus vier unabhängigen Versuchen.

Die Positivkontrolle Tyrphostin hemmt den Gehalt des phosphorylierten Rezeptors auf etwa 30 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle ohne den endogenen Status zu verändern. Der Gesamtproteingehalt des EGFRs wird vom Coinkubat, sowie den beiden Kontrollen aufgereinigte Polymerfraktion und Chlorogensäure im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO nicht signifikant verändert. Die Phosphorylierung des Rezeptors bleibt bei der Inkubation mit dem Coinkubat annähernd konstant bei Werten um ca. 90 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, d.h. der Effekt des Coinkubats auf die Aktivität des EGFRs ist marginal. Im Gegensatz dazu erhöht die Chlorogensäure die Aktivität auf über 130 % und die aufgereinigte Polymerfraktion senkt die Phosphorylierung auf unter 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle.

Wie in 4.2. erwähnt wurde, zeigten die Procyanidine, die den Hauptbestandteil der aufgereinigten Polymerfraktion darstellen, in mehren Studien eine Hemmung der EGFR-Aktivität [Fridrich et al., 2007b; Dissertation Nicole Teller, 2009]. Auch die Untersuchung der aufgereinigten Polymerfraktion führte zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Phosphorylierung des EGFRs ohne den endogenen Status zu beeinflussen (siehe 4.2.). Im Gegensatz dazu, erhöhte die Chlorogensäure und auch eine chlorogensäurereiche Mischung, die Chlorogensäurefraktion, die Aktivität des EGFRs (siehe 4.2. und 4.3.).
Chlorogensäure und die oligomeren Procyanidine, die in der aufgereinigten Polymerfraktion enthalten sind, wirken möglicherweise antagonistisch und heben ihre jeweiligen Effekte auf, sodass die Phosphorylierungsaktivität des EGFRs durch das Coinkubation zwischen den beiden Aktivitäten der Ausgangsverbindungen liegt und die Aktivität des Rezeptors annähernd unbeeinflusst bleibt.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die aktivitätssteigernde Wirkung der Chlorogensäure auf die Phosphorylierung des EGFRs durch die Anwesenheit der Procyanidine gehemmt wird und wahrscheinlich antagonistische Effekte zwischen diesen Verbindungen zum Tragen kommen.

4.5. Einfluss des rekonstituierten Extrakts AE02 auf die Aktivität des EGF-Rezeptors und nachgeschaltete Signalelemente

In früheren Untersuchungen des Arbeitskreises zeigte der chlorogensäurereiche Apfelsaftextrakt AE02 potente Wirkungen auf das Zellwachstum und damit assoziierte Signalkaskaden [Kern et al., 2005; Fridrich et al, 2007a]. Um die Wirkung der enthaltenen Chlorogensäure weiter zu untersuchen, wurde ein rekonstituierter Extrakt hergestellt.
Dazu wurden zwei rekonstituierte Extrakte hergestellt, wobei ein Extrakt die originären Gehalte des AE02 an Chlorogensäure enthielt und im zweiten die Chlorogensäure durch Glucose ersetzt wurde. Der Einfluss der beiden Extrakte auf die Modulation der Aktivität des EGFRs und der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 sollte im Folgenden untersucht werden.
Die Zusammensetzung des Apfelsaftextrakts AE02 und des rekonstituierten Extrakts mit (A) und ohne (B) Chlorogensäure sind in der Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4 Bisher identifizierte Inhaltsstoffe des Apfelsaftextrakts AE02 und Zusammensetzung der rekonstituierten Extrakte AE02 mit (A) und ohne (B) Chlorogensäure [modifiziert nach Kern et al., 2005].

bekannte Verbindungen	AE02 (mg/g)
Proanthocyanidin B1	7
Proanthocyanidin B2	15,1
(-)-Epicatechin	19,2
Phloretinglycosid 1	24,7
Phloretinglycosid 2	9
Phloretin-xyloglucosid	66,2
Phloridzin	27,9
Chlorogensäure	181,5
3-Coumaroylchinasäure	9,5
4-Coumaroylchinasäure	77,3
5-Coumaroylchinasäure	10,4
Kaffeesäure	4,8
Quercetin-3-rhamnose	4,1
Quercetin-3-galactose	0,8
Quercetin-3-glucose	1,4
Quercetin-3-rutinose	2,6
Total	533,9

Substanz	A [mg]	B [mg]
Chlorogensäure	58,4	-
Glucose	-	58,4
Kaffeesäure	1,5	1,5
Phloridzin	8,9	8,9
(-)-Epicatechin	6,2	6,2
Procyanidine	7,1	7,1
Quercitrin	1,3	1,3
Hyperosid	0,258	0,258
Isoquercitrin	0,451	0,451
Rutin	0,839	0,839
Total	85	85

Die Modulation des Phosphorylierungsstatus von EGFR wurde mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Die Inkubation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekonstituiertem Extrakt mit (A) und ohne (B) Chlorogensäure und dem Apfelsaftextrakt AE02 in der höchsten getesteten Konzentration (500 µg/ml) als Kontrolle (siehe Abb. 26 und 27).

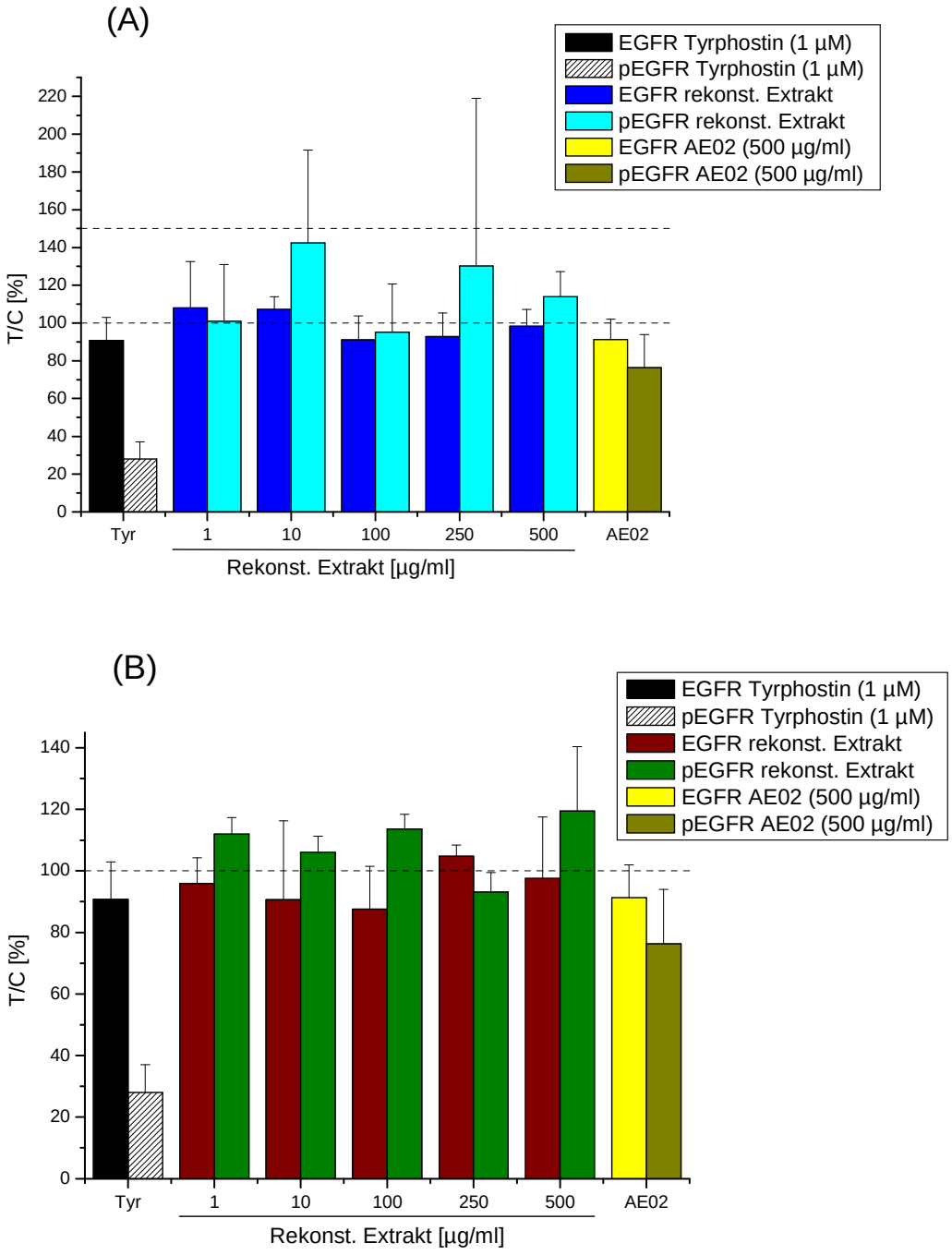


Abbildung 26 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch **(A)** den rekonstituierten Extrakts AE02 mit Chlorogensäure (A) und **(B)** den rekonstituierten Extrakt AE02 ohne Chlorogensäure (B) in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Als weitere Kontrolle wurde der Apfelsaftextrakt AE02 in der höchsten Konzentration (500 µg/ml) mitgeführt. MW ± SD aus vier unabhängigen Versuchen. Tyr: Tyrphostin (1 µM).

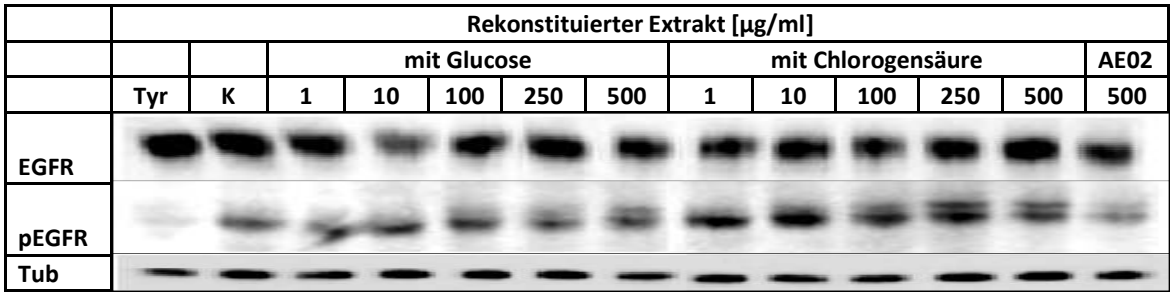


Abbildung 27 Repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen EGFR, pEGFR und Tubulin nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch den rekonstituierten Extrakt mit und ohne Chlorogensäure und den Apfelsaftextrakt AE02. Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); K: Kontrolle DMSO (1 %).

Die Positivkontrolle Tyrphostin beeinflusst den Gesamtproteingehalt des EGFRs nicht, während der Gehalt des phosphorylierten Rezeptors auf knapp 30 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO gesenkt wird. Der endogene Status des EGFRs bleibt bei der Inkubation mit dem rekonstituierten Extrakt (A), (B) und den Apfelsaftextrakt AE02 in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO über den gesamten Konzentrationsbereich annähernd konstant. Die Phosphorylierung des Rezeptors verändert sich bei der Inkubation mit dem rekonstituierten Extrakt (A) wenig, mit Ausnahme der Konzentrationen von 10 und 250 µg/ml. Bei diesen beiden Konzentrationen kommt es zu einer starken Aktivierung des EGFRs auf über 130 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Bei diesen beiden Konzentrationen liegt jedoch die Standardabweichung mit 49 und 89 % deutlich über dem für den Western Blot üblichen Bereich. Die Inkubation mit dem rekonstituierten Extrakt (B) beeinflusst die Aktivität des EGFRs über den gesamten Konzentrationsbereich wenig. Der Apfelsaftextrakt AE02 hemmt die EGFR-Phosphorylierung auf 76,3 ± 17,7 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle.

In früheren Untersuchungen des Arbeitskreises hemmte der polyphenolreiche Apfelsaftextrakt AE02 das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 potent (IC_{50} = 134 ± 18 µg/ml) und die Proteintyrosinkinaseaktivität des EGFRs wurde in einem zellfreien Testsystem effektiv gesenkt (IC_{50} = 10 ± 5 µg/ml) [Kern et al., 2005]. Auch in intakten Zellen wurde eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus des EGFRs bei der Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) beobachtet (IC_{50} = 90 ± 12 µg/ml) [Fridrich et al., 2007a]. Um die potenten EGFR-hemmenden Inhaltsstoffe zu identifizieren, wurde ein rekonstituierter Extrakt hergestellt, der jedoch geringe wachstumshemmende Wirkung zeigte. Daher wurde postuliert, dass bisher nicht identifizierte Apfelsaftinhaltstoffe einen erheblichen Anteil an dem wachstumshemmenden Potential des Apfelsaftextrakts AE02 haben müssen [Kern et al., 2005].

Der Apfelsaftextrakt AE02 führte zu einer potenten Hemmung der Aktivierung des EGFRs in HT29-Zellen bei einem Zusatz von Katalase (100 U/ml). In der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml wurde die EGFR-Phosphorylierung auf etwa 30 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO gesenkt [Fridrich et al., 2007a]. In den im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen konnte diese potente Wirkung nicht mehr gemessen werden. Der Phosphorylierungsstatus des EGFRs wird nur auf etwa 75 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO gesenkt. Möglicherweise kann diese Abweichung mit der Lagerstabilität des Apfelsaftextrakts AE02, der aus dem Jahr 2002 stammt, erklärt werden. Auch die Kühlkette wurde unterbrochen, sodass einige Inhaltsstoffe während der Lagerung zerfallen sind oder miteinander reagiert haben könnten. Dies wäre eine mögliche Erklärung des hier beobachteten Verlustes der Bioaktivität.
Beim Vergleich der rekonstituierten Extrakte mit und ohne Chlorogensäure wird festgestellt, dass sich die Aktivitäten nicht signifikant unterscheiden. Nur bei den Konzentrationen von 10 und 250 µg/ml ist ein Unterschied zu erkennen, welcher möglicherweise durch den Einfluss von Chlorogensäure erklärt werden könnte. Um die Werte mit jener der Einzelsubstanz zu vergleichen, wird die Molarität der Chlorogensäure bei diesen Konzentrationen berechnet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Molarität an Chlorogensäure (µM) im rekonstituierten Extrakt (A), in den im Western Blot eingesetzten Konzentrationen (µg/ml). CGA: Chlorogensäure.

µg/ml	1	10	100	250	500
CGA [µM]	2	19	194	485	970

Bei 250 µg/ml des rekonstituierten Extrakts liegt die Molarität von Chlorogensäure (10-fach höhere Konzentration) über dem mit der Reinsubstanz getesteten Bereich (siehe 4.3.), weshalb ein direkter Vergleich schwierig ist. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml beträgt die Molarität von Chlorogensäure 19 µM. Der Phosphorylierungsstatus des EGFRs liegt bei 142,4 ± 49,1 % (im Vergleich jener des Extrakts ohne Chlorogensäure bei 106,0 ± 5,3 %) in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Dies bedeutet einen Unterschied von über 35 %. Die nächstgelegene Konzentration an Chlorogensäure (23 µM), die als Einzelsubstanz getestet wurde, führt zu einer EGFR-Aktivierung auf 172 ± 11,7 %. Der Effekt der Reinsubstanz ist etwa doppelt so groß, wie jener im rekonstituierten Extrakt, wobei die relativ große Standardabweichung bei diesem Wert im rekonstituieren Extrakt nicht unerwähnt bleiben soll. Die Aktivierung des EGFRs durch Chlorogensäure wird möglicherweise durch die anderen im Extrakt

enthaltenen Verbindungen abgeschwächt und die antagonistische Wirkung von der Chlorogensäure zumindest zum Teil aufgehoben. Der Mechanismus dieser Wirkung ist jedoch noch nicht bekannt. Es wäre möglich, dass Chlorogensäure mit den anderen Verbindungen reagiert und somit ihre Wirkung nicht ausüben kann. Um nähere Aussagen treffen zu können, müssen aber weitere mechanistische Untersuchungen folgen.
Der rekonstituierte Extrakt ohne Chlorogensäure konnte auch zu keiner potenten Hemmung der EGFR-Phosphorylierung führen, sondern liegt meist in einem ähnlichen Bereich wie jene des rekonstituierten Extrakts mit Chlorogensäure. Unter den weiteren Inhaltsstoffen des rekonstituierten Extrakts, die die EGFR-Aktivierung hemmen, sind die Procyanidine zu erwähnen. Der rekonstituierte Extrakt besteht zu 8 % aus Procyanidinen, welches einer Konzentration von 40 µg/ml in der höchsten getesteten Konzentration (500 µg/ml) entspricht. Die Procyanidine wurden in Form des procyanidinreichen Apfelsaftextrakts PAE, der 78,4 % Procyanidine mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad enthielt, zugesetzt. Dieser führte in der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der EGFR-Phosphorylierung mit einem IC_{50}-Wert von 160 ± 25 µg/ml. Die für die hier durchgeführten Messungen relevante Konzentration des PAE von 50 µg/ml hemmte die Aktivität des EGFRs auf etwa 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle und jene von 10 µg/ml hatte keinen Einfluss mehr [Dissertation Nicole Teller, 2009]. Es muss jedoch beachtet werden, dass es Zelllinienspezifitäten gibt und diese Aussage kritisch betrachtet werden sollte, aber es kann angenommen werden, dass die Procyanidine nur in der höchsten getesteten Konzentration des rekonstituierten Extrakts einen Effekt auf den EGFR ausüben werden. Die Aktivität des EGFRs wurde jedoch auch in der höchsten Konzentration nicht gesenkt und liegt bei beiden rekonstituierten Extrakten über dem Wert der Lösungsmittelkontrolle. Der Einfluss durch die Procyanidine könnte also durch andere Effekte überlagert worden sein. Möglicherweise waren einige Substanzen nicht mehr aktiv, da einige Inhaltsstoffe, wie die Procyanidine, von früheren Untersuchungen stammen und schon länger gelagert wurden.

Um die Signalweiterleitung zu untersuchen, wurde im Anschluss die Modulation des Phosphorylierungsstatus der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 mittels Western Blot unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Die Inkubation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekonstituierten Extrakts mit (A) und ohne (B) Chlorogensäure, sowie dem Apfelsaftextrakt AE02 als Kontrolle (siehe Abb. 28 und 29).

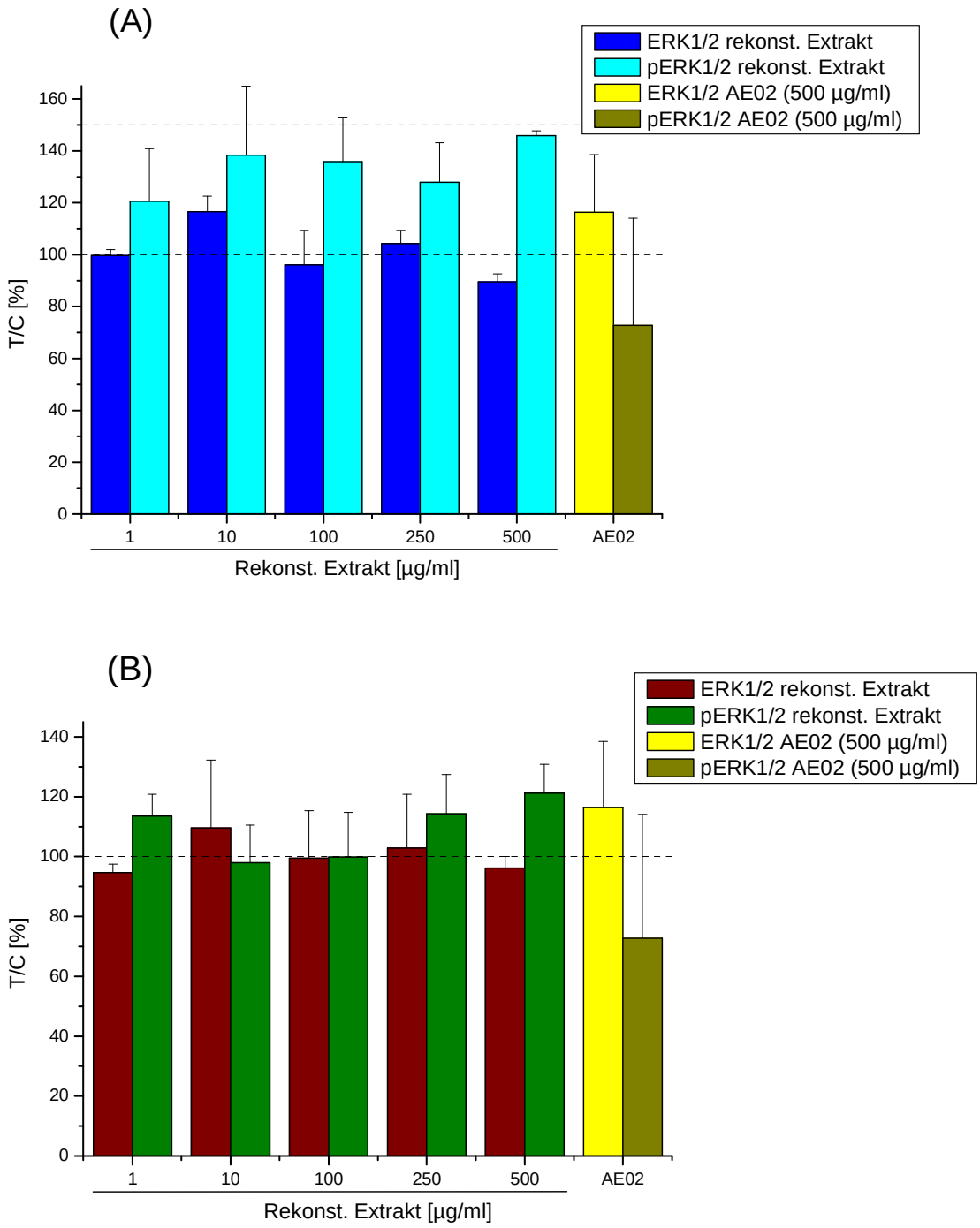


Abbildung 28 Modulation des Phosphorylierungsstatus des ERK1/2 nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29 Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch **(A)** den rekonstituierten Extrakts AE02 mit Chlorogensäure (A) und **(B)** den rekonstituierten Extrakt AE02 ohne Chlorogensäure (B) in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Als weitere Kontrolle wurde der Apfelsaftextrakt AE02 in der höchsten Konzentration (500 µg/ml) mitgeführt. MW ± SD aus fünf unabhängigen Versuchen.

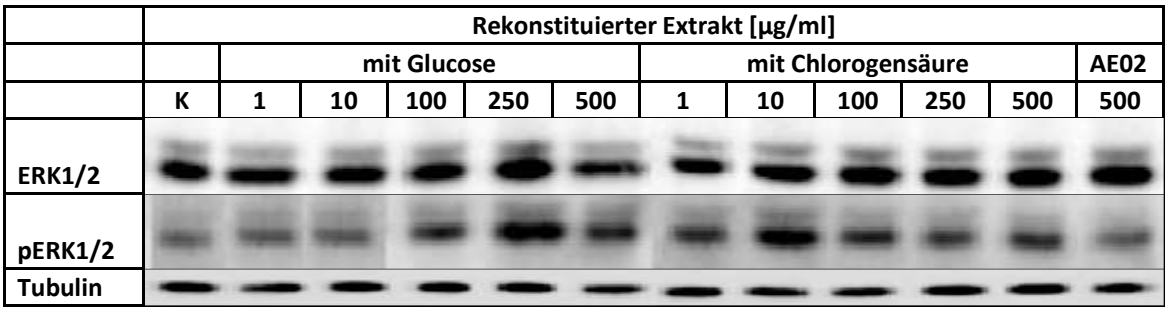


Abbildung 29 Repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen ERK1/2, pERK1/2 und Tubulin nach 45-minütiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch den rekonstituierten Extrakt mit und ohne Chlorogensäure und den Apfelsaftextrakt AE02. K: Kontrolle DMSO (1 %).

Der Gesamtproteingehalt von ERK1/2 bleibt bei der Inkubation mit den rekonstituierten Extrakten (A), (B) und dem Apfelsaftextrakt AE02 in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO annähernd konstant. Die Phosphorylierung der Signalelemente ERK1/2 steigt bei der Inkubation mit dem rekonstituierten Extrakt (A) auf 120 bis 146 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich an, während beim rekonstituierten Extrakt (B) die Phosphorylierung der Signalelemente ERK1/2 sich wenig ändert und höchstens auf 120 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in der höchsten getesteten Konzentration ansteigt. Der Apfelsaftextrakt AE02 hemmt die Aktivierung von ERK1/2 auf etwa 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wobei die Standardabweichung mit etwa 40 % über dem für den Western Blot üblichen Bereich liegt.

Beim Vergleich der rekonstituierten Extrakte mit und ohne Chlorogensäure wird erkannt, dass der Extrakt mit Chlorogensäure im Vergleich zu jenem ohne Chlorogensäure zu einem Unterschied des Phosphorylierungsstatus von 7 % (bei 1 µg/ml) bis zu über 40 % (bei 10 µg/ml) führt. Diese Aktivierung kann wahrscheinlich auf Chlorogensäure zurückgeführt werden, da Glucose keinen Einfluss auf die Aktivität des EGFRs und den MAPK-Signalweg hat und die restlichen Inhaltsstoffe in denselben Anteilen vorhanden sind. Interessanterweise kann die Aktivierung des EGFRs und der MAPK-ERK1/2 durch die Chlorogensäure bei den Untersuchungen mit den rekonstituierten Extrakten nur bei den nachgeschalteten Signalelementen ERK1/2 deutlich beobachtet werden. Normalerweise unterliegen die nachgeschalteten Signalelemente, wie ERK1/2, vielen Einflüssen, auch von anderen Signalkaskaden und –elementen, und es ist schwieriger den Effekt auf diese zu erfassen. Vielleicht deutet sich durch die Chlorogensäure ein zusätzlicher Effekt auf Elemente anderer Signalkaskaden an. Die Untersuchungen zur EGFR-Phosphorylierung zeigten nur eine Erhöhung der

Werte von zwei Konzentrationen, während hier im gesamten Konzentrationsbereich eine Steigerung der Phosphorylierung gemessen wurde.
In früheren Untersuchungen wurde der Apfelsaftextrakt AE02 auf die Modulation der Aktivität der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 nach 5 h Inkubation in HT29-Zellen untersucht. Die Versuche wurden jedoch ohne Zusatz von Katalase durchgeführt. Bereits bei einer Konzentration von 10 ng/ml wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK1 signifikant verringert. Das Phosphorylierungsminimum von ERK1/2 wurde bei 100 ng/ml AE02 erreicht, bevor der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 über das Maß der Kontrolle hinaus anstieg. Ab einer Konzentration über 100 µg/ml war der Wiederanstieg signifikant. In der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml erreichte der Phosphorylierungsstatus von ERK1 und ERK2 Werte von knapp 300 % respektive 150 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO [Kern et al., 2005]. Die Kurzzeitinkubation von 45 Minuten führte bis zu 100 µg/ml AE02 zu keiner Reduktion des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 [Dissertation Melanie Kern, 2006].
Der starke Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 durch AE02 nach 5 h in den höheren Konzentrationen könnte möglicherweise durch Chlorogensäure verursacht worden sein, wenngleich die unterschiedlichen Inkubationszeiten berücksichtigt werden sollten. Um diese Aussage zu bestätigen, müssten die rekonstituierten Extrakte (A) und (B) auch nach 5 h auf die Modulation der Aktivität von EGFR und ERK1/2 in HT29-Zellen untersucht werden. Bei der hier durchgeführten Kurzzeitinkubation wurden die höheren Konzentrationen nicht untersucht. Deshalb ist nicht bekannt, ob der Apfelsaftextrakt auch nach 45 Minuten zu einem Anstieg von phosphoryliertem ERK1/2 führt. Kritisch muss auch die Wasserstoffperoxidbildung hinterfragt werden, die auch zu den gemessenen Effekten beitragen könnte (siehe 2.6.).
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch den rekonstituierten Extrakt mit und ohne Chlorogensäure die EGFR-Aktivierung nicht signifikant beeinflusst wurde, aber dass es über den gesamten Konzentrationsbereich zu einem Anstieg der Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalelementen ERK1/2 im rekonstituierten Extrakt mit Chlorogensäure im Vergleich zu jenem ohne Chlorogensäure gekommen ist. Dieser Effekt kann möglicherweise durch Chlorogensäure bedingt sein. Die weniger potente Wirkung des rekonstituierten Extrakts auf die EGFR-Aktivität im Vergleich zum Gesamtapfelsaftextrakt kann jedoch nicht oder nur zum Teil durch Chlorogensäure erklärt werden. Vielmehr sind wahrscheinlich noch nicht identifizierte Verbindungen im Apfelsaftextrakt für die potentere Wirkung des Gesamtextraktes verantwortlich.

4.6. Einfluss von Chlorogensäure auf die Transkription ausgewählter über die MAPK-Kaskade-regulierte, wachstumsassoziierte Gene

Ein komplexer Mechanismus, der in der Aktivierung von Proteinkinasekaskaden involviert ist, läuft ab, um Signale von Wachstumsfaktorrezeptoren, wie dem EGFR, an Gene weiterzuleiten, die durch Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, reguliert werden (siehe 2.4.1.) [Karin und Hunter, 1995].

Chlorogensäure führte in vorherigen Untersuchungen dieser Arbeit zu einer starken Aktivierung des EGFRs und auch die Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 wurden nach einer 45-minütigen Inkubation von HT29-Kolonkrebszellen stimuliert (siehe 4.3.). Um zu überprüfen, ob diese Aktivierung auch über den Transkriptionsfaktor Elk-1 weitergeleitet wird, soll die Transkription ausgewählter über die MAPK-Kaskade-regulierte Gene, die mit dem Zellwachstum assoziiert werden, untersucht werden. Dafür wurden die Gene, die die Transkription der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor, sowie der Liganden EGF und VEGFa (Vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor a) regulieren, ausgewählt. Zusätzlich sollte auch die Transkription des Onkogens c-fos und des Zellzyklusregulators Cyclin D1 untersucht werden. Diese Elemente, mit der Ausnahme von VEGFa, haben einen Einfluss auf das Zellwachstum. VEGFa wird mit der Angiogenese (der Bildung neuer Blutgefäße) in Verbindung gebracht, seine Expression wird jedoch ebenso über die ErbB-Rezeptoren reguliert [Petit et al., 1997; O-charoenrat et al., 2000].

Mittels quantitativer RealTime PCR wurde die Transkription der Gene von Cyclin D1, c-fos, EGF, EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor nach 3 h Inkubation in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) untersucht (siehe Abb. 30 und 31). Die Inkubation erfolgt mit unterschiedlichen an den Western Blot angepassten Konzentrationen an Chlorogensäure in serumfreien Medium in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Endkonzentration 1 %). Die Ergebnisse werden auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert, dessen Transkription durch die Inkubation nicht beeinflusst wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass es unter den gewählten Bedingungen durch die 3 h Inkubation mit Chlorogensäure zu keiner signifikanten Beeinflussung der Transkriptmenge der untersuchten Gene gekommen ist (Abb. 30 und 31).

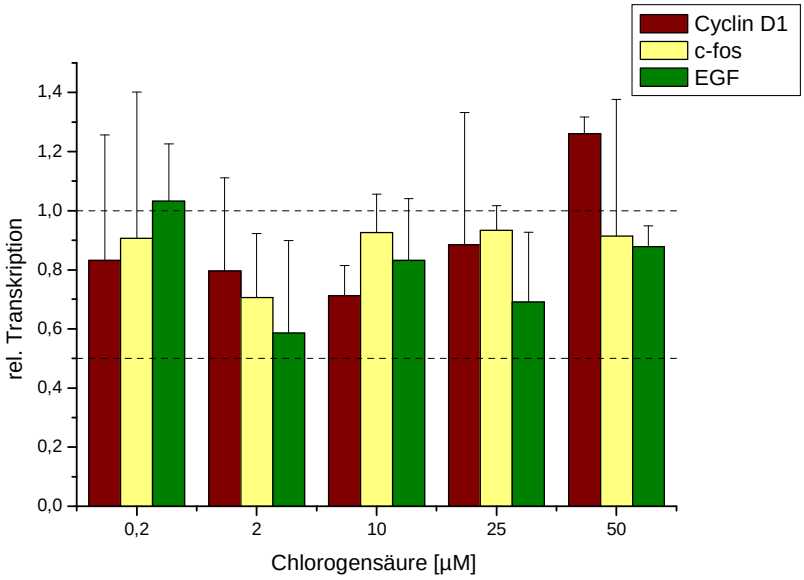


Abbildung 30 Modulation der relativen Transkription von Cyclin D1, c-fos und EGF nach 3 h serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus vier unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

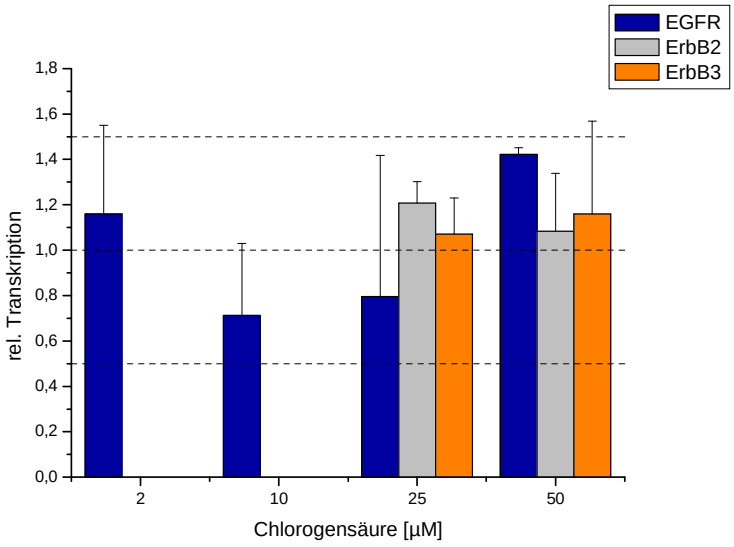


Abbildung 31 Modulation der relativen Transkription von EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor nach 3 h serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

Die Inkubationszeit von 3 h könnte zu kurz gewesen sein, um einen Effekt auf Transkriptionsebene zu erkennen. Deshalb wird die Inkubationszeit verlängert und der Versuch wiederholt.

Mittels quantitativer RealTime PCR wurde die Transkription der Gene von Cyclin D1, c-fos, EGF, EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) untersucht (siehe Abb. 32 und 33). Jedoch wird auch nach einer Inkubation von 24 h die Transkription der untersuchten Gene nicht signifikant beeinflusst (Abb. 32 und 33).

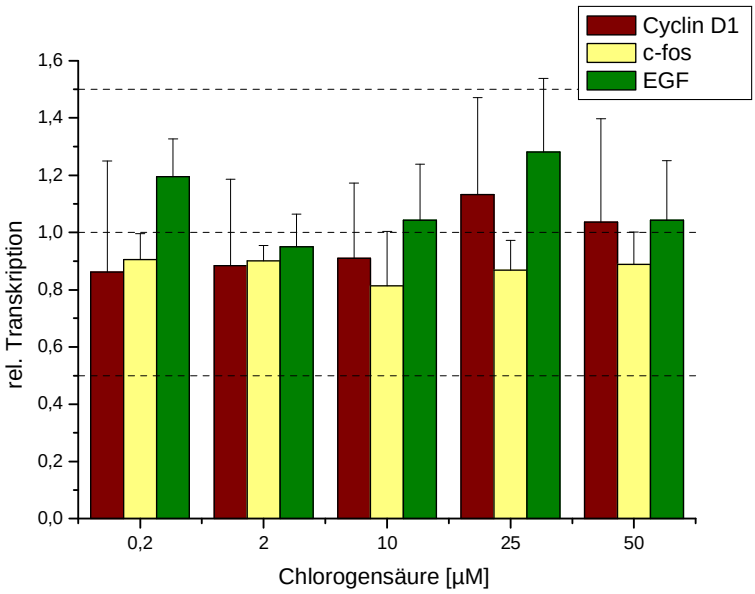


Abbildung 32 Modulation der relativen Transkription von Cyclin D1, c-fos und EGF nach 24 h Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

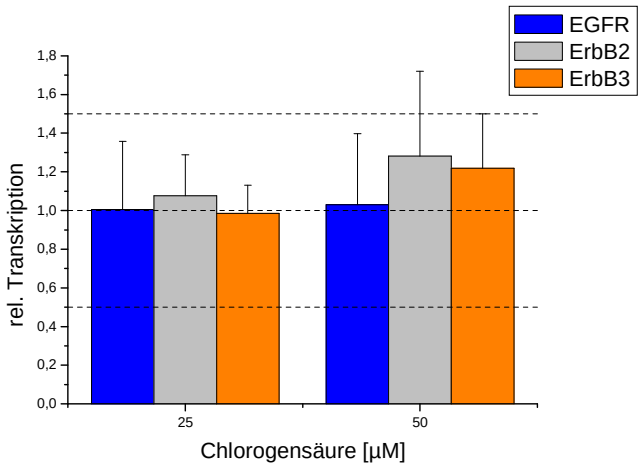


Abbildung 33 Modulation der relativen Transkription von EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor nach 24 h Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

Möglicherweise wurde auch hier nicht das richtige Zeitfenster gewählt. Daher wurde noch ein weiterer Versuch mit einer Inkubationszeit zwischen den bereits getesteten Zeiten unternommen.
Mittels quantitativer RealTime PCR wurde die Transkription der Gene von Cyclin D1, c-fos, EGF, VEGFa, EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor nach 6 h Inkubation in HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) untersucht (siehe Abb. 36-38).

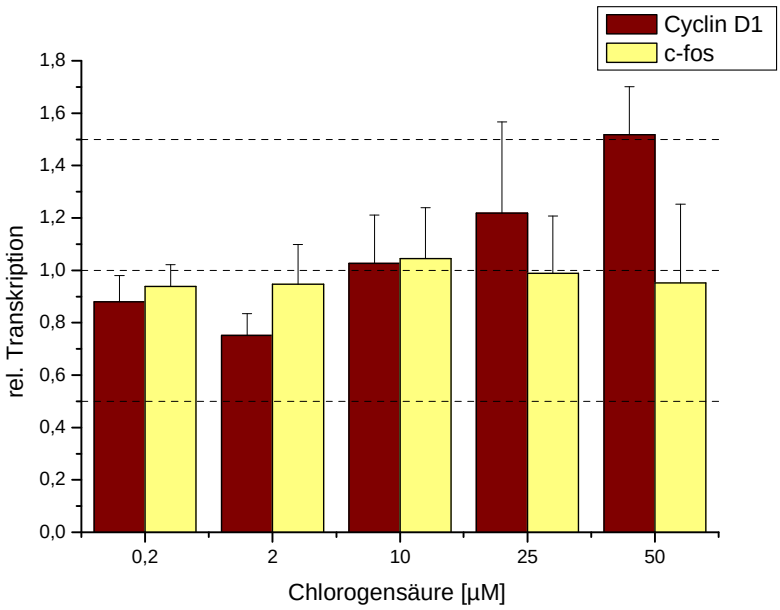


Abbildung 34 Modulation der relativen Transkription von Cyclin D1 und c-fos nach 6 h serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

Während die Transkription des Onkogens c-fos nach 6 h nicht beeinflusst wird, steigt die Transkriptmenge von Cyclin D1 konzentrationsabhängig an. Es kommt zu einer Erhöhung der relativen Transkription von Cyclin D1 auf 1,5 ± 0,2 bei 50 µM Chlorogensäure.

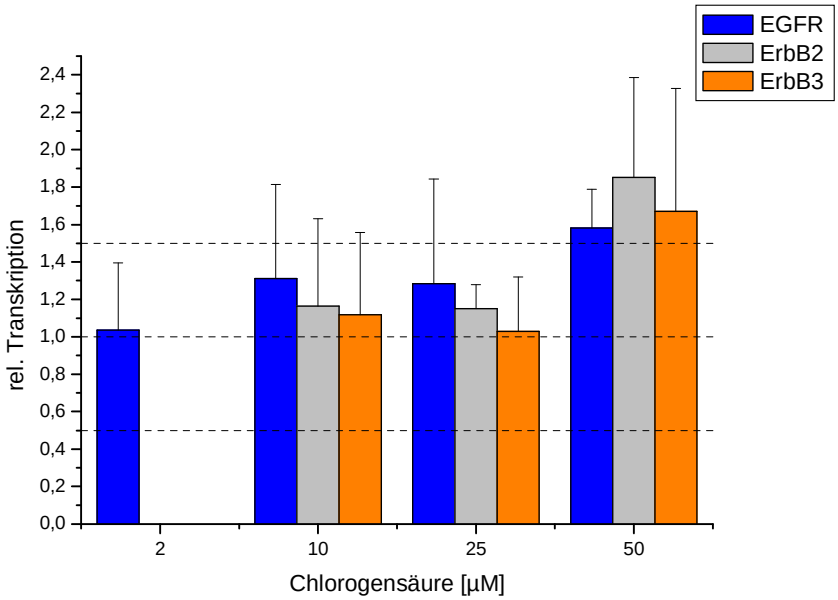


Abbildung 35 Modulation der relativen Transkription von EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor nach 6 h serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

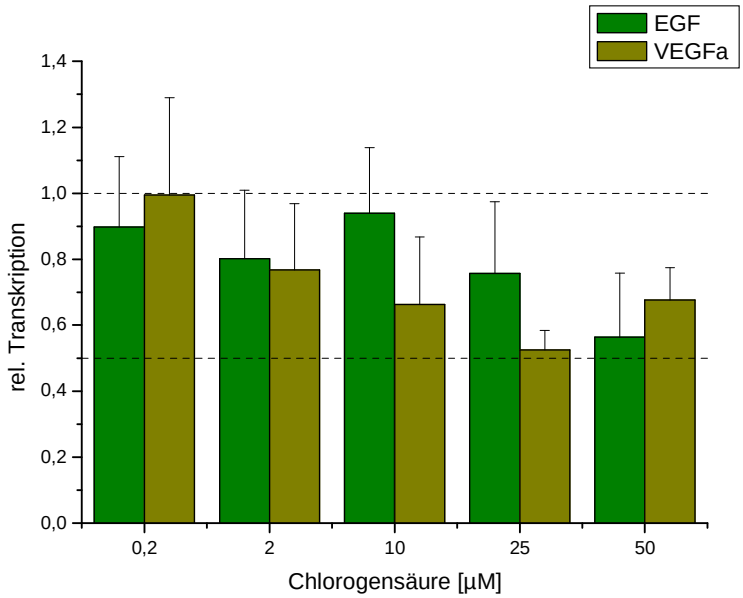


Abbildung 36 Modulation der relativen Transkription von EGF und VEGFa nach 6 h serumfreier Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durch Chlorogensäure in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. Es wurde auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ normalisiert.

Auch die Transkriptmenge der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor wird bei 50 µM Chlorogensäure erhöht. Dabei kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der mRNA-Transkripte des EGFRs, die bei 50 µM Chlorogensäure auf 1,6 ± 0,2 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO ansteigt. Die relative Transkription des ErbB2- und ErbB3-Rezeptors beträgt bei 50 µM Chlorogensäure 1,9 ± 0,5 respektive 1,7 ± 0,7.
Im Gegensatz zu den ErbB-Rezeptoren wird die Transkriptmenge der Liganden EGF und VEGFa vermindert. Dabei wird das mRNA-Transkript von EGF konzentrationsabhängig bis auf 0,6 ± 0,2 durch 50 µM Chlorogensäure verringert. Die relative Transkription von VEGFa erreicht bei 25 µM Chlorogensäure ihren niedrigsten Wert von 0,5 ± 0,1 und steigt bei 50 µM Chlorogensäure wieder etwas auf 0,7 ± 0,1 an.
Nach einer Inkubation von 6 h konnte die Chlorogensäure die Transkription der untersuchten Gene beeinflussen, während 3 h und 24 h zu keiner Veränderung führten.
Es kann festgestellt werden, dass es nach 6 h zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Transkription der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptoren durch Chlorogensäure gekommen ist, die in einem ähnlichen Bereich liegt. Im Gegensatz dazu wird aber die Transkription der Liganden EGF, der zur Aktivierung des EGFRs führt, und VEGFa, der für die Angiogenese und somit die Aktivierung der VEGFR von Bedeutung ist, vermindert.
Angiogenese ist der Prozess der Blutgefäßneubildung und spielt eine wichtige Rolle im Wachstum, der Progression und Metastasierung von Tumoren [Augustin, 2003; Makrilia et al., 2009]. Die Angiogenese ist wichtig, um Sauerstoff und Nährstoffe bereit zu stellen und auch um Abfallprodukte über das intrinsische vaskuläre Netzwerk zu entfernen [Tonini et al., 2003; Shimizu und Oku, 2004; Brahimi-Horn et al., 2007; Makrilia et al., 2009]. VEGFs gehören zur Blutplättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor- (PDGF)/VEGF-Superfamilie und haben eine Bedeutung im Prozess der endothelialen Differenzierung und Angiogenese [Augustin, 2003; Lohela et al., 2009]. Die VEGF-Liganden binden mit verschiedenen Spezifitäten an die drei häufigsten VEGFRs: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 [Tonini et al., 2003; Lohela et al., 2009]. Die biologischen Effekte von VEGFa werden durch Interaktion mit den Zelloberflächenrezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 ausgeübt [Lohela et al., 2009; Makrilia et al., 2009]. Die verringerte mRNA-Menge an VEGFa könnte, falls diese auf Proteinebene zum Tragen kommt, zu einer verringerten Aktivierung von VEGFR1 und VEGFR2 in den Tumorzellen führen und somit eventuell die Angiogenese hemmen, welches ein mögliches chemopräventives Potential der Chlorogensäure darstellen könnte.

Die Erhöhung der Transkription der Gene der ErbB-Rezeptoren sowie von Cyclin D1 wird möglicherweise durch die Aktivierung des EGFRs und des MAPK-Signalweges durch Chlorogensäure verursacht. Das aktivierte Signal könnte weitergeleitet werden, so zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen, die die Expression von Genen regulieren, und eventuell die Transkription von einigen über die MAPK-Kakade-regulierten Genen erhöhen.
Eine Überexpression von Wachstumsrezeptoren nimmt eine bedeutende Rolle in der Malignität vieler menschlicher Tumore ein. Die Erhöhung der Anzahl an Wachstumsfaktorrezeptoren, die noch auf Proteinebene untersucht werden sollte, könnte so zu einer Erhöhung der Aktivität der Rezeptoren führen, welches in einem erhöhten Wachstum der Tumorzellen resultieren könnte. Ein Wachstumsstimulus durch Chlorogensäure beziehungsweise ausgewählte chlorogensäurereiche Extrakte ist aber, im Sinne einer chemopräventiven Wirkung als unerwünscht anzusehen.
Ein weiteres Element, das die Proliferation der Zellen beeinflusst, ist der Zellzyklusregulator Cyclin D1. Cyclin D1 ist ein allosterischer Aktivator der G1-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 [Balmanno und Cook, 1999; Carlson et al., 1999; Kim und Diehl, 2009]. Die MAPK-Familienmitglieder, wie ERK1/2, sind in der Regulation der Transkription von Cyclin D1 involviert [Carlson et al., 1999; Kobayashi et al., 2006; Kim und Diehl, 2009]. Hemmt eine Verbindung die Expression von Cyclin D1, so kommt es zum Zellzyklusarrest und das Zellwachstum wird gehemmt [Chen et al., 2004]. Studien haben aber gezeigt, dass eine moderate durchgehende Aktivierung von MAPK (beispielsweise ERK1/2) zur Expression von Cyclin D1 und zum Zellzykluswiedereintritt führt [Balmanno und Cook, 1999]. Die Beeinflussung von Cyclin D1, wie auch die Phosphorylierung des EGFRs und seiner nachgeschalteten Signalelemente wird vielfach mit den Resultaten aus Wachstumsassays korreliert [Kobayashi et al., 2006]. Bei den Untersuchungen dieser Arbeit trifft dies auch zu, da Chlorogensäure zu einer erhöhten Phosphorylierung des EGFRs und von ERK1/2 (siehe 4.3.), sowie zur Steigerung der Expression von Cyclin D1 führt, welches mit einem leichten Wachstumsstimulus nach 72 h verknüpft werden kann (siehe 4.1.). Die Expression von Cyclin D1 führt zum Zellzykluswiedereintritt und es wird eine neuer Zellzyklus gestartet, wodurch das Zellwachstum möglicherweise gesteigert wird. Ein erhöhtes Wachstum von Tumorzellen durch Chlorogensäure beziehungsweise ausgewählte chlorogensäurereiche Extrakte ist jedoch, im Sinne einer chemopräventiven Wirkung, als unerwünscht anzusehen.
Abweichend von der Transkriptionserhöhung der Gene der ErbB-Rezeptoren, ist aber die Verminderung der mRNA-Transkripte der Liganden EGF und VEGFa zu

beobachten. Da die Regulierung ebenfalls über den Transkriptionsregulator Elk-1 und somit über die MAPK-Kaskade abläuft, ist dies nicht zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es innerhalb der Zelle einen internen Kontrollmechanismus geben könnte. Um das Zellwachstum zu kontrollieren, wird bei der Erhöhung der Transkription der Rezeptoren möglicherweise jene der Liganden gehemmt. Dies könnte mittels negativer Rückkopplung geregelt sein.
In einem weiteren Versuch sollte abgeklärt werden, ob die erhöhte Transkription der Gene von EGFR, ErbB2-, ErbB3-Rezeptor und Cyclin D1 auch auf Proteinebene zu beobachten ist. Dieses könnte mittels Western Blot durchgeführt werden.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Chlorogensäure zu keiner Veränderung der Transkription der über die MAPK-Kaskade-regulierten Gene von Cyclin D1, c-fos, EGFR, ErbB2-, ErbB3-Rezeptor und EGF nach 3 h und nach 24 h geführt hat, während nach 6 h die mRNA-Transkripte der ErbB-Rezeptoren und von Cyclin D1 erhöht und jene der Liganden EGF und VEGFa verringert waren, während die Expression von c-fos zu keinem untersuchten Zeitpunkt beeinflusst wurde. Die Erhöhung der relativen Transkription der Rezeptoren und die Hemmung jener der Liganden könnten auf einen internen Kontrollmechanismus der Zelle hindeuten.

4.7. Gesamtdiskussion

Tumorerkrankungen werden oft mit einer Fehlregulierung zellulärer Signaltransduktionskaskaden verknüpft. Ein wichtiges Element dabei sind die RTKs, die deshalb häufig Ziele der Tumortherapie sind [Olayioye et al., 2000]. Apfel- und Beerenextrakte, sowie charakteristische Verbindungen daraus, zeigten bereits in verschiedenen Studien ein chemopräventives Potential und konnten als Breitbandhemmstoffe eines Spektrums verschiedener RTKs charakterisiert werden [Meiers et al., 2001; Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007a; Fridrich et al., 2007b; Teller et al., 2009a; Teller et al., 2009b].

Im Fokus der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene polyphenolreiche Extrakte, sowie die ausgewählte Leitsubstanz Chlorogensäure auf die Beeinflussung des Zellwachstums und damit assoziierte Signalkaskaden untersucht werden.

Polyphenole können mit noch unidentifizierten Bestandteilen des Zellkulturmediums hohe Mengen an Wasserstoffperoxid generieren, welches das Zellwachstum und andere Signalelemente modulieren kann und so zu artifiziellen Effekten führen kann [Lapidot et al., 2002; Hou et al., 2005; Fridrich et al., 2007b]. Deshalb wurden alle Versuche in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um die Wasserstoffperoxidakkumulation effektiv zu unterdrücken.

Ein Heidelbeerextrakt (HBE) wurde mittels SRB-Test auf seine wachstumshemmenden Eigenschaften untersucht. Die Zellproliferation wurde konzentrations- und zeitabhängig gehemmt und es wurde ein IC_{50}-Wert von 380 µg/ml nach einer Inkubation von 72 h berechnet. Auch andere Gruppen berichten von einer wachstumshemmenden Wirkung von anthocyanreichen Beerenextrakten in verschiedenen humanen Tumorzelllinien [Ferguson et al., 2004; Olsson et al., 2004; Zhang et al., 2004; Seeram et al., 2006; McDougall et al., 2008; Faria et al., 2010]. Es muss allerdings beachtet werden, dass diese Versuche meist ohne Zusatz von Katalase durchgeführt wurden. Die antiproliferativen Effekte gehen aber nicht nur auf die Anthocyane zurück, sondern können auch weiteren sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie den Flavonolen und ihren Glykosiden, sowie den Procyanidinen, zugesprochen werden, beziehungsweise diese leisten einen Beitrag zur Gesamtwirkung. Diese Annahme wird durch die Versuche von Yi et al. (2005) bestätigt, die einen Heidelbeerextrakt in verschiedene Fraktionen auftrennten und auf ihre Wachstumshemmung untersuchten. Sie stellten fest, dass die Anthocyanfraktion die potenteste Wachstumshemmung vermittelte, aber auch die Flavonol- und die Procyanidinfraktion das Wachstum von HT29-Zellen hemmten, während die phenolische Säurefraktion geringe Bioaktivität zeigte. Weiters könnten

möglicherweise auch synergistische und antagonistische Effekte auftreten, die die Effekte der Einzelverbindungen in der Mischung verstärken oder abschwächen.
Als eine Leitverbindung des HBE wird die Chlorogensäure im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer untersucht. Sie zeigte keine wachstumshemmenden Eigenschaften, sondern führte zu einem leichten Wachstumsstimulus ab einer Konzentration von 23 µM nach einer Inkubationszeit von 72 h. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden höhere Konzentrationen jedoch ohne Zusatz von Katalase untersucht. Dabei wurde ein IC_{50}-Wert von über 200 µM erhalten, wobei ein leichter Wachstumsstimulus bei 100 µM erkannt werden könnte [Dissertation Melanie Kern, 2006]. Die hier vorgelegten Ergebnisse werden von den meisten Autoren bestätigt, die keine oder erst bei höheren Konzentrationen (meist über 500 µM) eine Wachstumshemmung durch Chlorogensäure beobachteten [Zheng et al., 2002; Iwai et al., 2004; Jin et al., 2005; Granado-Serrano et al., 2007; Kutara et al., 2007]. Nur Feng et al. (2005) zeigten nach einer Inkubationszeit von 72 h bei einer Konzentration von 80 µM Chlorogensäure eine signifikante Hemmung des Zellwachstum in der humanen Lungenkrebszelllinie A 459. Die hier getestete Konzentration liegt aber über den in dieser Arbeit getesteten Konzentrationsbereich (0,23 – 46 µM). Außerdem wurden die meisten Versuche ohne Zusatz von Katalase durchgeführt, wobei das gebildete Wasserstoffperoxid möglicherweise Effekte auf die Zellproliferation ausüben kann und diese eventuell nicht der Chlorogensäure zugeschrieben werden können (siehe 2.6.) [Long et al., 2000; Lapidot et al., 2002].
Die Aktivierung des EGFRs und die Weiterleitung des Signals über den MAPK-Signalweg spielt in der Regulation des Zellwachstums eine wichtige Rolle [Marais et al., 1996; Lewis et al., 1998; Meiers et al., 2001; Depeint et al., 2002]. Der HBE führte zu einer potenten Hemmung sowohl des Zellwachstums (siehe 4.1.1), als auch der Phosphorylierung des EGFRs [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko]. Um die Verbindungsklassen aufzuklären, die für die potente Hemmung der EGFR-Aktivität verantwortlich sind, wurde der HBE an der Technischen Universität Braunschweig fraktioniert (siehe 2.5.3.). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Fraktionen mittels Western Blot Analyse untersucht. Die aufgereinigte Polymerfraktion, die vor allem oligomere Procyanidine enthält, konnte die Aktivität des EGFRs in der höchsten getesteten Konzentration von 34,6 µg/ml auf ca. 70 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle senken, ohne den endogenen Status des Rezeptors zu beeinflussen. Weitere Untersuchungen mit Procyanidinen oder procyanidinreichen Extrakten bestätigen die Hemmwirkung von Procyaniden auf die Phosphorylierung des EGFRs [Fridrich et al., 2007b; Dissertation Nicole Teller, 2009]. Im Gegensatz dazu führte die Chlorogensäurefraktion zu einer Aktivierung

des EGFRs auf über 170 % (bei einer Konzentration von 23 µM). Der endogene Status wurde in den niedrigeren Konzentrationen leicht verringert. Eine Zytotoxizität wurde jedoch mittels Trypanblautest ausgeschlossen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, da zur Beeinflussung der Aktivität des EGFRs durch Chlorogensäure keine Literaturdaten eruiert werden konnten, wurde der Western Blot mit der Reinsubstanz durchgeführt. Die isolierte Chlorogensäure führte ebenso zu einer potenten Aktivierung des EGFRs auf 172 % in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle bei einer Konzentration von 23 µM, die in einem ähnlichen Bereich, wie jene der Chlorogensäurefraktion, liegt.

Es gibt daher mehrere Ansätze, um die Aktivierung des EGFRs durch Chlorogensäure zu erklären.

Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung der Freisetzung der EGFR-Liganden, wie z.B. EGF, durch Chlorogensäure (siehe 2.3.2.). In Western Blot Analysen ohne die Aktivierung des EGFRs durch den Wachstumsfaktor EGF ist kein Unterschied zwischen der Kontrolle DMSO und der Chlorogensäure (46 µM) zu erkennen. Da eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu einer erhöhten Konzentration an EGF führt, könnten mehr Rezeptoren aktiviert werden. Ein Einfluss der Chlorogensäure kann durch die Messungen nicht ausgeschlossen werden, aber dieser Erklärungsmöglichkeit kann den hohen Grad an Aktivierung nicht erklären.

Die Aktivierung eines Rezeptors kann durch zwei Mechanismen wieder herunter reguliert werden [Stuible et al., 2010]. Dieses sind die Endozytose und die Dephosphorylierung des Rezeptors durch PTPs. Der Einfluss von Chlorogensäure auf das Recycling ist unwahrscheinlich, da es bei der Unterdrückung des Recyclings der Rezeptoren durch Chlorogensäure zu einem Anstieg des Gesamtproteingehalts an EGFR kommen sollte. In den hier durchgeführten Untersuchungen blieb der endogene Status aber unbeeinflusst. Die andere Möglichkeit ist ein Einfluss auf die PTPs, die den aktivierten EGFR dephosphorylieren. Chlorogensäure könnte zu einer Hemmung der PTP-Aktivität führen, wodurch der EGFR in seinem phosphorylierten Status verbleiben würde, was sich möglicherweise als Anstieg im Vergleich zur Kontrolle wiederspiegeln würde. Eine wichtige PTP, die den EGFR als Substrat hat und in HT29-Zellen exprimiert wird, ist die PTP1B [Östman und Böhmer, 2001; Tal et al., 2006; Zhu et al., 2007; Yuan et al., 2010]. Muthusamy et al. (2010) konnten die konzentrationsabhängige Hemmung der PTP1B-Aktivität durch Chlorogensäure (von 1 pg bis 10 mg) im zellfreien System nachweisen. Es wurde ein IC_{50}-Wert von 3,12 µg angegeben. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dirsch wurden die Chlorogensäure und die Chlorogensäurefraktion auf die Hemmung der PTP1B-Aktivität im zellfreien System untersucht, wobei in den getesteten

Konzentrationen von 10 bis 200 µM Chlorogensäure keine Hemmung der PTP1B-Aktivität im Gegensatz zu den Ergebnissen von Muthusamy et al. gemessen wurde. Auf Grund dieser Messungen kann die Aktivierung des EGFRs durch die Inhibierung der PTP1B-Aktivität höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden.
Eine weitere Erklärung könnte eine gesteigerte Transphosphorylierung durch Kinasen, wie Src oder Jak-2, sein, jedoch auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, PKC, intrazelluläres Calcium und cAMP können einen Einfluss haben [Bassa et al., 2007]. Zum Beeinflussung von Chlorogensäure auf die erwähnten Elemente gibt es noch keine Literaturdaten, die diese These bestätigen oder widerlegen.
Es kann festgestellt werden, dass die Chlorogensäure zu einer starken Aktivierung des EGFRs führt, jedoch noch weitere Untersuchungen des Signalweges folgen müssen, um den Mechanismus aufzuklären.
Nach der Untersuchung der Einzelsubstanz Chlorogensäure erfolgte eine weitere, um den möglichen Einfluss von anderen Verbindungen beziehungsweise Verbindungsklassen auf die Wirkung der Chlorogensäure auf den EGFR zu bestimmen. Zu diesem Zweck wird eine Coinkubation der aufgereinigten Polymerfraktion, die selbst die EGFR-Aktivität hemmte, und der Chlorogensäure durchgeführt. Die aufgereinigte Polymerfraktion, die hauptsächlich oligomere Procyanidine enthält, wird dazu mit Chlorogensäure versetzt. Die Phosphorylierungsaktivität des EGFRs wird durch das Coinkubat wenig beeinflusst, während die Kontrollen Chlorogensäure und aufgereinigte Polymerfraktion zu einer Erhöhung beziehungsweise einer Hemmung der EGFR-Aktivität führen (siehe Abb. 25). Der endogene Status wird dabei nicht verändert. Das Ergebnis der Untersuchung verdeutlicht, dass die Chlorogensäure und die oligomeren Procyanidine wahrscheinlich antagonistisch aufeinander wirken und ihre Effekte gegenseitig aufheben.
Daran angelehnt, wurde mit dem rekonstituierten Apfelsaftextrakt AE02 ein angepasster Versuch durchgeführt, wobei ein Extrakt mit Chlorogensäure und einer mit Glucose anstatt Chlorogensäure hergestellt wurde, um den Einfluss auf den EGFR und die nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 der Chlorogensäure in komplexen Mischungen zu untersuchen. In früheren Untersuchungen des Arbeitskreises zeigte der Apfelsaftextrakt AE02 potente Effekte auf das Zellwachstum und die Hemmung verschiedener RTKs, während die wachstumshemmende Wirkung des rekonstituierten Extrakts AE02, der reich an Chlorogensäure war, wesentlich geringer war [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007a]. Beim Vergleich der rekonstituierten Extrakte mit und ohne Chlorogensäure wird festgestellt, dass sich die Modulation der EGFR-Aktivitäten nicht erheblich unterscheiden und nur in ausgewählten Konzentrationen des Extrakts mit

Chlorogensäure etwas erhöht sind. Möglicherweise könnten einige Verbindungen nicht mehr aktiv gewesen sein, da sie von früheren Untersuchungen stammen und nicht lagerstabil waren. Es könnte zu einem Verlust der bioaktiven Wirkung gekommen sein. Die Vermutung, dass die weniger potente Wirkung des rekonstituierten Extrakts auf die darin enthaltenen hohen Chlorogensäuregehalte zurückzuführen ist, kann damit nicht bestätigt werden und es liegt die Vermutung nahe, dass wahrscheinlich noch nicht identifizierte Verbindungen im Apfelsaftextrakt für die potenten Effekte verantwortlich sind. Die Aktivierung des EGFRs durch Chlorogensäure wird möglicherweise durch andere im Extrakt enthaltene EGFR-hemmende Verbindungen (z.B. Quercetinglykoside) abgeschwächt und die antagonistische Wirkung von Chlorogensäure zumindest zum Teil aufgehoben. Über welchen Mechanismus dies abläuft, ist noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit stellt die Bindung weiterer Verbindungen an die Chlorogensäure oder eine Reaktion mit der Chlorogensäure dar, so dass diese ihre Aktivität nicht mehr ausüben kann. Um dies zu bestätigen, müssten noch weitere mechanistische Untersuchungen folgen.

Weiters wurde die Weiterleitung des Signals über die MAPK-Signalkaskade, die Zellwachstum und Differenzierung reguliert, untersucht. Der Einfluss auf die Modulation der Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mittels Western Blot Analyse durchgeführt. Die Chlorogensäure führte zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von ERK1/2 in ausgewählten Konzentrationen, wobei auch der endogene Status erhöht wurde. Die Erhöhung des endogenen Status kann nicht auf unterschiedliche Gesamtproteingehalte zurückgeführt werden, da Tubulin als Beladungskontrolle mitgeführt wurde und konstant blieb. Eine Beeinflussung der Transkription ist bei dieser kurzen Inkubationszeit ebenso unwahrscheinlich. Es kann aber gefolgert werden, dass die Weiterleitung des aktivierten Signals von EGFR durch Chlorogensäure über die MAPK-Kaskade erfolgt, jedoch etwas abgeschwächt wird.

Die Modulation der Signalelemente ERK1/2 durch den rekonstituierten Apfelsaftextrakt wurde auch getestet. Bei diesen Untersuchungen führte der rekonstituierte Extrakt mit Chlorogensäure in allen getesteten Konzentrationen zu einer deutlichen Erhöhung des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2, während im Vergleich dazu der rekonstituierte Extrakt ohne Chlorogensäure keinen Einfluss auf die Aktivität von ERK1/2 hatte. Der endogene Status wird durch die Inkubation mit den rekonstituierten Extrakten nicht beeinflusst. Der beobachtete Unterschied zwischen den beiden Extrakten kann wahrscheinlich auf Chlorogensäure zurückgeführt werden, da Glucose keinen Einfluss auf die EGFR-Aktivität und die nachgeschalteten Signalkaskaden hat und die restlichen Inhaltsstoffe in beiden Extrakten in äquimolaren Anteilen vorliegen. Die Aktivierung der nachgeschalteten

Signalelementen ERK1/2 durch Chlorogensäure im rekonstituierten Extrakt ist im Vergleich zu jener des EGFRs wesentlich stärker zu beobachten. Normalerweise unterliegen die nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 vielen Einflüssen, auch andere Signalkaskaden und –elementen können einen Einfluss nehmen, und es ist schwieriger den Effekt auf diese zu messen. Dies könnte aber auch eine Erklärung für die beobachteten Effekte sein. Chlorogensäure könnte nicht nur den EGFR selbst, sondern auch nachgeschaltete Signalelemente und andere Signalkaskaden beeinflussen und so zu dem beobachteten Unterschied beitragen.
Dies deutet darauf hin, dass die Chlorogensäure sowohl als Einzelsubstanz als auch innerhalb komplexer Extrakte zu einer Aktivierung des EGFRs und der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 führt.
Im Weiteren wurde die Weiterleitung des Signals über den Transkriptionsfaktor Elk-1 auf Transkriptionsebene untersucht. Mittels RealTime PCR wurden ausgewählte, über die MAPK-Kaskade-regulierte Gene, die mit dem Zellwachstum assoziiert werden, untersucht. Chlorogensäure konnte die Transkription der Gene von EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor, EGF, sowie des Onkogens c-fos und des Zellzyklusregulators Cyclin D1 nach einer Inkubation von 3 und 24 h nicht signifikant verändern. Jedoch nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde die Transkriptionsmenge durch Chlorogensäure entscheidend beeinflusst. Die Erhöhung der mRNA-Menge der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2- und ErbB3, sowie jene von Cyclin D1 durch 50 µM Chlorogensäure könnte vielleicht durch die Aktivierung des EGFRs und des MAPK-Signalweges erklärt werden. Die mRNA-Menge von c-fos wird dabei nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wird jedoch die Transkription der Liganden EGF und VEGFa, der für die Angiogenese wichtig ist, verringert. Da diese auch über den Transkriptionsfaktor Elk-1 und somit über die MAPK-Kaskade abläuft, muss es noch einen anderen Einfluss geben. Eine mögliche Erklärung könnte ein interner Kontrollmechanismus innerhalb der Zelle sein. Um das Zellwachstum zu kontrollieren, wird bei einer Erhöhung der Transkription der Rezeptoren eventuell die der Liganden gehemmt. Dies könnte möglicherweise über eine negative Rückkopplung erfolgen. Daher sollte geklärt werden, ob die erhöhte Transkription der Gene der ErbB-Rezeptoren und von Cyclin D1 auch auf Proteinebene zu beobachten ist. Eine solche Erhöhung der Gesamtproteinmenge wäre im Sinne einer wachstumshemmenden und damit möglicherweise chemopräventiven Wirkung unerwünscht.
Chlorogensäure scheint daher differenzierte Effekte auf über die MAPK-Kaskade-regulierte Gene auszuüben, was im Weiteren noch genauer untersucht werden sollte.

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse bestärken die weniger starke Wachstumsstimulierung von Chlorogensäure in HT29-Zellen im Vergleich zu jener, die nach der potenten Aktivierung des EGFRs erwartet werden konnte. Cyclin D1 führt zum Zellzykluswidereintritt [Balmanno und Cook, 1999] und somit zu einem gesteigerten Wachstum der Zellen. Weiters wichtig für das Zellwachstum ist die Menge an Wachstumsfaktorrezeptoren, die durch die Chlorogensäureinkubation zumindest auf Transkriptionsebene bei Betrachtung des richtigen Zeitfensters erhöht wird. Ein interner Zellkontrollmechanismus erniedrigt jedoch die mRNA-Transkripte der Liganden, sodass den wachstumsstimulierenden Effekten entgegengewirkt wird beziehungsweise diese nicht zur Tragen kommen.
Zur Abschätzung einer möglichen Wirkung *in vivo*, muss die Bioverfügbarkeit berücksichtigt werden, d.h. das Polyphenol muss nach der oralen Aufnahme in einer ausreichend hohen Konzentration am Wirkort vorliegen. In den Untersuchungen der vorgelegten Arbeit ist vor allem die Konzentration im Kolon von Bedeutung, da die Untersuchungen in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt wurden. Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an Chlorogensäure sind beispielsweise Apfelsaft, Beerenfrüchte und Kaffee.
Frische Apfelsäfte aus Mostäpfeln können bis zu 970 µg/ml Polyphenole beinhalten. Hydroxyzimtsäuren, mit Chlorogensäure als dominierende Verbindungen, können Gehalte in einem Bereich von 57 bis 68 µg/l sowie von 134 bis 593 µg/l in Apfelsäften, die aus Klar- beziehungsweise Mostäpfeln hergestellt wurden, erreichen [Kahle et al., 2005a]. Kahle et al. (2005b) konnten an Ileostomapatienten nachweisen, dass 0-33 % der verabreichten polyphenolischen Substanzen eines Apfelsafts den Darm erreichen. Die verabreichte Chlorogensäure (112,8 ± 3,5 mg/l) wurde stark metabolisiert, wobei eine Wiederfindung von 10,2 ± 2,5 % gemessen wurde. Dieses entspricht einer Konzentration von etwa 10 mg/l Chlorogensäure, die den Darm unverändert erreicht. Des Weiteren wurde bei der Verabreichung von 1 l eines Apfelsafts mit 318,4 µM Chlorogensäure bestimmt, dass 33,23 µM den Darm erreichen würden [Kahle et al., 2006]. Eine andere sehr wichtige Quelle für Chlorogensäure ist der Kaffee. Ein Liter Kaffee enthält 500-800 mg Chlorogensäure [Clifford, 1999b]. Stalmach et al. (2005) verabreichten 200 ml Kaffee an Ileostomapatienten. Von den 122 µM Chlorogensäure im Kaffee konnten etwa 60 % wieder gefunden werden, d.h. circa 64 ± 10 µM Chlorogensäure würden den Darm von gesunden Patienten erreichen. Es scheint, dass lokal in den Darmepithelien durch den Konsum von Apfelsaft oder Kaffee in Verbraucher-relevanten Mengen Konzentrationen erreicht werden können, die den untersuchten Konzentrationen (0,023-50 µM) entsprechen oder darüber liegen. Dadurch könnten die gemessenen Effekte auch *in vivo* von Bedeutung sein.

Viele Fruchtextrakte, wie Apfelsaft- und Heidelbeerextrakte, enthalten hohe Mengen an Chlorogensäure. Sollten sich die hier vorgelegten Daten im Besonderen die EGFR-aktivierenden Eigenschaften in weiteren Studien bestätigen, wäre es eine Möglichkeit, Chlorogensäure mittels Extraktion oder Abreicherung zu entfernen. Chlorogensäure scheint in den getesteten Verbraucher-relevanten Konzentrationen zu einer Erhöhung des Wachstums von zumindest den untersuchten Kolonkrebszellen zu führen. Dieses ist aber ein unerwünschter Effekt von Chlorogensäure, die bisher als antioxidativ und antikanzerogen beschrieben wurde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass obwohl viele Beeren- und Apfelsaftextrakte, die hohe Konzentrationen an Chlorogensäure enthalten, eine potente Hemmung der Zellproliferation und eine verminderte Aktivierung des EGFRs und nachgeschalteter Signalelemente bewirken, die getestete Leitverbindung Chlorogensäure einen gegenteiligen Effekt hat. Die Chlorogensäure führt zu einer starken Erhöhung der Phosphorylierung des EGFRs. Die Aktivierung wird bis zu den nachgeschalteten Signalelementen ERK1/2 weitergeleitet und es wird auch eine Transkriptionserhöhung einzelner über die MAPK-Kaskade-regulierter Gene, die das Zellwachstum beeinflussen, beobachtet. Dazu passend wird auch ein leichter Wachstumsstimulus durch Chlorogensäure beobachtet. Da Chlorogensäure gegenteilige Effekte im Vergleich zu den chlorogensäurereichen Extrakten zeigt, kann möglicherweise durch eine Abreicherung der Chlorogensäure in den Extrakten eine stärkere Hemmung des Zellwachstums und damit assoziierter Rezeptoren, sowie Signalkaskaden erreicht werden, wodurch das chemopräventive Potential dieser Extrakte möglicherweise gesteigert werden könnte. In dieser Arbeit wurde eine neue Wirkqualität der Chlorogensäure aufgeklärt, die im Rahmen des chemopräventiven Einsatzes von komplexen, polyphenolreichen Extrakten von Bedeutung sein könnte.

5. Zusammenfassung

Die Entstehung und Progression von Krebs wird vielfach mit Veränderungen von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und deren nachgeschalteten Signalkaskaden assoziiert [Hubbart und Miller, 2007]. Ein Ziel der Chemoprävention ist es, Lebensmittelinhaltsstoffe zu identifizieren, die diese wachstumsassoziierten Signalkaskaden hemmen können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie die Leitsubstanz Chlorogensäure, sowie chlorogensäurereiche Extrakte die Aktivität des EGFRs und nachgeschalteter Signalelemente der MAPK-Kaskade modulieren. Da bereits bekannt ist, dass Polyphenole, Wasserstoffperoxid in noch nicht genauer bekannten Reaktionen mit dem Zellkulturmedium bilden, wurden alle zellulären Versuche in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um sicher auf substanzvermittelte Effekte schließen zu können.

Der untersuchte Heidelbeerextrakt vermittelte eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der Zellproliferation. Im Vergleich zu diesem unverkapselten Extrakt wurde eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion, die mit dem Heidelbeerextrakt befüllt war, getestet. Die Verkapselung wird angewendet, um die Verbindungen zu stabilisieren und gezielt am Wirkort freizusetzen. Die Untersuchungen zeigten, dass es durch die Verkapselung zu einer etwa dreifach potenteren Wirkung nach 72 h Inkubation kommt, was möglicherweise auf eine erhöhte Stabilisierung oder verlangsamte Freisetzung am Wirkort zurückgeführt werden könnte. Als wichtige Leitverbindung polyphenolreicher Extrakte wurde die Chlorogensäure untersucht, die zu einem leichten Wachstumsstimulus in den höchsten getesteten Konzentrationen (23-46 µM) führte.

Der Heidelbeerextrakt hemmte in früheren Untersuchungen potent die Aktivierung des EGFRs [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko]. Um die Inhaltsstoffe bzw. Substanzklassen zu identifizieren, die zu dieser potenten Wirkung beitragen, wurde der Extrakt fraktioniert. Zwei dieser Fraktionen wurden auf die Modulation der Aktivität des EGFRs untersucht. Während die aufgereinigte Polymerfraktion, die hauptsächlich oligomere Procyanidine enthielt, zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der EGFR-Aktivität führte, vermittelte die Chlorogensäurefraktion eine potente Aktivierung des EGFRs. Die Aktivierung des EGFRs konnte auch durch die Einzelsubstanz Chlorogensäure in Konzentrationen, die denen des Extrakts vergleichbar waren, erreicht werden. Der Mechanismus dieser Aktivierung des EGFRs ist noch unbekannt und muss noch weiter aufgeklärt werden. Ein Einfluss

auf die Inhibierung der Proteintyrosinphosphatase-Aktivität, sowie auf die Freisetzung von EGF durch Chlorogensäure konnte im Laufe der vorliegenden Untersuchungen höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden. Bei der Coinkubation von aufgereinigter Polymerfraktion und Chlorogensäure wurde die Aktivität des EGFRs nicht signifikant beeinflusst, obwohl die Ausgangsstoffe eine Veränderung der Aktivität des EGFRs bewirkten. Es kommt möglicherweise zu einer antagonistischen Wirkung von oligomeren Procyanidinen und Chlorogensäure. In einem vergleichbaren Versuch, in dem der Einfluss weiterer Substanzen auf die Wirkung von Chlorogensäure auf den EGFR untersucht wurde, unterschied sich der Einfluss zweier rekonstituierter Apfelsaftextrakte mit und ohne Chlorogensäure auf die Modulation der Aktivität des EGFRs nicht signifikant. Jedoch zeigte der rekonstituierte Extrakt ohne Chlorogensäure im gesamten getesteten Konzentrationsbereich (1-500 µg/ml) eine deutlich erhöhte Aktivierung der nachgeschalteten Signalelementen ERK1/2, die über die MAPK-Kaskade aktiviert werden. Im Vergleich dazu veränderte der Extrakt ohne Chlorogensäure die Aktivität von ERK1/2 nicht. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Chlorogensäure auch dem EGFR-nachgeschaltete Signalelemente und nicht nur den Rezeptor selbst beeinflusst. Die Weiterleitung des aktivierten Signals vom EGFR bis zu ERK1/2 wurde auch durch die Einzelsubstanz Chlorogensäure verifiziert. Chlorogensäure scheint sowohl als Einzelsubstanz als auch innerhalb komplexer Extrakte zu einer Aktivierung des EGFRs und der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 zu führen.

Zusätzlich wurde die Transkription ausgewählter über die MAPK-Kaskade-regulierter wachstumsassoziierter Gene durch die Chlorogensäure untersucht. Während nach 3 h und nach 24 h kein signifikanter Einfluss gemessen wurde, vermittelte die Chlorogensäure nach 6 h eine Veränderung auf Transkriptionsebene ausgewählter Gene. Die mRNA-Transkripte der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2- und ErbB3-Rezeptor, sowie die des Zellzyklusregulators Cyclin D1 stiegen konzentrationsabhängig an, während die relative Transkription der Liganden EGF und VEGFa verringert wird. Dies deutet darauf hin, dass die Chlorogensäure differenzierte Effekte auf über die MAPK-Kaskade-regulierte Gene ausüben kann, was im Weiteren noch genauer untersucht werden sollte.

Von Bedeutung ist, dass die getesteten Konzentrationen an Chlorogensäure (0,02-50 µM) im für den Konsumenten-relevanten Bereich liegen und durch den Konsum von Kaffee oder Apfelsaft lokal im Kolon diese Konzentrationen erreicht werden könnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Leitsubstanz Chlorogensäure, die in vielen Lebensmitteln (z.B. Apfelsaft, Beeren, Kaffee) in

höheren Konzentrationen vorliegt, zu einer Aktivierung des EGFRs und der nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade führt. Darüber hinaus wird auch die Transkription einiger wachstumsassoziierter Gene erhöht und ein gleichzeitiger leichter Wachstumsstimulus ist zu beobachten. Da diese Effekte der Chlorogensäure im Sinne einer chemopräventiven Wirkung nicht erwünscht sind, sollten weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Chlorogensäure durchgeführt werden. Die Abreicherung von Chlorogensäure aus chlorogensäurereichen Extrakten könnte eine Möglichkeit darstellen, um das wachstumshemmende und damit möglicherweise das chemopräventive Potenzial dieser Extrakte zu verbessern.

6. Materialien und Methoden

6.1. Zellkultur

6.1.1. Zelllinie

HT29-Zelllinie (ACC 299): HT29-Zellen entstammen aus einem humanen Adenokarzinom des Kolons, die vom primären Tumor einer 44-jährigen Frau kaukasischen Ursprungs im Jahr 1964 etabliert wurden. Sie werden als heterotransplantabel beschrieben und bilden gut-differenzierte Tumore des I. Grades. Der Karyotyp ist hypertriploid mit 17,5 % Polyploidie. Die Zelllinie wächst adhärent, sowohl als Monolayer als auch in großen Kolonien mit ephitelialen Zellen. Die Verdopplungszeit beträgt vierzig bis sechzig Stunden [DSMZ].

6.1.2. Zellkultivierung

Damit aus einem Organismus isolierte Zellen proliferieren, muss die *In-vivo*-Umgebung *in vitro* durch das Kulturmedium und die Kultivierungsbedingungen möglichst gut ausgeglichen werden. Die Umweltbedingungen beinhalten Temperatur und Luftfeuchte, pH-Wert und Pufferung, die basale Versorgung mit essentiellen Nährstoffen und Sauerstoff, den Zusatz von ergänzenden Stoffwechselprodukten, Wachstumsfaktoren und Hormonen, das Kultursubstrat (z.B. eine extrazelluläre Matrix), die „Entsorgung“ der Stoffwechselprodukte und die Verhinderung einer Kontamination, um die Wichtigsten zu nennen [Lindl und Gstraunthaler, 2008].
Die Zelllinie wird in einer Kulturflasche mit einer kontaminationssicheren Belüftungskappe (Volumen: 175 cm^2) im Brutschrank kultiviert und wächst als Monolayer am Flaschenboden. Im Brutschrank wird die Temperatur bei 37 ℃, der Kohlendioxidanteil 5 % und die relative Luftfeuchtigkeit bei 95 % gehalten, damit eine Verdampfung der Kulturmedien verhindert wird.
Als Kulturmedium für HT29-Zellen wird Dubelco´s modified eagle Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) verwendet. Antibiotika werden zugesetzt, um Kontaminationen zu vermeiden. Penicillin/Streptomycin wirkt sowohl gegen gramnegative, als auch gegen grampositive Bakterien [Lindl und Gstraunthaler, 2008].

Alle Reagenzien, sowie PBS und Trypsin werden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 ℃ erwärmt.

6.1.3. Mediumwechsel

Das Medium, in dem die Zelllinien kultiviert werden, muss regelmäßig gewechselt werden, um Wachstum und Vitalität zu erhalten. Der Mediumwechsel erfolgt, da im Laufe der Zeit bestimmte Bestandteile des Mediums (z.B. die Nährstoffe) verbraucht, oder bei 37 ℃ zerfallen, und Stoffwechselendprodukte (z.B. Lactat, Ammoniak) gebildet werden, wodurch sich der pH-Wert des Mediums ändert. Phenolrot dient in den Kulturmedien als pH-Indikator. Dieses hat bei einem pH-Wert von 7,4, dem physiologischen pH-Wert, eine kirschrote Farbe, welche bei einer Erhöhung des pH-Wertes dunkelrot bis violett und bei einem Absinken des pH-Wertes orange bis gelb wird. Ist eine Änderung der Farbe von rot nach orange-gelb zu beobachten, sollte das Medium gewechselt werden [Lindl und Gstraunthaler, 2008].
Sollte die Oberfläche komplett bedeckt sein, so wird dies als Konfluenz bezeichnet [Lindl und Gstraunthaler; 2008].
Das Medium wird bei strikt adhärenten Zellen (Monolayer) mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, der Zellrasen eventuell mit PBS gewaschen, und wieder frisches Medium zugegeben [Lindl und Gstraunthaler, 2008].

6.1.4. Passagieren

Tumorzellen können selbst bei einem konfluenten Monolayer weiter wachsen, allerdings sinkt die Proliferationsrate bei zu hoher Zelldichte stark ab und dies kann zum Absterben der Zellen führen. Deshalb müssen die Zellen passagiert (d.h. verdünnt) werden. Dazu sind die Zellen meist durch Enzyme (z.B. Trypsin bzw. Trypsin-EDTA) aus dem Monolayer heraus zu lösen, in Suspension zu bringen und ein entsprechender Teil wieder in ein neues Kulturgefäß zu überführen. Dabei wird die Passagezahl der Kultur um 1 erhöht [Lindl und Gstraunthaler, 2008]. Bei einer Bedeckung von ca. 70-80 % der Oberfläche ist ein Passagieren der Monolayerkulturen sinnvoll.

Arbeitsschritte:

- Das Medium wird mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, ohne den Zellrasen zu zerstören.
- Der Zellrasen wird mit circa 5 ml PBS-Lösung gewaschen, um Reste des Serums zu entfernen. Anschließend wird die PBS-Lösung abgezogen.
- Die Zellen werden durch Zugabe von circa 2-3 ml der Trypsinlösung (für eine Kulturflasche der Größe 175 cm^2) abgelöst, die Flasche geschwenkt, um

eine gute Verteilung der Trypsinlösung zu gewährleisten, und im Brutschrank für 2-3 Minuten inkubiert.

- Nach starkem Abklopfen werden 10 ml 10 % FKS-haltiges Medium zugegeben, welches durch das Serum eine sofortige Inaktivierung des Trypsins bedingt, die Wand gut abgespült und mehrmals resuspendiert, um vorhandene Zellklumpen zu vereinzeln.
- Die Zellsuspenion wird in ein 50 ml Tube überführt.
- In die Kulturflasche wird je nach Zellkonzentration eine gewisse Menge an Zellsuspension pipettiert und 40 ml 10 % FKS-haltiges Medium zugefügt.

Reagenzien:

10 x PBS

1710 mM NaCl
100 mM Na_2HPO_4
34 mM KCl
18 mM KH_2PO_4

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt und mit $H_2O_{bidest.}$ auf 1 l aufgefüllt. 1 x PBS wird durch Verdünnung aus 10 x PBS hergestellt, autoklaviert und bei 4 ℃ gelagert.

Trypsin-Lösung

500 mg Trypsin
250 mg ETDA
100 ml 10 x PBS

Mit $H_2O_{bidest.}$ wird auf 1 l aufgefüllt, über Nacht auf Eis gerührt, der pH-Wert auf 7-7,4 eingestellt und steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). Die Aliquote, zu je 5 ml, werden bei -20 ℃ gelagert.

6.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Vor dem Ausstreuen muss eine Zellzählung erfolgen [Lindl und Gstraunthaler, 2008].

Zur Zellzahlbestimmung kultivierter Zellen wird meist die Neubauer Zählkammer verwendet, die ein Zählnetz aus drei mal drei großen Quadraten mit je 1 mm² Fläche und einer Tiefe von 0,1 mm besitzt (siehe Abb. 37). Ein Quadrat hat somit ein Volumen von 0,1 mm³ oder 0,1 µl. Die vier Eckquadrate werden zur Zellzählung genutzt [Lindl und Gstraunthaler, 2008].

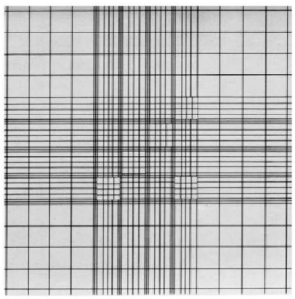


Abbildung 37 Schema der Neubauer Zählkammer [Lindl und Gstraunthaler, 2008].

Der Farbstoff Trypanblau kann von den Zellen aufgenommen werden. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv aus der Zelle befördern und erscheinen daher weiß. Tote Zellen sind hingegen blau gefärbt, da sie den Farbstoff aufgrund ihrer verringerten Membranpermeabilität leichter in den Zellen aufnehmen, aber ihn nicht mehr aktiv hinaus transportieren können.

Arbeitsschritte:

- Die Oberfläche der Zählkammer und das Deckglas werden mit Ethanol (70 %) und einem fusselfreien Tuch gereinigt und getrocknet.
- Die Zählkammer wird leicht angefeuchtet, das Deckplättchen fest angedrückt und solange auf und ab bewegt, bis sich Newtonsche Ringe ausbilden. Dadurch wird angezeigt, dass die richtige Höhe (0,1 mm) und somit auch das richtige Volumen eingestellt sind.
- Die Zellsuspension wird mittels Trypanblau angefärbt. Dazu wird eine Verdünnung (z.B. 1:10) aus der Zellsuspension und der Trypanblau-Lösung hergestellt.
- Die so verdünnte Zellsuspension wird in die Zählkammer gefüllt, indem mit einer Pipette einige Tropfen neben die Kante der Zählkammer aufgebracht werden und sich die Zählkammer mittels Kapillarkräften füllt.
- Die Zählkammer wird unter das Mikroskop gelegt und das Zählnetz fokussiert.
- Es werden die vier äußeren Quadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen, die auf der Linie liegen, nicht doppelt gezählt werden. Deshalb werden nur die Zellen, die auf den äußeren oder den inneren Linien liegen, mitgezählt.
-

Berechnung der Zellzahl:

Der Mittelwert aus den vier Quadraten wird mit dem Verdünnungsfaktor (z.B. 10 bei einer 1:10 Verdünnung) und mit dem Volumenfaktor von 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

6.2. Untersuchungen zum Zellwachstum mittels Sulforhodamin B (SRB) Test

Skehan et al. (1989) entwickelten den SRB-Test als eine schnelle, sensitive und billige Methode zur Messung des zellulären Proteingehaltes von adhärenten Kulturen und Suspensionskulturen in Mikrotiterplatten.

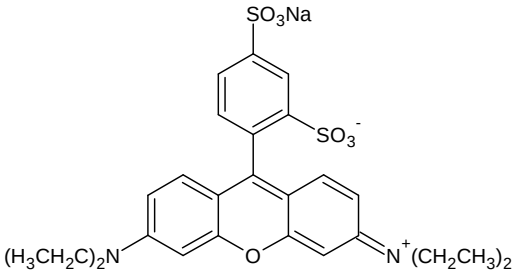


Abbildung 38 Strukturformel von Sulforhodamin B.

Sulforhodamin B ist ein leicht rosa gefärbter Aminoxanthenfarbstoff mit zwei Sulfongruppen (siehe Abb. 38). Dieser anionische Proteinfarbstoff bindet elektrostatisch an die basischen Aminosäurenreste der Proteine in den Zellen bei schwach sauren Bedingungen. Der Farbstoff kann quantitativ für die Messung der optischen Dichte durch eine schwache Base abgelöst werden [Skehan et al., 1989; Houghton et al., 2007]. Je größer die Anzahl an Zellen ist, desto mehr Farbstoff wird zuerst gebunden und anschließend durch basische Bedingungen wieder abgelöst. Die Absorption ist deshalb umso größer, je mehr Farbstoff sich in der Lösung befindet [Houghton et al., 2007].

Arbeitsschritte:

- In eine 24-Lochplatte werden 6.000 bis 70.000 Zellen pro Well (je nach Inkubationszeit) ausgestreut und für 48 h oder 72 h im Brutschrank kultiviert.
- Es wird mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz für 24 h, 48 h oder 72 h inkubiert. Als Kontrolle wird DMSO verwendet, wobei die DMSO-Konzentration im Endansatz von 1 ml pro Well bei 1 % liegt.
- Die Inkubation wird nach der entsprechenden Zeit mit 100 µl Trichloressigsäure (50 %) abgestoppt.
- Die Zellen werden für mindestens 1 h bei 4 °C im Kühlschrank am Plattenboden fixiert.
- Die Lochplatten werden anschließend viermal mit $H_2O_{bidest.}$ gewaschen, um Zell- und Mediumreste zu entfernen.
- Die Trocknung erfolgt entweder bei Raumtemperatur oder bei 40 °C im Trockenschrank.

- Die Zellen in den getrockneten Lochplatten werden mit 300 µl SRB-Lösung (0,4 %) im Dunkeln für mindestens eine halbe Stunde gefärbt.
- Der nicht an Zellproteine gebundene Farbstoff wird durch zweimaliges Spülen mit $H_2O_{bidest.}$ und durch zweimaliges Spülen mit Essigsäure (1 %) entfernt.
- Die Lochplatten werden wieder bei Raumtemperatur oder bei 40 ℃ im Trockenschrank getrocknet.
- Der gebundene Farbstoff wird mit 300 µl Tris-Base (pH=10) gelöst und die Platten photometrisch gegen Tris-Base mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

Auswertung:
Die gemessenen Absorptionswerte einer Platte werden gemittelt. Die Kontrolle mit DMSO wird auf 100 % gesetzt. Der Mittelwert der Proben wird zum Mittelwert der Kontrolle DMSO ins Verhältnis gesetzt, wobei der „Test-over-Control“-Wert (T/C) erhalten wird. Dieser stellt ein Maß für den Proteingehalt dar und wird somit auch mit der Zellzahl korreliert.

Reagenzien:

Trichloressigsäure:	50 % in $H_2O_{bidest.}$
Essigsäurelösung:	1 % in $H_2O_{bidest.}$
SRB-Lösung:	0,4 % in einer Essigsäurelösung zu 1 %
Tris-Base (pH 10):	10 mM Tris in $H_2O_{bidest.}$

6.3. Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung

Die Zellen werden mit der Testsubstanz inkubiert und mittels Trypanblau gefärbt. Tote Zellen können den Farbstoff nicht mehr aktiv aus der Zelle schleusen und erscheinen daher unter dem Mikroskop blau, während lebende Zellen weiß sind. So können tote und lebende Zellen unterschieden und gezählt werden, wodurch die Zellviabilität bestimmt werden kann.

Arbeitsschritte:

- Die Zellen werden in mittleren Petrischalen (d = 10 cm) ausgestreut und gemäß den Bedingungen des Western Blot kultiviert und für 45 Minuten inkubiert (siehe 6.4.1 f). Nach 30 Minuten erfolgt wiederum die Stimulierung mit EGF.

- Nach der Inkubationszeit wird das Medium abgegossen und zweimal mit 5 ml warmer 1 x PBS-Lösung gewaschen.
- Die Zellen werden mit 1 ml Trypsin für ca. 2-3 Minuten im Brutschrank von den Schalen gelöst, mit 2 ml 10 % FKS-haltigem Medium abgespült und in ein Eppendorfgefäß überführt.
- Es folgt eine entsprechende Verdünnung (z.B. 1:5 oder 1:10) mit Trypanblau, um die toten und lebenden Zellen im Mikroskop mit Hilfe der Neubauer Zählkammer auszuzählen.

Die Zellviabilität wird in [%] lebender Zellen bestimmt und auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bezogen.

6.4. Untersuchungen zur Modulation der Aktivität und Expression des EGF-Rezeptors sowie nachgeschalteter Signalelemente mittels Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse erfolgt zuerst eine Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wobei die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Anschließend werden die Proteine, um sie detektieren zu können, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgt mittels spezifischer Antikörper, welche gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet sind. Die Quantifizierung wird über eine Chemilumineszenz-Messung durchgeführt.

6.4.1. Kultivierung der Zellen

Arbeitsschritte:

- Es werden 0,8-1,5 Millionen HT29-Zellen in mittlere Petrischalen (d = 10 cm) ausgestreut und für 48 oder 72 h mit 10 ml 10 % FKS-haltigem Medium kultiviert.
- Danach wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit ca. 5 ml PBS gewaschen und die Zellen wieder mit 10 ml 1 % FKS-haltigem Medium versetzt.
- Es wird für weitere 24 h unter serumreduzierten Bedingungen kultiviert.

6.4.2. Substanzinkubation

Arbeitsschritte:

- Die Substanzinkubation erfolgt in serumfreiem Medium.
- Die Testsubstanz wird kurz vor der Inkubation in DMSO gelöst, wobei die Endkonzentration an DMSO 1 % beträgt.
- Es wird reines DMSO als Lösungsmittelkontrolle und Tyrphostin AG1478 (1 µM) als Positivkontrolle mitgeführt.
- Die Substanzinkubation erfolgt unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) mit 6 ml serumfreiem Medium für 45 Minuten im Brutschrank.
- Nach 30 Minuten wird mit dem spezifischem Liganden EGF (100 ng/ml) stimuliert und für weitere 15 Minuten inkubiert.

6.4.3. Aufarbeitung der Zellen und Gewinnung der Proteine

Arbeitsschritte:

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgt auf Eis.

- Die Petrischalen werden nach der 45 minütigen Inkubation sofort auf Eis gestellt und das Medium wird verworfen.
- Der Zellrassen wird zweimal mit 5 ml eisgekühltem PBS gewaschen und eventuelle Reste an PBS mit einer Pipette abgezogen.
- Um die Zellen zu lysieren, werden 200 µl RIPA-Puffer zupipettiert und dieser gut verteilt.
- Die Zellen werden abgeschabt und möglichst vollständig in einen Handhomogenisator mit tight Pistill überführt.
- Die Homogenisierung erfolgt durch 40 Hübe.
- Der aufgeschlossene Inhalt wird in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 14.000 g für 10 Minuten bei 4 ℃ zentrifugiert.
- Der Überstand kommt in ein neues Eppendorfgefäß und das gebildete Pellet (die unlöslichen Zellbestandteile) wird verworfen.

Reagenzien:

RIPA-Puffer

50	mM	Tris
250	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	mM	NaF
1	% (v/v)	Igepal CA-630

Mit $H_2O_{bidest.}$ wird auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Direkt vor der Verwendung werden zum angesetzten Puffer noch folgende Chemikalien zugegeben und der hergestellte RIPA-Puffer auf Eis gelagert.

1	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
1	mM	Na_3VO_4
1	µM	Protease Inhibitor Mix (Roche)

6.4.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Bindung von Coomassie® Brillant Blue G-250 (siehe Abb. 39) an Proteine.
Es tritt ein Absorptionsshift von 465 nm zu 595 nm ein, wenn Coomassie® Brillant Blue G-250 in einer sauren Lösung an Proteine bindet. Wegen der Nichtlinearität des Farbumschlages über einen großen Konzentrationsbereich, muss eine Kalibrierkurve in jedem Assay mitgeführt werden.
Die anionische Form des Farbstoffes komplexiert mit Proteinen, wobei es zu einer Farbänderung von braun nach blau kommt. Es wird angenommen, dass der Farbstoff durch elektrostatische Anziehung der Sulfongruppen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophoben Wechselwirkungen an die Seitenketten der basischen und hydrophoben Proteine bindet.

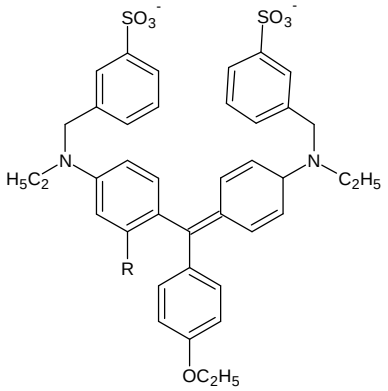


Abbildung 39 Strukturformel von Coomassie® Brillant Blue G250.

Arbeitsschritte:

- Die Proben werden 1:10 mit Wasser verdünnt.
- Von den Verdünnungen, $H_2O_{bidest.}$, RIPA-Puffer (beide als Blindwerte) und den BSA-Standards werden 10 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit 1 ml filtriertem Bradford-Reagenz versetzt.
- Es werden jeweils 200 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert, wobei eine Dreifachbestimmung durchgeführt wird.

- Die Absorption wird im Mikrotiterplattenlesegerät (Victor^{3}V Multilable Counter, Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Auswertung:
Mittels der Messwerte der BSA-Standards (abzüglich des Bindwertes $H_2O_{bidest.}$) wird eine Kalibrierfunktion erstellt. Mit Hilfe derer aus den Messwerten der Proben (abzüglich des Blindwertes RIPA-Puffers) der Proteingehalt der Proben bestimmt wird. Nach Berücksichtigung der Verdünnung erhält man die Konzentration in den ursprünglichen Lösungen.
Aus diesen Konzentrationswerten wird das Pipettierschema berechnet, um bei der anschließenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese immer denselben Proteingehalt in den Einzelproben zu erzielen.

Reagenzien:
Bradfordreagenz

100 mg	Coomassie-Brilliantblau G250
50 ml	Ethanol
100 ml	Phosphorsäure (85 %)

Mit $H_2O_{bidest.}$ ist auf 1 Liter aufzufüllen und nach vier Wochen wird dieses abfiltriert. Die Lagerung erfolgt im Dunkeln bei Raumtemperatur.

6.4.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophorese beruht auf dem Prinzip, dass geladene Teilchen in einem elektrischen Feld wandern. Die Geschwindigkeit mit der Proteine durch das Gel wandern wird durch die Nettoladung, die Größe und die Gestalt bestimmt, d.h. sie werden proportional zu ihrem Ladungs/Masse-Quotienten beschleunigt und durch Reibung, die von der Größe und Form abhängt, abgebremst [Müller-Esterl, 2004; Löffler et al, 2007].
Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Trennung erfolgt in einem hochvernetzten Polyacrylamidgel, welches durch Polymerisierung von Monomeren kurz vor der Verwendung hergestellt wird. Für die optimale Trennung der Proteine kann die Porengröße des Gels durch Variation des Vernetzungsgrades eingestellt werden [Löffler et al, 2007]. SDS, ein wässriges anionisches Detergens, bindet an die hydrophoben Bereiche des Proteins, wobei das Protein denaturiert wird und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen aufgehoben werden. Die Eigenladung der Proteine wird überdeckt, wodurch das Ladungs/Masse-Verhältnis aller Proteine

nahezu gleich ist. Die Trennung erfolgt nur mehr nach der Molekularmasse, da kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels zur Anode wandern [Müller-Esterl, 2004; Löffler et al, 2007]. Mercaptoethanol, ein Reduktionsmittel, wird hinzugefügt, um die Disulfidbrücken zwischen den Proteinen oder innerhalb eines Proteins zu lösen [Müller-Esterl, 2004; Löffler et al, 2007].
Bei der Elektrophorese können die Molekularmassen der getrennten Proteine abgeschätzt werden, indem Referenzproteine (Marker) mit bekannten Molekulargewicht mitgeführt werden [Müller-Esterl, 2004; Löffler et al, 2007].

Tabelle 6 Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine und verwendete Polyacrylamidanteile des Trenngels.

Zu charakterisierendes Protein	Molekulargewicht [kDa]	Polyacrylamidanteil des Trenngels [%]
EGFR/pEGFR	170	7
ERK/pERK	42, 44	10
α-Tubulin	54	12

Tabelle 7 Pipettierschema zweier Trenngele und des Sammelgels.

	Trenngel (7%)	Trenngel (12%)	Sammelgel
$H_2O_{bidest.}$ [ml]	2,39	1,62	0,78
1,5 M Tris (pH 8,8) [ml]	1,16	1,16	-
0,5 M Tris (pH6,8) [ml]	-	-	0,33
Acrylamid (30 %) [ml]	1,08	1,85	0,16
SDS (10 %) [µl]	46,2	46,2	13,1
APS (10 %) [µl]	23,1	23,1	13,1
TEMED [µl]	2,31	2,31	1,31

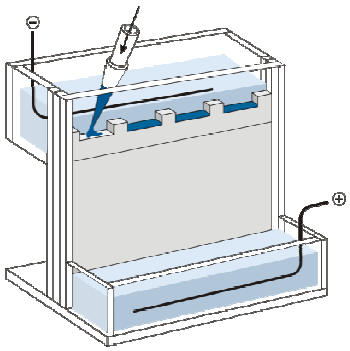
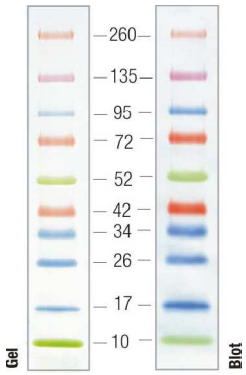


Abbildung 40 Schematischer Aufbau einer Elektrophoresekammer.

Arbeitsschritte:

- Die Glasplatten werden entfettet und in der Gießvorrichtung fixiert.
- Für das Trenngel werden $H_2O_{bidest.}$, Tris, Acrylamid und SDS vorgelegt, dann APS als Radikalstarter und TEMED als Radikalstabilisator zugegeben und das ganze gut durchmischt (siehe Tab. 6 und 7).
- Das Gel wird zügig zwischen die beiden fixierten Glasplatten pipettiert. Das Trenngel soll etwas unter den Kämmen enden.
- Dieses Gel wird mit n-Butanol überschichtet, um Sauerstoff auszuschließen und die Oberfläche zu glätten.
- Nach dem Auspolimerisieren des Gels (ca. 30 Minuten) wird Butanol abgegossen, mit $H_2O_{bidest.}$ gespült und die Reste an Flüssigkeit mit einem Papier aufgesogen.
- Das Sammelgel wird zusammen pipettiert (siehe Tab. 7) und wieder zwischen die Glasplatten pipettiert. Der Kamm wird eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Probentaschen bilden.
- Nach dem Auspolymerisieren werden die Kämme vorsichtig entfernt und mittels einer Kanüle eventuell vorhandene Flüssigkeit und Gelreste in den Probentaschen abgesaugt.
- Bei der Proteinbestimmung wird die jeweilige Proteinmenge der verschiedenen Proben bestimmt, die mit Wasser verdünnt wird, um in jeder Probentasche bei der Elektrophorese dieselbe Proteinmenge vorzufinden.
- Anschließend wird SDS-Probenpuffer zugefügt und die Mischung wird im Thriller bei 95 ℃ und 950 rpm für acht Minuten den aturiert.
- Von den denaturierten Proben werden jeweils 40 µg Gesamtprotein in die einzelnen Probentaschen pipettiert und die Taschen vorsichtig mit 1 x Laufpuffer gefüllt (siehe Abb. 40).
- In die äußere Tasche wird ein Proteinmolekulargewichtsstandard (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder) mitgeführt, um die Elektrophorese visuell verfolgen zu können und die Molekulargewichte der zu untersuchtenden Proteine zu bestimmen (siehe Abb. 41).
- Die Elektrophoresekammer wird mit 1 x Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese gestartet. Die Spannung wird auf 100 Volt eingestellt. Nach einer halben Stunde wird sie auf 120 Volt und nach einer weiteren halben Stunde schließlich auf 140 Volt erhöht. Die Elektrophorese läuft für weitere 60 bis 90 Minuten bei 140 Volt bis zu einer ausreichenden Auftrennung der zu untersuchenden Proteine.



4-20 % Tris-glycin SDS-PAGE

Abbildung 41 Molekulargewichte des Markers Spectra™ Multicolor broad Range Protein Ladder.

Reagenzien:

10 x SDS-Laufpuffer

2 M Glycin
250 mM Tris
1 % SDS

Der pH-Wert wird eingestellt und mit $H_2O_{bidest.}$ aufgefüllt.

Acrylamid (30%)

Wässrige Lösung mit 0,8 % N,N´-Methylenbisacrylamid.

Tris Puffer (1,5 M)

1,5 M Tris

Es wird mit $H_2O_{bidest.}$ aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

Tris Puffer (0,5 M)

0,5 M Tris

Es wird mit $H_2O_{bidest.}$ aufgefüllt und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

6 x SDS-Probenpuffer

50 ml 0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)
40 ml Glycerin
1,24 g SDS
0,16 g Bromphenolblau

Es wird auf 100 ml mit $H_2O_{bidest.}$ aufgefüllt und zu 1 ml aliquotiert. Kurz vor der Verwendung werden die Aliquots mit 52,6 µl β-Mercaptoethanol (5 % (v/v)) versetzt.

Ammoniumperoxidsulfat (APS)-Lösung

10 % (w/v) APS in $H_2O_{bidest.}$

SDS-Lösung
10 % (w/v) SDS in $H_2O_{bidest.}$

N,N,N`,N`-Tetramethylendiamin (TEMED)-Lösung

6.4.6. Western Blot Analyse und Detektion mittels spezifischer Antikörper

Nach der Gelelektrophorese werden die auf dem Gel separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (geblottet), da die Proteine in der Gelmatrix für die Antikörpermoleküle nicht zugänglich sind [Müller-Esterl, 2004; Löffler et al, 2007]. Der Transfer erfolgt, indem das Gel auf die Membran gelegt und senkrecht zur Gelebene eine Spannung angelegt wird. Es kommt zur Bindung der übertragenen Proteine an die Membran. Die unspezifischen Bindungsstellen der Membran werden mit Proteinen, z.B. aus Milchpulver oder Bovineserumalbumin (BSA), geblockt, um unspezifische Bindung der Antikörper-Proteine zu verhindern. Es erfolgt zuerst eine Inkubation mit dem Primärantikörper und dann mit dem Sekundärantikörper, der gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist, zur Sichtbarmachung der Proteinbande. Da an den Sekundärantikörper das Enzym HPR (horseradish peroxidase) gebunden ist, wird durch Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol und damit die Aussendung von Licht katalysiert. Diese wird mit Chemilumineszenz-Messung bestimmt [Müller-Esterl, 2004].

Arbeitsschritte:

- Pro Gel werden zwei Whatman-Papiere und eine Membran der passenden Größe in Blottingpuffer äquilibriert.
- Nach der Gelelektrophorese werden die Glasplatten aus der Apparatur ausgebaut. Eine Platte wird vom Gel getrennt und das Sammelgel entfernt.
- Das Trenngel wird durch Schwenken im Blottingpuffer von der Glasplatte gelöst.
- Für den Western Blot werden ein Whatman-Papier, die Membran, das Gel und ein weiteres Whatman-Papier aufeinandergelegt, mit einem Roller die Luftblassen entfernt und in einer Kassette fixiert.
- Die Kassette wird senkrecht in den Blotter eingesetzt und dieser mit Blottingpuffer bis zum Rand gefüllt.
- Der Western Blot erfolgt bei 150 V, 1000 mA und 150 W für 1 h 20 min.

- Die Nitrocellulosemembran wird in Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 ℃ am Schüttler geblockt, um unspezifische Bindung zu verhindern.
- Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, der gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet ist. Es wird eine entsprechende Verdünnung mit Blockingpuffer hergestellt und für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 ℃ im Überkopfschüttler inkub iert.
- Es folgen drei Waschschritte für mindestens fünf Minuten mit Waschpuffer.
- Die Membranen werden mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in einer entsprechenden Verdünnung mit Blockingpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert.
- Die Membranen werden abermals dreimal für mindestens fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen.
- Vor der Detektion wird die Membran für eine Minute mit Western Lightning Reagent (Perkin Elmeyer) inkubiert.

Die Detektion erfolgt mit der LAS-4000 (Luminescent Image Analyser, Fujifilm) und die Auswertung mittels Multi Gauge V3.2. Bei der Auswertung wird die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) auf 100 % gesetzt und die zu analysierenden Proben als „Test-over-Control“ (T/C) in [%] angegeben.

Reagenzien:

2 x Blottingpuffer

78 mM Glycin
96 mM Tris
0,074 % SDS
40 % Methanol
Es wird mit $H_2O_{bidest.}$ aufgefüllt.

20 x TBS

2,6 M NaCl
0,4 M Tris
Es wird mit $H_2O_{bidest.}$ aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

Blockingpuffer

5 % Milchpulver oder BSA
0,03 % Tween 20
Es wird in 1 x TBS gelöst.

Waschpuffer

250 ml 20 x TBS
0,03 % Tween 20
Es wird mit $H_2O_{bidest.}$ auf 5 Liter aufgefüllt.

Western Lightning™ - ECL

1 ml Oxidizing Reagent
1 ml Enhanced Luminol Reagent

Blockieren der Targets:

EGFR: Milchpulver
pEGFR: Milchpulver
ERK1/2: Milchpulver
pERK1/2: Milchpulver

Primärantikörperinkubation und Verdünnung:

EGFR (mouse): 1:1000 in Milchpulver
pEGFR (goat): 1:500 oder 1:1000 in Milchpulver
ERK1/2 (rabbit): 1:1000 in BSA
pERK1/2 (rabbit): 1:1000 in BSA
Tubulin (mouse): 1:5000 in Milchpulver

Sekundärantikörperinkubation und Verdünnung:

Goat Anti-Mouse AK 1:2000 in Milchpulver
Mouse Anti-Goat AK 1:2000 in Milchpulver
Goat Anti-Rabbit AK 1:2000 in BSA

6.5. Untersuchung der Gentranskription mittels RealTime-PCR

Die Untersuchung der Gentranskription wird mittels RealTime-Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt.
Nach der Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz wird die RNA isoliert. Im Anschluss an die Bestimmung der Quantität und Reinheit der RNA wird diese mittels Reverser Transkriptasen in cDNA (Complementary DNA) umgeschrieben. Die cDNA wird direkt für die PCR eingesetzt. Es werden verschiedene Abschnitte der DNA, die für verschiedene Gene kodieren, mittels spezifischer Primer

vervielfältigt, und mittels Fluoreszenzmessung durch den Farbstoff SYBR Green quantifiziert.

6.5.1. Inkubation

Es werden 500.000-1.000.000 Zellen in kleinen Petrischalen (d = 5 cm) ausgestreut und für 48 oder 72 h kultiviert. Die Inkubation erfolgt für 3 h oder 6 h in 4 ml serumfreien Medium oder für 24 h in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die zu untersuchende Substanz wird in DMSO gelöst, wobei die Endkonzentration 1 % beträgt. Bei jedem Versuch wird DMSO als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

6.5.2. Isolierung der RNA

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (siehe Abb. 42).

Abbildung 42 Schematische Darstellung des RNeasy® Mini Verfahren (QIAGEN) [modifiziert nach RNeasy Mini Handbuch, QIAGEN].

Die RNA-Reinigung beruht auf der selektiven Bindung der RNA an eine Silicamembran. Die Zellen werden zuerst lysiert und in Gegenwart eines Puffers mit einer hohen denaturierenden Guanidinthiocyanat-Konzentration, welche sofort RNasen inaktiviert, homogenisiert. Ethanol wird zugegeben, um die richtigen Bindungseigenschaften zu erreichen. Die Probe wird dann auf die RNeasy Mini Spin Säule aufgebracht, wo die gesamte RNA an die Membran bindet und Kontaminanten effektiv weggewaschen werden. Die RNA wird dann in 30-50 µl Wasser eluiert. Alle Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte werden durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge durchgeführt [RNeasy Mini Handbuch, QIAGEN].

Arbeitsschritte:

- Das Medium wird von den kleinen Petrischalen abgeschüttet.
- Es wird einmal mit 3 ml PBS aus dem Kühlschrank gewaschen, erneut abgeschüttet und die Reste mit einer Pipette möglichst vollständig abgesaugt.
- Die Zellen werden durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (mit Zusatz von 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT-Puffer) lysiert, mit einem sterilen Schaber gut abgeschabt und in ein 1,5 ml Collection Tube überführt.
- Die Homogenisierung des Lysates erfolgt durch mindestens fünfmaliges Aufziehen durch eine 20-gauge Kanüle (0,9 mm Durchmesser).
- Gleiches Volumen (d.h. 350 µl) an Ethanol (70 %) wird zum homogenisierten Lysat hinzugefügt und gut resuspendiert.
- Die Probe wird auf die RNeasy Säule, die in einem 2 ml Collection Tube platziert ist, pipettiert. Der Deckel wird geschlossen und es wird für 60 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
- 700 µl RW1-Puffer werden auf die Säule pipettiert und bei 10.000 rpm für 60 s zentrifugiert, um die Membran zu waschen. Der Durchfluss wird verworfen.
- Es werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, für 60 s bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
- Der letzte Schritt wird noch einmal wiederholt, um die Säule zu waschen.
- Die Säule wird auf ein neues 2 ml Collection Tube gesetzt und bei voller Geschwindigkeit noch 2 min zentrifugiert. So wird die Membran getrocknet und es werden eventuelle Reste an Ethanol, welche die RNA Elution stören könnten, RPE-Puffer oder andere Rückstände an der Außenseite der Säule entfernt.

- Die Säule wird auf ein neues 1,5 ml Collection Tube gesetzt und 30-50 µl RNase-freies Wasser (je nach RNA-Menge) direkt auf die Membran pipettiert. Es wird für 60 s bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die eluierte RNA ist instabil und wird sofort auf Eis gelagert.

Die gereinigte RNA kann in RNase-freiem Wasser im Biofreezer bei -80 ℃ für mindestens ein Jahr gelagert werden, ohne das ein Abbau der RNA detektiert wird.

Reagenzien:

DEPC-H_2O (0,1 %)

1 ml DEPC

Dieses wird in 1 l $H_2O_{bidest.}$ gelöst, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.

6.5.3. Bestimmung der Quantität und Reinheit der RNA

Die Konzentration der RNA wird durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in einem Spektralphotometer (Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Peqlab Biotechnology GmbH) bestimmt.

Um ausreichende Signifikanz zu erreichen, sollte A_{260} größer als 0,15 sein. Die Absorption von einer Einheit bei 260 nm entspricht 44 µg an RNA pro ml bei einem neutralen pH-Wert (A_{260}=1 → 44 µg/ml) [RNeasy Mini Handbuch, QIAGEN].

In dieser Arbeit wird die Absorptionsmessung in RNase-freiem Wasser und aus den unverdünnten Proben der RNA-Isolierung durchgeführt, wobei der Faktor 40 ist. Mit RNase-freiem Wasser wird der Blindwert gesetzt und anschließend die Proben vermessen.

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt eine Abschätzung der Reinheit der RNA in Bezug auf Kontaminanten, die im UV Spektrum absorbieren, wie z.B. Proteine. Aber das Verhältnis wird beträchtlich vom pH-Wert beeinflusst, z.B. sollte reine RNA ein A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1,9-2,1 in 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, haben [RNeasy Mini Handbuch, QIAGEN].

6.5.4. Reverse Transkription

Da bei der PCR nur DNA durch die Taq-DNA-Polymerase vervielfältigt werden kann, wird die isolierte RNA in cDNA mit Hilfe Reverser Transkriptasen umgeschrieben.

Das QuantiTect Reverse Transcription Kit umfasst zwei Schritte: Eliminieren der genomischen DNA und Reverse Transkription.

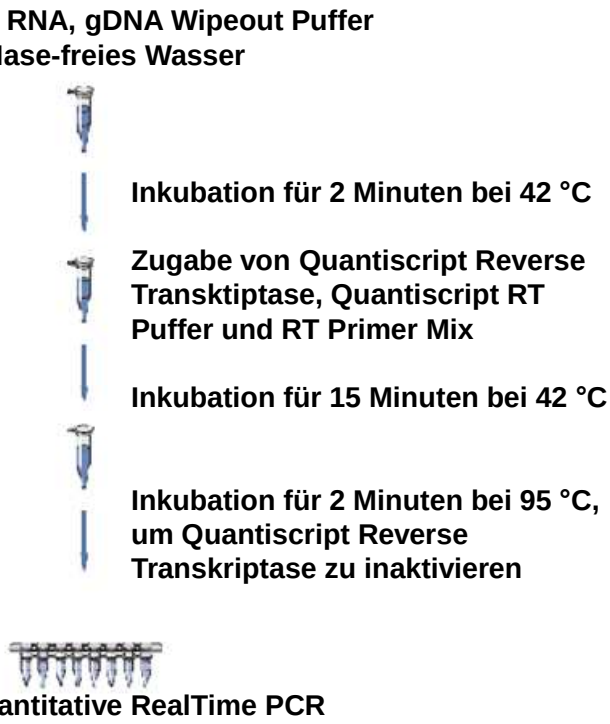


Abbildung 43 Schematische Darstellung der Reversen Transkription [modifiziert nach QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QIAGEN].

Die gereinigte RNA-Probe wird kurz in gDNA Wipeout Buffer bei 42 ℃ für 2 Minuten inkubiert, um effektiv Kontaminationen an genomischer DNA zu entfernen und kann dann direkt für die Reverse Transkription weiter verwendet werden.
Bei der Reversen Transkription wird ein Master Mix verwendet, der aus Quantiscript Reverse Transkriptase, Quantiscript RT Puffer und RT Primer Mix besteht. Die gesamte Reaktion findet bei 42 ℃ statt und wird dann bei 95 ℃ inaktiviert (siehe Abb. 43) [QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QIAGEN].
Quantiscript RT Puffer enthält dNTPs. RT Primer Mix besteht aus einer optimierten Mischung von oligo-dT und unspezifische Primer, die eine hohe cDNA Ausbeute von allen Regionen der RNA Transkriptase, sogar von den 5` Regionen erlaubt [QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QIAGEN].
Reverse Transkriptaseenzyme werden normalerweise von RNA-enthaltenden Retroviren gewonnen. Quantiscript Reverse Transkriptasen sind aber rekombinante heterodimere Enzyme, die von E. coli exprimiert werden [QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QIAGEN].

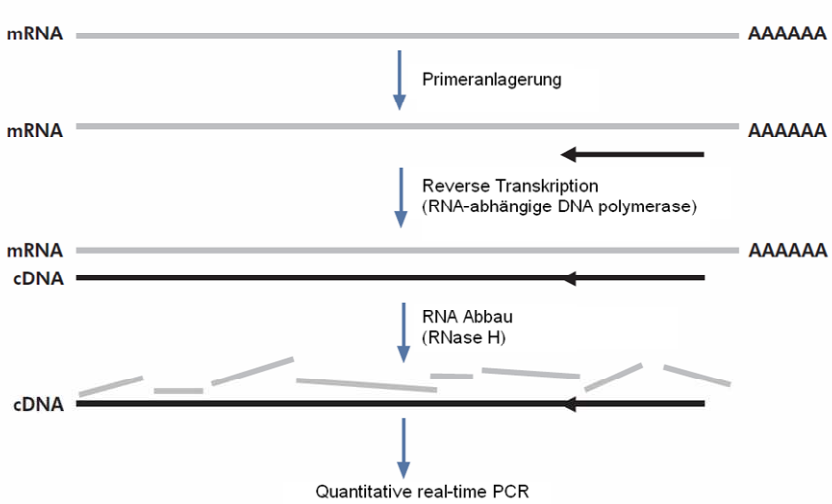


Abbildung 44 cDNA-Synthese [modifiziert nach QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QIAGEN].

Reverse Transkriptase ist ein multifunktionelles Enzym mit drei verschiedenen enzymatischen Aktivitäten: einer RNA-abhängigen DNA Polymerase, einer Hybrid-abhängigen Exoribonuclease (RNase H) und einer DNA-abhängigen DNA Polymerase. *In vivo* erlaubt die Kombination von diesen drei Aktivitäten die Transkription von Einzelstrang RNA Genom in Doppelstrang DNA. Für die Reverse Transkription *in vitro* werden die ersten zwei Aktivitäten benötigt, um Einzelstrang cDNA zu erzeugen. Nach Bindung der Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Region der mRNA am 3`-Ende des Transkripts transkripiert RNA-abhängige DNA Polymerase die cDNA von einem RNA Templat in 5`→3`-Richtung (siehe Abb. 44). Die erzeugte cDNA wird für die quantitative RealTime-PCR benötigt. Die RNase H Aktivität baut spezifisch nur die RNA in RNA:DNA Hybriden ab und hat keinen Effekt auf die reine RNA. Mit Hilfe Reverser Transkriptasen wird der zweite Strang der cDNA aufgebaut [QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QIAGEN].

<u>Arbeitsschritte:</u>

Alle Reaktionen werden auf Eis durchgeführt, um das Risiko des RNA-Abbaus zu minimieren.

- Die isolierte RNA wird auf Eis aufgetaut. gDNA Wipeout Puffer, Quantiscript Reverse Transkriptase, Quantiscript RT Puffer, RT Primer Mix und RNase-freies Wasser werden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann auf Eis gelagert.
- Die genomische DNA Eliminierungsreaktion wird auf Eis durchgeführt, indem variable Mengen an Template-RNA und RNase-freies Wasser gemischt werden, sodass in 6 µl 500 µg RNA enthalten sind. Es wird 1 µl gDNA Wipeout Puffer zupipettiert.

- Es wird am Thermal Cycler für 2 Minuten bei 42 ℃ inkubiert und dann die Proben wieder auf Eis gestellt.
- Der Reverse-Transkriptase Master Mix wird hergestellt. Dieser besteht aus 0,5 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 2 µl Quantiscript RT Puffer, 5x, und 0,5 µl RT Primer Mix pro Probe.
- Zu jedem RNA Templat werden 3 µl Master Mix pipettiert (Endvolumen: 10 µl).
- Es wird am Thermal Cycler für 15 Minuten bei 42 ℃ und dann bei 95 ℃ für 2 Minuten inkubiert, um die Quantiscript Reverse Transkriptase zu inaktivieren.
- Davon wird ein Aliquot für die RealTime-PCR verwendet. Es wird entweder gleich die RealTime-PCR durchgeführt oder die cDNA bei -20 ℃ gelagert (Haltbarkeit einige Wochen).

6.5.5. RealTime-PCR

Bei der PCR kommt es zur Vervielfachung einer spezifischen Sequenz der DNA. Diese läuft in drei Schritten ab, die mehrmals wiederholt werden: Denaturierung, Annealing und Polymerisation (siehe Abb. 45). Der DNA-Doppelstrang wird bei 95 ℃ denaturiert. Bei der anschließenden Abkühlung auf 55 ℃ lagern sich die Primer, zwei aus etwa 15-25 Basen bestehende Oligonucleotide, an das 5`-Ende des komplementären Einzelstranges an (Annealing). Sie liefern den Startpunkt der DNA-Polymerase-Reaktion. Durch den Zusatz der DNA-Polymerase und von Desoxyribonucleotiden werden die Einzelstränge von 5`→3`-Richtung zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert (Polymerisation). Die Initialreaktion wird durch eine kurzzeitige Erhitzung auf 95 ℃ unterbro chen und der Zyklus startet von neuem [Müller-Esterl, 2004; Löffler et al, 2007]. Es kommt zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Moleküle. Da die Temperatur für die DNA-Polymerisation immer wieder erhöht wird, muss eine hitzestabile DNA-Polymerase, z.B. aus Thermus aquaticus (Taq-Polymerase), verwendet werden [Löffler et al, 2007].

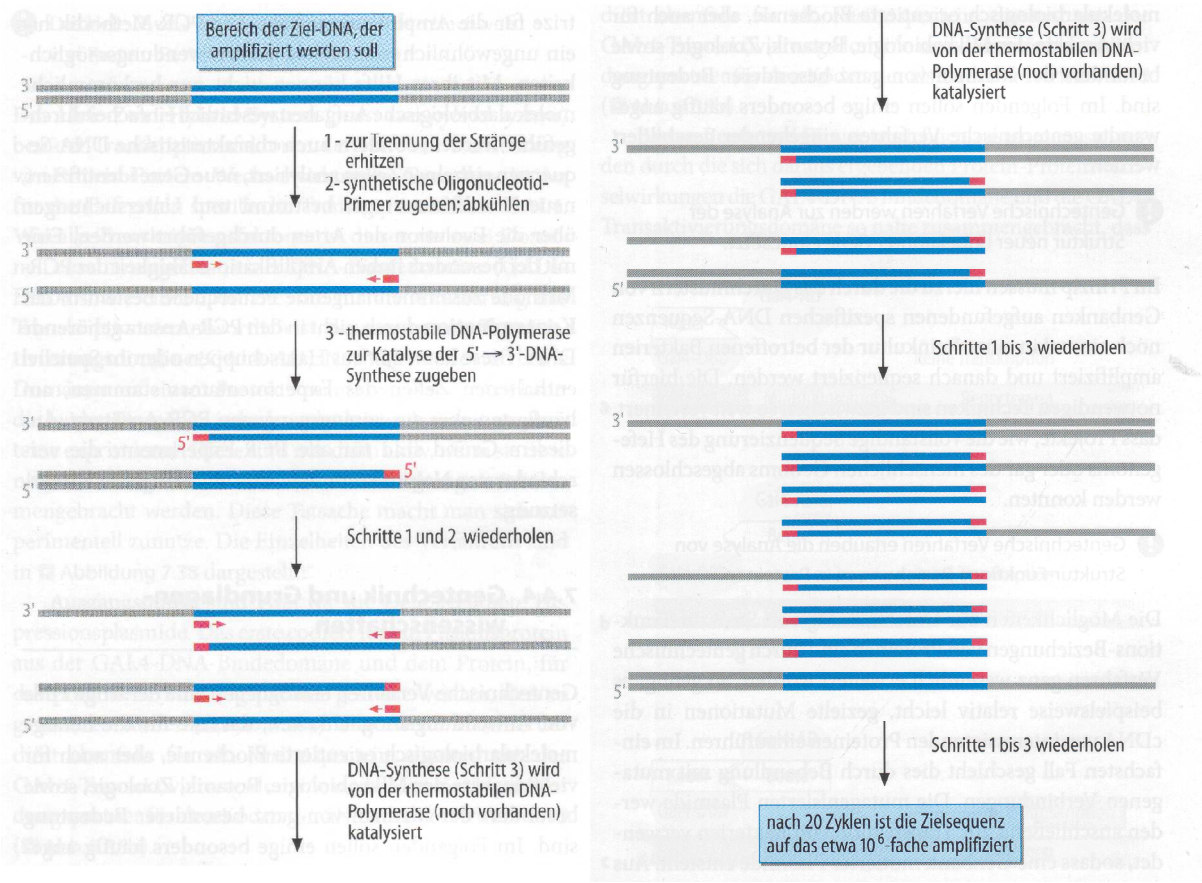


Abbildung 45 Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerasekettenreaktion [Löffler et al., 2007].

Das QuantiTect SYBR Green PCR Kit wird für die Quantifizierung der cDNA Targets verwendet, wobei eine two-step RT-PCR durchgeführt wird.
Der 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthält HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Puffer, dNTP Mix, SYBR Green I und einen ROX passiven Referenzfarbstoff. Die HotStarTaq DNA Polymerase ist eine modifizierte Form einer rekombinanten 94 kDa DNA Polymerase, die ursprünglich aus Thermus aquaticus isoliert wurde, und in E. coli geklont wurde. Sie liegt inaktiv vor und hat keine enzymatische Aktivität bei Raumtemperatur. Das Enzym wird beim Start der Reaktion bei einem 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95 ℃ aktiviert und ermöglicht so Reaktionen bei Raumtemperatur. Der QuantiTect SYPR Green PCR Puffer beinhaltet eine Kombination von KCl und $(NH_4)_2SO_4$, welches spezifische Primerbindung gegenüber unspezifischer während des Annealingschritts in jedem PCR Zyklus begünstigt [QuantiTect SYPR Green PCR Handbuch, QIAGEN].

Arbeitsschritte:

- In eine 96-Loch Platte (MicroAmp®, Applied Biosystem) werden 19,5 µl Master Mix, der aus 10 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (2 x),

2 µl QuantiTect® SYBR Green Primer Assay (10 x) (spezifisch für jedes Gen) und 7,5 µl RNase-freies Wasser besteht, in jedes Loch vorgelegt.

- Es werden vorsichtig 0,5 µl der cDNA Template zupipettiert, welches 25 µg RNA-Äquivalente entspricht.
- Es wird eine Dreifach- oder Doppelbestimmung durchgeführt, wobei für jedes Gen auch eine Blindprobe (NTC) mit RNase-freiem Wasser statt der cDNA Template mitgeführt wird, um eine Kontamination des Master Mixes mit DNA auszuschließen.
- Die Platte wird nach dem Pipettieren mit einer Folie (Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems) verschlossen und für 5 Minuten bei 400 rpm zentrifugiert.
- Die Polymerasekettenreaktion findet im Thermocycler (Step One Plus, Real-Time PCR System, Applied Biosystem) statt, wobei folgendes Programm durchlaufen wird:

  1. Inkubation bei 95 ℃ für 15 min (HotStarTaq DNA Polymerase wird bei diesem Heizschritt aktiviert)
  2. Inkubation bei 94 ℃ für 15 s (Denaturierung)
  3. Inkubation bei 55 ℃ für 30 s (Annealing)
  4. Inkubation bei 72 ℃ für 30 s (Polymerisation)
  5. Detektion der Fluoreszenz

  39 x Wiederholen der Schritte 2-5

  Bestimmung der Schmelzkurven von 40 ℃ – 60 ℃ in S chritten von 1 ℃

Die Quantifizierung erfolgt über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. SYBR Green I binden an alle Doppelstrang-DNA-Moleküle und emittiert ein Fluoreszenzsignal bei der Bindung. Die Anregung erfolgt bei 494 nm (blau) und das Absorptionsmaximum liegt bei 521 nm (grün) [QuantiTect SYBR Green PCR Handbuch, QIAGEN].

Zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation der zu untersuchenden Sequenz wird eine Schmelzkurve gemessen, wobei bei einer spezifischen Reaktion nur ein Peak auftreten soll.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression der zu untersuchenden Gene auf ein sogenanntes „Housekeeping Gen“ (HKG) (z.B. β-Actin), das nicht reguliert ist, bezogen. Für die Berechnung werden die CT-Werte herangezogen, welche die Anzahl der Zyklen angeben, die benötigt werden, um ein konstant definiertes Fluoreszenzsignal zu erreichen. Vorteile dieser Bestimmung sind, dass Matrixeffekte oder auch Fehler bei der Reversen Transkription gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen, und so mitberücksichtigt werden. Die Berechnung

der Expressionsunterschiede erfolgt über die sogenannte ΔΔCT Methode. Im ersten Schritt wird für jede Probe die Differenz der CT-Werte (ΔCT) des zu untersuchenden Zielgenes und des Referenzgenes (HKG) gebildet. Nach dieser Normierung werden die sogenannten „delta-delta CT“ (ΔΔCT) berechnet, indem der ΔCT-Wert der Lösungsmittelkontrolle von dem ΔCT-Wert der experimentell behandelten Proben subtrahiert wird. Um den relativen Expressionsunterschied anzugeben, wird Ratio gebildet [Pfaffl, 2004].

$\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Referenzgen}$
$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{behandelte\ Probe} - \Delta CT_{Lösungsmittelkontrolle}$
$Ratio = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Bei dieser Berechnung wird eine Verdopplung der DNA in jedem Zyklus vorausgesetzt (optimale Effizienz), tatsächlich liegt die Effizienz meist bei 1,7-1,9 [Pfaffl, 2004].

6.6. Geräte

Gerät:	**Modell, Firma:**
Autoklav	Systec DX-150, Systec GmbH
Biofreezer	Vip™ Series, Sanyo
Blotter	Trans-Blot® Cell, 49 BR 3584, Bio Rad
Brenner	Fuego Basi, WLD-TEC
Brutschrank	Heracell 240 i, CO_2 Incubator, Thermo Fisher Scientific
Eismaschine	MF 46, Scotsman Frimont
Geldokumentationsgerät	LAS-4000, Luminescent Image Analyser, Fujifilm
	Software: Image Reader LAS 4000; Auswertung: Multi Gauge V3.2
Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio Rad
	Modell 45-2010-i, Peqlab Biotechnology GmbH
Handhomogenisator	Wheaton, USA
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr Comfort (4 ℃, -20 ° C)
	Liebherr
Magnetrührer	IKA® RCT basic, safety control, IKA
Mikrotiterplattenleser	Victor^{3}V 1240 Multilable Counter, Perkin Elmer
Mikroskop	Inversmikroskop Axiovert 40C, Zeiss
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
pH-Meter	Mettler Toledo Seven Easy, Mettler Toledo
Pipetten, Multipetten, Pipettus	Multipette Plus, Eppendorf
	Eppendorf Research P 2,5 –P 5000, Eppendorf
	Pipettus Akku, Hirschmann Laborgeräte
Power Station	Electrophorese Power Supply EV231, PeQlab
Pumpen	Vakuumsaugpumpe Laboport®, IBS Integra biosciences
Real-Time PCR System	Step One Plus, Real-Time PCR System, Applied Biosystem
Schüttler	Thriller, 1,5 ml, Peqlab Biotechnologies
	Überkopfschüttler Roto-Shake-Genie, Scientific Industries
	Mini Rocker, MR-1, Peqlab Biotechnologies
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Peqlab Biotechnology GmbH
Sterilbank	Hera Safe KS 18, Thermo Fischer Scientific
Thermocycler	MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cycler
Trockenschrank	Binder, ATP line™ ED (E2), Binder GmbH
Ultraviolett Sterilizing PCR Workstation	

Vortex	Bio Vortex V1, Peqlab Biotechnologies
	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Waagen	Analysenwaage New Classic MF, ML204/01, Mettler Toledo
	Analysenwaage Micro, Sartorius AG
	Grobwaage New Classic MF, ML6001/01 Mikro 200, Mettler Toledo
Wasserbad	GD 100, Grant
Zentrifuge	Tischzentrifuge, Mikro 220R, Hettich Zentrifugen
	Tischzentrifuge, Mikro 200, Hettich Zentrifugen
	Tischzentrifuge, Rotina 420R, Hettich Zentrifugen
	Tischzentrifuge, Galaxy MiniStar, VWR

6.7. Materialien

Verbrauchsmaterialien:	**Hersteller:**
Deckgläser	Menzelgläser
Eppendorfreaktionsgefäße	Sarsted AG & Co
Glaspipetten	VWR
Kulturflaschen	Sarsted AG & Co
MicroAmp®, 96-Loch, steril (PCR)	Applied Biosystems
Multipipettenaufsätze (1, 5, 10 ml)	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)	Sarsted AG & Co
Pipettenspitzen (5 ml)	VWR
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG
Petrischalen (d = 5, 10 cm)	Sarsted AG & Co
Tubes (13, 15, 50 ml)	Sarsted AG & Co
TC-Platten, 24-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH
TC-Platten, 96-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH
Whatman Nitrocellulose Transfer Membran	Pall Life Sciences
Whatman Papiere	Whatman Inc.
Zellschaber, 25 cm, steril	Sarstedt AG & Co

Chemikalien:	
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bovine Serum Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bovine Serum Albumin Standard (2mg/ml)	Thermo Scientific
Bromphenolblau, Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
n-Butanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Coomassie-Brillantblau G 250	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Essigsäure (100%)	Carl Roth GmbH & Co. KG

Ethanol p.A.	Carl Roth GmbH & Co. KG
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Merck KGaA
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumfluorid	Merck KGaA
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid	Merck KGaA
Natiumorthovanadat (NaO_3VO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Protease Inhibitor Mix	Roche
Phenylmethlsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phosphorsäure (85%)	Merk KGaA
Rotiphorese® Gel 30 (30 %wässrige Lösung Acrylamid mit 0,8 % N,N`-Methylenbisacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (37 %)	Merk KGaA
SDS Pellets	Carl Roth GmbH & Co. KG
See Bue Plus 2 Pre-stained Standard	Invitrogen
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
Sulforhodamin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N,N,N`,N´-Tetramethylendiamin(TEMED)-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris Ultra Qualitat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Western Lightning™ – ECL	Perkin Elmeyer

Testsubstanzen und Feinchemikalien:

Apfelsaftextrakt AE02	Prof. Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim
Aufgereinigte Polymerfraktion	Technische Universität Braunschweig
Chlorogensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Chlorogensäurefraktion	Technische Universität Braunschweig
Emulsionen	KIT (Karlsruher Institut für Technologie)
(-)-Epicatechin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Calbiochem
Hyperosid	Extrasynthese
Isoquercitrin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Heidelbeerextrakt	Firma Kaden, Biochemicals GmbH
Kaffeesäure	Prof. Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim
Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Phloridzin	Fluka
Procyanidinreicher Apfelsaftextrakt PAE	Prof. Raul, Université Louis-Pasteur, Straßburg
Quercitrin	Extrasynthese
Rutin	Prof. Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim
Tyrphostin AG1478	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Kits:

QuantiTect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH
QuantiTect® SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH

Antikörper:

Anti-EGFR antibody (mouse)	Santa Cruz
Anti-pEGFR antibody (goat)	Santa Cruz
Anti-ERK1/2 antibody (rabbit)	Cell Signaling Technology
Anti-pERK1/2 antibody (rabbit)	Cell Signaling Technology
Anti-α-Tubulin antibody (mouse)	Santa Cruz
Goat anti-mouse antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz
Goat anti-rabbit antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz
Mouse anti-goat antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz

QuantiTect® Primer Assays:

Cyclin D1	QIAGEN GmbH
c-fos	QIAGEN GmbH
EGFR	QIAGEN GmbH
EGF	QIAGEN GmbH
VEGFa	QIAGEN GmbH
ErbB2	QIAGEN GmbH
ErbB3	QIAGEN GmbH
β-Actin	QIAGEN GmbH

Zellkultur:

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tryphanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin	Invitrogen

7. Literaturverzeichnis

Afaq F, Zaman N, Khan N, Syed DN, Sarfaraz S, Zaid MA, Mukhtar H. **(2008)** Inhibition of epidermal growth receptor signaling pathway by delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables. *International Journal of Cancer*. 123, 1508-1515

Agullo G, Gamet L, Besson C, Demigne c, Remsy C. **(1994)** Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Letters*. 87, 55-63

Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. **(2006)** Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*. 45, 19-28

Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. **(2001)** Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 5679-5684

Arts ICW, Hollman PCH. **(2005)** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81(suppl), 317-325

Augustin HG. **(2003)** Angiogeneseforschung – Quo vadis? *Ophtamologe*. 100, 104-110

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 5496-5500

Azzini E, Bugianesi R, Romano F, Di Venere D, Miccadei S, Curazzo A, Foddai MS, Catsta G, Linsalata V, Maiani G. **(2007)** Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: a pilot study. *British Journal of Nutrition*. 97, 963-969

Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. **(2004)** Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. *Biochemistry*. 69(1), 95-102

Balmanno D, Cook SJ. **(1999)** Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, $p21^{Cip1}$ and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene*. 18, 3085-3097

Bassa BV, Noh JW, Ganji SH, Shin MK, Roh DD, Kamanna VS. **(2007)** Lysophosphatidylcholine stimulates EGF receptor activation and mesangial cell proliferation: Regulatory role of Src and PKC. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771, 1364-1371

Bazley LA, Gullick WJ. **(2005)** The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-Related Cancer*. 12, 17-27

Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, Annabi B. **(2006)** The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell International*. 6:7, 1-12

Bellion P, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C. **(2009)** Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53, 1226-1236

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J. **(2007)** Hypoxia and cancer. *Journal of Molecular Medicine*. 85, 1301-1307

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokohama S. **(2003)** An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Molecular Cell*. 12, 541-552

Carlson B, Lhusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM. **(1999)** Down-Regulation of Cyclin D1 by Transcriptional Repression in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells Induced by Flavopiridol. *Cancer Research*. 59, 4634-4641

Chen JJ, Ye ZQ, Koo MWL. **(2004)** Growth inhibition and cell cycle arrest effects of epigallocatechin gallate in the NBT-II bladder tumour cell line. *BJU International*. 93, 1082-1086

Cheynier V. **(2005)** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81(suppl), 223-229

Clifford MN. **(2000a)** Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1063-1072

Clifford MN. **(2000b)** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1033-1043

Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, Faulds CB. **(2001)** Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 873-881

Cooke D, Schwarz M, Boocock D, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. **(2006)** Effect of cyaniding-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc^{Min} mouse model of intestinal carcinogenesis – Relationship with tissue anthocyanin levels. *International Journal of Cancer*. 119, 2213-2220

D`Archivio M, Filesi C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. **(2007)** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell´Istituto Superiore di Sanità*. 43(4), 348-361

Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT. **(2002)** Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceedings of Nutrition Society*. 61, 97-103

DSMZ. http.://www.dsmz.de/. Abgerufen am 20.06.2010

Eden ER, White JJ, Tsapara A, Futter CE. **(2010)** Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B-epidermal growth factor receptor interaction. *Nature Cell Biology*. 12(3), 267-273

Farah A, Monteiro M, Donagelo CM, Lafay S. **(2008)** Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition*. 138(12), 2309-2315

Faria A, Pestana D, Teixeira D, de Freitas V, Mateus N, Calhau D. **(2010)** Blueberry Anthocyanins and Pyruvic Acid Adducts: Anticancer Properties in Breast Cancer Cell Lines. *Phytotherapy Research*. [Epub ahead of print]

Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. **(2005)** Inhibition of Activator Protein-1, NF□B, and MAPKs and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity by Chlorogenic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(30), 27888-27895

Ferguson PJ, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ. **(2004)** A Flavonoid Fraction form Cranberry extract Inhibits Proliferation of Human Tumor Cell Lines. *The Journal of Nutrition*. 134, 1529-1535

Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. **(2006)** Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*. 45(1), 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. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 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 procyandins. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 192-200

Fridrich D, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D. **(2008)** Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52, 815-822

Fritz Jessica, Dissertation. **(2008)** Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen und der DNA-Integrität durch Polyphenole aus Beerenfrüchten. TU Kaiserslautern

Fuller SJ, Sivarajah K, Sugden PH. **(2008)** ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 44, 831-854

Granado-Serrano AB, Martín MA, Izquierdo-Pulido M, Goya L, Bravo L, Ramos S. **(2007)** Molecular Mechanism of (-)-Epicatechin and Chlorogenic Acid on the Regulation of the Apoptotic and Survival/Proliferation Pathways in a Human Hepatoma Cell Line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 2020-2027

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. **(2004)** The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews*. 4, 361-370

Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R. **(1999)** Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*. 32, 345-353

Hanahan D, Weinberg RA. **(2000)** The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 100, 57-70

Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwar S, Gebhardt S. **(2006)** Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 9966-9977

Hazzalin CA, Mahadevan LC. **(2002)** MAPK-Regulated Transcription: A Continuously Variable Gene Switch? *Nature*. 3, 30-40

Henson GL, Niemeyer L, Ansong G, Forkner R, Makkar HPS, Hagerman AE. **(2004)** A Modified Method for Determining Protein Binding Capacity of Plant Polyphenolics Using Radiolabelled Protein. *Phytochemical Analysis*. 15, 159-163

Hou DX, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M. **(2004)** Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5, 321-325

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. **(2007)** The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 42(4), 377-387

Hsu CL, Huang SL, Yen GC. **(2006)** Inhibitory Effect of Phenolic Acids on the Proliferation of 3T3-L1 Praeadipocytes in Relation to Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 4191-4197

Hubbard SR, Miller WT. **(2007)** Receptor tyrosine kinases: mechanism of activation and signalling. *Current Opinion in Cell Biology*. 19, 117-123

Hur JY, Lee P, Kim H, Kang I, Lee KR, Kim SY. **(2004)** (-)-3,5-Dicaffeoyl-*muco*-quinic acid isolated from *Aster scaber* contributes to the differentiation of PC12 cells: through tyrosine kinase cascade signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313, 948-953

Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Chun HK, Chung YC, Kim SK, Kwon K, Jeong TC, Lee KY, Jeong JG. **(2010)** 3-Caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* inhibits tumor cell invasion by regulating protein kinase C-γ-dependent matrix. *Toxicology Letters*. 198(2), 200-209

Ishino Y, Zhu C, Harris DL, Joyce NC. **(2008)** Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) helps regulate EGF-induced stimulation of S-phase entry in human corneal endothelial cells. *Molecular Vision*. 14, 61-70

Ito H, Gonthier MP, Manach C, Morand C, Mennen L Rémésy C, Scalbert A. **(2005)** Polyphenol levels in human urine after intake of sex different polyphenol-rich beverages. *British Journal of Nutrition*. 94, 500-509

Iwai K, Kishimoto N, Kikino Y, Mochida K, Fujita T. **(2004)** In Vitro Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivates in Green Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4893-4898

Jin UH, Lee JY, Kang SK, Kim JK, Park WH, Kim JG, Moon SK, Kim CH. **(2005)** A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification form methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences*. 77, 2760-2769

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. **(2003)** Epidermal growth factor receptor: mechanism of activation and signalling. *Experimental Cell Research*. 284, 31-53

Kahle K, Krause M, Richling E. **(2005a)** Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49, 797-806

Kahle K, Krause M, Scheppach W, Richling E. **(2005b)** Colonic availability of apple polyphenols – A study in ileostomy subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49, 1143-1150

Kahle K, Krause 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? *Molecular Nutrition & Food Research*. 50, 418-423

Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD. **(2003)** Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in APC(Min) mice and reduce proliferation of human colon cander cells. *Cancer Letters*. 194(1), 13-19

Karin M. **(1995)** The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(28), 16483-16486

Karin M, Hunter T. **(1995)** Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology*. 5(7), 747-757

Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. **(2001)** Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 4076-4082

Kay CD, Mazza G, Holub BJ. **(2005)** Anthocyanins Exist in the Circulation Primarily as Metabolites in Adult Men. *Journal of Nutrition*. 135(11), 2582-2588

Keppler K, Humpf HU. **(2005)** Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13, 5195-5205

Kern SM, Bennett RN, Needs PW, Mellon FA, Kroon PA, Garcia-Conesa MT. **(2003)** Characterisation of Metabolites of Hydroxycinnamates in the in Vitro Model of Human Small Intestinal Epithelium Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 7884-7891

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. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49, 317-328

Kern Melanie, Dissertation. **(2006)** Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen Kolonkarzinomzellen. TU Kaiserslautern

Kern M, Fridrich D, Reichert J, Skrbek S, Nussher A, Hofem S, 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. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 1163-1172

Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. **(1998)** Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 Promotes Its Homodimerization and Nuclear Translocation. *Cell*. 93, 605-615

Kim JK, Diehl JA. **(2009)** Nuclear Cyclin D1: An Oncogenic Driver in Human Cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 220, 292-296

Kobayashi S, Shimamura T, Monti S, Steidl U, Hetherington CJ, Lowell AM, Golub T, Meyerson M, Tenen DG, Sharipo GI, Halmos B. **(2006)** Transciptional Profiling Identifies Cyclin D1 as a Critical Downstream Effector of Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Cancer Research*. 66(23), 11389-11398

Kolch W. **(2000)** Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*. 351, 289-305

Kowalczyk E, Krzesinski P, Kura M, Szmigiel B, Blaszczyk J. **(2003)** Anthocyanins in Medicin. *Polish Journal of Pharmacology*. 55, 699-702

Kuo SM. **(1996)** Antiproliferative patency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters*. 110, 41-48

Kutara R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M. **(2007)** Growth Suppression of Human Cancer Cells by Polyphenolics from Seetpotato (*Ipomoea batatas L.*) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 185-190

Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Monrad C, Besson C, Scalbert A. **(2006a)** Chlorogenic Acid Is Absorbed in Ist Intact Form in the Stomach of Rats. *American Society for Nutrition*. 96(1), 39-46

Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A. **(2006b)** Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*. 96, 39-46

Lamy S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, Lafleur R, Durocher Y, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Béliveau R. **(2006)** Delphinidin, a dietrary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*. 27(5), 989-996

Lamy S, Beaulieu D,Labbé D, Bédard V, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Béliveau R. **(2008)** Delphinidin, a dietrary anthocyanidin, inhibits plateled-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling. *Carcinogenesis*. 29(5), 1033-1041

Lapidot T, Walker MD, Kanner J. **(2002)** Can Apple Antioxidants Inhibit Tumor Cell Proliferation? Generation of H_2O_2 during Interaction of Phenolic Compounds with Cell Culture Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3156-3160

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. **(1998)** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*. 74, 49-139

Lindl T, Gstraunthaler G. **(2008)** Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank, Spektrum Akademischer Verlag, 6.Auflage

Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. **(2009)** VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. 21, 154-165

Long LH, Clement MV, Halliwell B. **(2000)** Artifacts in Cell Culture: Rapid Generation of Hydrogen Peroxide on Addition of (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechin Gallate, (+)-Catechin, and Quercetin to Commonly Used Cell Culture Media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 273, 50-53

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. **(2007)** Biochemie und Pathobiochemie, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 8.Auflage

Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. **(2009)** The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. *European Journal of Internal Medicine*. 20, 663-671

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. **(2004)** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79, 727-747

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. **(2005)** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81(suppl): 230-242

Manson MM. **(2003)** Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in Molecular Medicine*. 9(1), 11-18

Mantena KS, Baliga MS, Katiyar SK. **(2006)** Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 27(8), 1682-1691

Marais R, Marshall CJ. **(1996)** Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Journal of Cancer Survivorship*. 27, 101-125

Marko D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G. **(2004)** The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Molecular Nutrition & Food Research*. 48, 318-325

Marshall CJ. **(1995)** Specifity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Transient versus Sustained Extrazellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cell*. 80, 179-185

Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. **(2001)** Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(3), 1546-1551

Määtä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Matttila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. **(2004)** Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 44777-4486

McDougall GJ, Ross HA, Ikeji M, Stewart D. **(2008)** Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Crown in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 3016-3023

McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. **(2003)** Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolised by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 4539-4548

McGhie TK, Walton MC. **(2007)** The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 702-713

Meiers S, Kemény M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D. **(2001)** The Anthocyanidins Cyanidin and Delphinidin Are Potent Inhibitors of the Epidermal Growth-Factor Receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 958-962

Miniati E. **(2007)** Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Annali dell´Istituto Superiore di Sanità*. 43(4), 362-368

Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. **(2007)** Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *The Journal of Nutrition*. 137(10), 2196-2201

Muthusamy VS, Saravanababu C, Ramanathan M, Bharanthi Raja R, Sudhagar S, Anand S, Lakshmi BS. **(2010)** Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and regulation of insulin signalling markers by caffeoyl derivates of chicyry (*Cichorium intybus*) salad leaves. *British Journal of Nutrition*. [Epub ahead of print]

Müller-Esterl W. **(2002)** Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschafter, Spektrum Akademischer Verlag, 1.Auflage

Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. **(2002)** Absorption of Phenolic acids in Humans after Coffee Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5735-5741

Neto CC. **(2007)** Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 652-664

Neuwirth H, Arias MC, Puhr M, Hobisch A, Culig Z. **(2008)** Oligomeric Proanthocyanidin Complexes (OPC) Exert Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects on Prostate Cancer Cells. *The Prostate*. 68, 1647-1654

Nguyen TTT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. **(2004)** The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 25(5), 647-659

O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Eccles SA. **(2000)** Vascular endothelial growth factor family members are differentially regulated by c-*erb*B signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*. 18, 155-161

Oda K, Marsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. **(2005)** A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular System Biology*. 1, 2005.0010

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. **(2000)** The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*. 19(13), 3159-3167

Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD. **(2004)** Inhibition of Cancer Cell Proliferation in Vitro by Fruit and Berry Extracts and Correlations with Antioxidant Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7264-7271

Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, van Amelsvoort JMM, Katan MB. **(2003)** Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. *The Journal of Nutrition*. 133(8), 1806-1814

Österreichische Gesellschaft für Ernährung. http://www.oege.at/. Abgerufen am 24.08.2010

Östman A, Böhmer FD. **(2001)** Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends in Cell Biology*. 11(6), 258-266

Parry J, Su L, Moore J, Cheng Z, Luther M, Rao JN, Wang JY, Yu LL. **(2006)** Chemical Composition, Antioxidant Capacities, and Antiproliferative Activities of Selected Fruit Seed Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 3773-3778

Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. **(2002)** The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 296, 631-636

Pearson F, Robinson F, Gibson TB, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. **(2001)** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Review*. 22, 153-183

Petit AMV, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. **(1997)** Neutralizing Antibodies against Epidermal Growth Factor and ErbB-2/*neu* Receptor Tyrosine Kinases Down-Regulate Vascular Endothelial Growth Factor Production by Tumor Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *American Journal of Pathology*. 151(6), 1523-1530

Pfaffl MW. **(2004)** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIO Spektrum*. 92-95

QuantiTect Reverse Transcription Handbook. (2009) Qiagen

QuantiTect SYPR Green PCR Handbook. (2009) Qiagen

Rafter J, Govers M, Martel P, Pannemans D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Rowland I, Tujtelaars S, van Loo J. **(2004)**. PASSCLAIM--diet-related cancer. *European Journal of Nutrition*. 43(Suppl 2), II47-II84

Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benadetti-Pancini P, Mancoso S, Rumi C, Piantelli M. **(1992)** Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *International Journal of Cancer*. 50, 486-492

Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. **(2005)** Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 9268-9273

RNeasy Mini Handbook. (2006) Qiagen, 4.Auflage

Robinson MJ, Cobb MH. **(1997)** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 9, 180-186

Scalbert A, Williamson G. **(2000)** Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*. 130(8S Suppl), 2073S-2085S

Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. **(2002)** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 56, 276-282

Schaeffer HJ, Weber MJ. **(1999)** Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Molecular and Cellular Biology*. 19(4), 2435-2444

Schlessinger J. **(2000)** Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 103, 211-225

Schmidt BM, Howell AB, McEniry B, Knight CT, Seigler D, Erdman JW, Lila MA. **(2004)** Effective Separation of Potent Antiproliferation and Antiadhesion Components from Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 6433-6442

Schulze WX, Deng L, Mann M. **(2005)** Phosphotyrosine interactiome of the ErbB-receptor kinase family. *Molecular System Biology*. 2005.0008

Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. **(2006)** The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1766, 120-139

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 9329-9339

Seeram NP. **(2008)** Berry Fruits for Cancer Prevention: Current Status and Future Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 630-635

Shimizu K, Oku N. **(2004)** Cancer Anti-angiogenic Therapy. *Biological& Pharmaceutical Bulletin*. 27(5), 599-605

Shin SY, Rath O, Choo SM, Fee F, McFerran B, Kolch W, Cho KH. **(2009)** Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behaviour of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *Journal of Cell Science*. 122, 425-435

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. *Journal of the National Cancer Institute*. 82(13), 1107-1112

Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. **(2010)** Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Statistik **Austria**. http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/index.html. Abgerufen am 23.08.2010

Stuible M, Abella JV, Feldhammer M, Nossov M, Sangwan V, Blagoev B, Park M, Tremblay ML. **(2010)** PTP1B targets the endosomal sorting machinery: dephosphorylation of regulatory sites on the escort component STAM2. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 285(31), 23899-23907

Tal TL, Graves LM, Silbajoris R, Bromberg PA, Wu W, Samet JM. **(2006)** Inhibition of protein tyrosine phosphatase activity mediates epidermal growth factor receptor signaling in human airway epithelial cells exposed to Zn^{2+}. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 214, 16-23

Teillet F, Boumendjel A, Boutonnat J, Ronot X. **(2008)** Flavonoids as RTK Inhibitors and Potential Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*. 28(5), 715-745

Teller N, Thiele W, Marczylo TH, Gescher AJ, Boettler U, Sleeman J, Marko D. **(2009a)** Suppression of the Kinase Activity of Receptor Tyrosine kinases by Anthocyanin-Rich Mixtures Extracted from Bilberries and Grapes. *Molecular Nutrition & Food Research*. 57, 1075-1083

Teller N, Thiele W, Boettler U, Sleeman J, Marko D. **(2009b)** Delphinidin inhibits a broad spectrum of receptor tyrosine kinases of the ErbB and VEGFR family. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53, 1075-1083

Teller Nicole, Dissertation. **(2009)** Hemmprofile ausgewählter Polyphenole und polyphenolreicher Extrakte auf Kanzerogenese-assoziierte Rezeptortyrosinkinasen. Universität Karlsruhe und Universität Wien

Thomasset S, Berry DP, Cai H, West K, Marczylo TH, Marsden D, Brown K, Dennison A, Garcea G, Miller A, Hemingway D, Steward WP, Gescher AJ. **(2009)** Pilot Study of Oral anthocyanins for Colorectal Cancer Chemoprevention. *Cancer Prevention Research*. 2(7), 625-633

Tonini T, Rossi F, Claudio PP. **(2003)** Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 22, 6549-6556

Tonks NK. **(2006)** Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews*. 7, 833-846

Treisman R. **(1996)** Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinion in Cell Biology*. 8, 205-215

Tsunda T, Horio F, Osawa T. **(1999)** Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Letters*. 449(2-3), 179-182

Vitagline P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scafi L, Fogliano V. **(2007)** Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *The Journal of Nutrition*. 137, 2043-2048

Walle T. **(2004)** Absorption and Metabolism of Flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. 36(7), 829-837

Wang LS, Stoner GD. **(2008)** Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*. 269(2), 281-290

Watzl B, Briviba K, Rechkammer G. **(2002)** Anthocyane. *Ernährungs-Umschau*. 19(4), 148-150

Williams CA, Grayer RJ. **(2001)** Anthocyanins and other flavonoids. *National Product Reports*. 21, 239-573

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. **(1997)** Food Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *Nutrition*. 15(6), 523-526

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. **(2006)** Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 4068-4075

Yi W, Fischer J, Krewer G, Akoh CC. **(2005)** Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7320-7329

Yuan T, Wang Y, Zhao ZJ, Gu H. **(2010)** Protein Tyrosine Phosphatase PTPN9 Negatively Regulates ErbB2 und EGFR Signaling in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 285(20), 14861-14870

Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. **(2005)** Human tumour cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*. 76, 1465-1472

Zheng Q, Hirose Y, Yoshimi N, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi J, Sakata K, Matsumoto Y, Sayama Y, Mori H. **(2002)** Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 128, 539-546

Zhu S, Bjorge JD, Fujita DJ. **(2007)** PTP1B Contributes to the Oncogenic Properties of Colon Cancer Cells through Src activation. *Cancer Research*. 67(21), 10129-10137

8. Anhangverzeichnis

8.1.	Abstrakt der Diplomarbeit (deutsch)	1
8.2.	Abstract (English)	2
8.3.	Abbildungsverzeichnis	4
8.4.	Tabellenverzeichnis	5
8.5.	Danksagung	6
8.6.	Lebenslauf	7

8.1. Abstrakt der Diplomarbeit (deutsch)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie die Leitsubstanz Chlorogensäure, sowie chlorogensäurereiche Extrakte die Aktivität des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und nachgeschalteter Signalelemente der MAPK-Kaskade, die das Zellwachstum regulieren, modulieren. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Chlorogensäure und weiterer Extrakte auf das Zellwachstum in der humanen Kolonkrebszelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml), um eine mögliche Wasserstoffperoxidakkumulation zu verhindern, untersucht.

Ein Heidelbeerextrakt (HBE) zeigte eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der Zellproliferation sowohl in der unverkapselten, als auch in der in einer Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion verkapselten Form. Die Verkapselung führte zu einer etwa dreifach potenteren Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation. Als Leitverbindung der Extrakte wurde Chlorogensäure untersucht, die zu einem leichten Wachstumsstimulus in den höchsten getesteten Konzentrationen (23-46 µM) führte.

Zwei der Subfraktionen des HBE, der zu einer potenten Hemmung der Aktivität des EGFRs führte [unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko], wurden in der vorliegenden Arbeit auf die Modulation der Aktivität des EGFRs untersucht. Während die aufgereinigte Polymerfraktion, die hauptsächlich oligomere Procyanidine enthielt, zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der EGFR-Aktivität führte, vermittelte die Chlorogensäurefraktion eine potente Aktivierung des EGFRs. Die Einzelsubstanz Chlorogensäure führte ebenfalls zur Aktivierung des EGFRs in vergleichbaren Konzentrationen, wie die Chlorgensäurefraktion. Zusätzlich konnte die Weiterleitung des aktivierten Signals bis zu den nachgeschalteten Signalelementen ERK1/2 (Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2), die über die MAPK-Kaskade aktiviert werden, bestimmt werden. Der Mechanismus dieser Aktivierung des EGFRs ist noch unbekannt und sollte noch weiter aufgeklärt werden. In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss weiterer Verbindungen auf die Wirkung von Chlorogensäure auf die EGFR- und ERK1/2-Aktivität mittels Coinkubation untersucht. Chlorogensäure scheint sowohl als Einzelsubstanz als auch innerhalb komplexer Extrakte zu einer Aktivierung des EGFRs und der nachgeschalteten Signalelemente ERK1/2 zu führen. Zusätzlich wurde die Transkription einiger über die MAPK-Kaskade-regulierter wachstumsassoziierter Gene durch die Einzelsubstanz Chlorogensäure untersucht. Die Chlorogensäure vermittelte nach einer Inkubation von 6 h eine Veränderung auf Transkriptionsebene ausgewählter Gene. Die mRNA-Transkripte der ErbB-Rezeptoren, sowie die des Zellzyklusregulators Cyclin D1 stiegen

konzentrationsabhängig an, während die relative Transkription der Liganden EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und VEGFa (Vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor a) verringert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Chlorogensäure differenzierte Effekte auf über die MAPK-Kaskade-regulierte Gene ausüben kann.
Von Bedeutung ist, dass die in den Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen an Chlorogensäure (0,02-50 µM) in einem Konsumer-relevanten Bereich liegen. Durch den Konsum von zum Beispiel Kaffee oder Apfelsaft könnten lokal im Kolon diese Konzentrationen erreicht werden.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Leitsubstanz Chlorogensäure, die in vielen Lebensmitteln (z.B. Apfelsaft, Beeren, Kaffee) in höheren Konzentrationen vorliegt, zu einer Aktivierung des EGFRs und der nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade führt und ein leichter Wachstumsstimulus zu beobachten ist. Da diese Effekte der Chlorogensäure möglicherweise im Sinne einer chemopräventiven Wirkung nicht erwünscht sind, sollten weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Chlorogensäure durchgeführt werden.

8.2. Abstract (English)

Focus of this work was to determine the mode of action of the characteristic polyphenol compound chlorogenic acid and selected chlorogenic acid-rich extracts on the modulation of the activity of the EGFR (epidermal growth factor receptor) and downstream signalling elements of the MAPK-cascade. Moreover, modulation of cell proliferation by the respective compounds was examined in the human colon carcinoma cell line HT29 in the presence of catalase (100 U/mL) to prevent a possible hydrogen peroxide accumulation.
An uncapsulated blueberry extract (BE) as well as a water-in-oil-in-water-double-emulsion loaded with BE showed a concentration- and time-dependent inhibition of cell proliferation. The encapsulation led to a three times more pronounced inhibition of cell proliferation after 72 h incubation. Furthermore, chlorogenic acid caused a slight growth increase in the highest test concentrations (23-46 µM).
Two fractions of BE which decreased the activity of EGFR in previous examinations were analyzed in respect to their effects on the modulation of EGFR activity. The so called polymer fraction, which mainly consists of oligomeric procyanidins, led to a concentration-dependent decrease of EGFR activity. In contrast, a chlorogenic acid-rich fraction mediated a potent activation of the EGFR. The isolated substance chlorogenic also caused an activation of EGFR in comparable concentrations as the chlorogenic acid-rich fraction. Furthermore, the transmission of the activated signal to the downstream signalling elements ERK1/2 (extracellular regulated

kinases 1/2) which are activated through the MAPK-cascade was shown. The mechanism of action of this activation of the EGFR is still unknown and has to be investigated in another study. Further experiments to elucidate the effects of coincubation of further substances with chlorogenic acid on EGFR and ERK1/2 activity were performed. It could be demonstrated that chlorogenic acid can activate the EGFR and the downstream signalling elements ERK1/2 as isolated substance as well as in complex extracts. Furthermore the modulation of transcription of selected MAPK-regulated, growth-associated genes through chlorogenic acid was determined by Real time PCR. After 6 h of incubation, chlorogenic acid mediated changes in the transcription level of different genes. mRNA transcripts of the ErbB receptors, as well as the cell cycle regulator cyclin D1 were concentration-dependent increased, while the relative transcription of the ligands EGF (epidermal growth factor) and VEGFa (vascular endothelial growth factor) was decreased. This implies that chlorogenic acid mediates differentiated effects on MAPK-cascade regulated gene transcription.

Of note, the here applied concentrations of chlorogenic acid (0,02-50 µM) are in a consumer-relevant range. The tested concentrations can be locally achieved in the colon by consumption of for example coffee or apple juice.

In summary, chlorogenic acid, which is prevalent in high concentrations in our diet (for example in apple juice, berries, coffee), activated the EGFR and downstream signalling elements of the MAPK-cascade with a slight concomitant growth stimulus. While these effects of chlorogenic acid may be undesired in terms of chemoprevention further investigation to enlighten the mechanism of action should be conducted.

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: modifiziert nach Manson, 2003
Abbildung 2: selbst erstellt
Abbildung 3: modifiziert nach Bazley und Gullick, 2005
Abbildung 4: modifiziert nach Hubbart und Miller, 2000
Abbildung 5: selbst erstellt
Abbildung 6: selbst erstellt
Abbildung 7: selbst erstellt
Abbildung 8: selbst erstellt
Abbildung 9: modifiziert nach Clifford, 2000a
Abbildung 10: selbst erstellt
Abbildung 11: selbst erstellt
Abbildung 12: selbst erstellt
Abbildung 13: selbst erstellt
Abbildung 14: selbst erstellt
Abbildung 15: selbst erstellt
Abbildung 16: selbst erstellt
Abbildung 17: selbst erstellt
Abbildung 18: selbst erstellt
Abbildung 19: selbst erstellt
Abbildung 20: selbst erstellt
Abbildung 21: selbst erstellt
Abbildung 22: selbst erstellt
Abbildung 23: selbst erstellt
Abbildung 24: selbst erstellt
Abbildung 25: selbst erstellt
Abbildung 26: selbst erstellt
Abbildung 27: selbst erstellt
Abbildung 28: selbst erstellt
Abbildung 29: selbst erstellt
Abbildung 30: selbst erstellt
Abbildung 31: selbst erstellt
Abbildung 32: selbst erstellt
Abbildung 33: selbst erstellt
Abbildung 34: selbst erstellt
Abbildung 35: selbst erstellt
Abbildung 36: selbst erstellt
Abbildung 37: Lindl und Gstraunthaler, 2008
Abbildung 38: selbst erstellt
Abbildung 39: selbst erstellt
Abbildung 40: selbst erstellt
Abbildung 41: http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1495
Abbildung 42: modifiziert nach RNeasy Mini Handbuch, QUIAGEN
Abbildung 43: modifiziert nach QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QUIAGEN
Abbildung 44: modifiziert nach QuantiTect Reverse Transcription Handbuch, QUIAGEN
Abbildung 45: Löffler et al., 2007

8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: modifiziert nach Manach et al., 2004
Tabelle 2: selbst erstellt
Tabelle 3: selbst erstellt
Tabelle 4: selbst erstellt
Tabelle 5: selbst erstellt
Tabelle 6: selbst erstellt
Tabelle 7: selbst erstellt

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

8.5. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

- Prof. Marko für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie die Betreuung.
- Nicole für die Betreuung und Korrektur meiner Arbeit. Danke für das gute Zureden und die konstruktiven Diskussionen.
- Prof. Dirsch und ihrem Arbeitskreis für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der PTP1B-Aktivität.
- Dem gesamten Arbeitskreis für die gute Atmosphäre beim Arbeiten.
- Meiner Familie für die Unterstützung.
- Meinem Freund Bernhard für die Geduld mit mir und die aufmunternden Worte.

8.6. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Christine Krumböck
Wohnort:	Blumengasse 5
	3143 Pyhra
Geburtsdatum:	1. Mai 1987
Geburtsort:	St. Pölten
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	ledig
Religionsbekenntnis:	römisch-katholisch

Schulbildung:

09/1992 – 06/1997	Volksschule Pyhra
	Wiedener Straße 9, 3143 Pyhra
09/1997 – 06/2001	Hauptschule Pyhra
	Hauptstraße 15, 3143 Pyhra
09/2001 – 06/2005	BRG/BORG mit naturwissenschaftlichem Schwerpunkt
	Schulring 16, 3101 St. Pölten
20.06.2005	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/2005-09/2010	Diplomstudium Chemie an der Universität Wien
	Dr. Karl Lueger Ring 1, 1010 Wien
24.10.2008	Abschluss des ersten Abschnitts
02/2010-09/2010	Diplomarbeit an der Universität Wien am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie mit dem Thema „Modulation des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalelemente durch chlorogensäurereiche Extrakte und ausgewählte Inhaltsstoffe“