

Antioxidative Wirkung und Hemmung des EGFR durch Apfelinhaltsstoffe

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von

**Matthias Roth
aus Flein**

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Doris Marko
Korreferent: Prof. Dr. Manfred Metzler
Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2010

Für Sabine und Moritz

Der Gordische Knoten war in Wirklichkeit
ein Apfel

[Matthias Roth]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	3
2.1.1	Struktur und Aufbau des EGFR	4
2.1.2	Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung	6
2.1.3	Nachgeschaltete Signalwege	9
2.1.4	Hemmstoffe	11
2.1.5	Überexpression des EGFR bei Krebs	12
2.2	Oxidativer Stress	14
2.2.1	Redox-Cycling und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	15
2.2.2	Nrf2/ARE – Signalweg	17
2.2.3	Glutathion	24
2.2.4	γ -Glutamylcysteinyligase	25
2.3	Polyphenole	27
2.3.1	Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate	27
2.3.2	Flavonoide	28
2.3.3	Gesundheitsfördernde Wirkung von Apfelphenolen	36
2.3.4	Polyphenolreiche Apfeltresterextrakte	38
3	Problemstellung	40
4	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1	Zytotoxische und wachstumshemmende Eigenschaften von polyphenolhaltigen Extrakten	42
4.1.1	Kurzzeit-Zytotoxizität	42
4.1.2	Zytotoxische Effekte von Apfeltresterextrakten	45
4.1.3	Wachstumshemmende Eigenschaften von Apfeltresterextrakten	49
4.1.4	Diskussion Zytotoxizität und Wachstumshemmung	53
4.2	Modulation der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors durch Apfelpolyphenole	59
4.2.1	Apfelsaftextrakte	60
4.2.2	Reinsubstanzen und Extrakt-Fractionen	69
4.2.3	Apfeltresterextrakte	85
4.2.4	Diskussion zur Modulation der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors durch Apfelpolyphenole	92
4.3	Zelluläre Wirkung von Apfeltresterextrakten	103
4.3.1	Bildung von Wasserstoffperoxid unter Zellkulturbedingungen	105
4.3.2	Modulation des endogenen Redoxstatus	107
4.3.3	Modulation des zellulären Menadion-induzierten ROS-Status	108
4.3.4	Untersuchungen zur DNA-protektiven Wirkung von Apfeltresterextrakten	111
4.3.5	DNA-schädigende Wirkung	117
4.3.6	Translokation von Nrf2	119
4.3.7	Induktion der γ -Glutamylcysteinyl-Ligase (γ -GCL)	124
4.3.8	Modulation des Gesamtglutathiongehaltes	126
4.3.9	Diskussion zur zellulären Wirkung von Apfeltresterextrakten	128
5	Zusammenfassung	140

Inhaltsverzeichnis

6	Material und Methoden	144
6.1	Chemikalien und Geräteliste	144
6.1.1	Chemikalien	144
6.1.2	Eingesetzte Substanzen	145
6.1.3	Antikörper	146
6.1.4	Geräte	146
6.2	Zellkultur	147
6.2.1	Zelllinien	147
6.2.2	Medien und Lösungen	148
6.2.3	Passagieren der Zellen	148
6.2.4	Bestimmung der Zellzahl	149
6.2.5	Einfrieren und in Kultur nehmen von Zellstocks	150
6.2.6	Mycoplasmentest	151
6.3	Isolierung des EGFR	152
6.3.1	Kultivierung der Zellen	152
6.3.2	Isolierung des EGFR	152
6.3.3	Aufreinigung des EGFR	154
6.3.4	Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Substrat	155
6.3.5	Testung der einzelnen EGFR Fraktionen auf ihre PTK-Aktivität	156
6.4	Bestimmung der Proteintyrosinkinaseaktivität mittels ELISA	157
6.5	Western Blot Analyse	161
6.5.1	Probenvorbereitung und Substanzinkubation	161
6.5.2	Gewinnung der Proteine	161
6.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford	163
6.5.4	Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE	164
6.5.5	Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran	168
6.5.6	Immunologische Detektion	170
6.5.7	Untersuchung des Transkriptionsfaktors Nrf2 mittels Western Blot Analyse	172
6.6	Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Assay	174
6.7	Sulforhodamin B-Assay	176
6.8	Dichlorofluorescein (DCF)-Assay	178
6.9	Glutathionbestimmung	181
6.10	Real Time PCR	188
6.11	Comet Assay	195
6.12	Trypanblau-Auszählung	202
6.13	<i>In vitro</i> Fermentation	202
7	Literaturverzeichnis	206
8	Anhang	221

Abkürzungsverzeichnis

2-VP	2-Vinylpyrimidin
A431	humane Vulvakarzinomzelllinie
Abb.	Abbildung
ACF	aberrant Crypt Foci
AE02	polyphenolreicher Apfelsaftextrakt
AE03B	polyphenolreicher Maischeextrakt
AG1478	spezifischer EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	antioxidativ responsive Element
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	Familie pro- bzw. antiapoptotischer Proteine
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	“basic leucine zipper”
CaCo-2	humane Kolonkarzinomzelllinie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„complementary DNA”
COMT	Catechol-O-methyltransferase
DCF	2', 7'-Dichlorfluorescein
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorfluorescein-Diacetat
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Medium”
DMH	Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	5, 5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	Ethylenglykolesigsäure
EIk-1	Transkriptionsfaktor Ets-like kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fetales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	„green fluorescent protein“
GPX	Glutathionperoxidase

Abkürzungsverzeichnis

GR	Glutathionreduktase
Grb2	Adapterprotein „growth factor receptor-bound protein 2“
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HO1	Hämoxygenase 1
HR	homologe Rekombination
HRP	„Horseradish“ Peroxidase
HT29	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie
IC ₅₀	„inhibitory concentration“
JNK/SAPK	c-Jun-N-terminale Kinase, stress-induzierbare MAPK
kDa	Kilo Dalton, Molekülmasse
Keap1	„Kelch-like ECH-associated protein 1“
KG	Körpergewicht
LMA	„low melting Agarose“
Lys	Lysin
mA	Milliampère
MAPK	mitogen aktivierbare Proteinkinase
MAPKAP-K / p90rsk	MAPK-aktivierte Kinase
MAPKK	mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase
MAPKKK	mitogen aktivierbare Proteinkinase Kinase Kinase
MEK1/2	MAPKK/ERK-Kinasen
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Mauslymphomzellen
mM	Millimolar
mTor	mammalien Target of Rapamycin
Na ⁺	Natrium
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NMA	„normal melting Agarose“
NQO1	NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase 1
Nrf2	„nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“
OT	Objektträger
P/S	Penicillin / Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PK	Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL	Polymerase
PTK	Proteintyrosinkinase
Que	Quercetin
Raf	Ser/Thr-Kinase
Ras	Onkogen, GTP-abhängiges Schalterelement
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rT	relative Transkription
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reversen Transkription PCR
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH1	zentrale Tyrosinkinasedomäne; Src-homologe Domäne 1
SOD	Superoxiddismutase
Sos	GDP/GTP-Austauschfaktor „son of sevenless“
SRB	Sulforhodamin B
SSS	Sulfosalicylsäure
T/C	„test / control“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tBHQ	<i>tert</i> -Butylhydrochinon
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
tGSH	„total“ Glutathion
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuronyltransferase
UGT	UDP-Glukuronyltransferase
UV	Ultraviolett
VEGFa-d	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor a-d
VEGFR2, 3	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2, 3
Y, Tyr	Tyrosinrest
γ-GCL	γ-Glutamylcysteinyligase
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 Einleitung

In den westlichen Industrieländern stellen Tumorerkrankungen neben Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems eine der häufigsten Todesursachen dar. Bei Krebserkrankungen liegen insbesondere Tumore des Dick- und Mastdarmes in den Statistiken sowohl bei Männern, als auch bei Frauen mit an vorderster Stelle [Statistiken Robert-Koch-Institut 2003; „Harvard Reports on Cancer Prevention“, 1996]. Hierfür werden besonders, neben genetischer Disposition, die ungünstigen Ernährungsgewohnheiten der westlichen Welt verantwortlich gemacht, die sich durch fette, ballaststoffarme Ernährung auszeichnen. Hinzu kommt noch der Konsum von Genussgiften, wie Alkohol und Zigaretten, deren Abbauprodukte und Toxine ebenfalls auf den gesamten Gastrointestinaltrakt eine schädliche Wirkung entfalten können.

Dem gegenüber wird der Verzehr pflanzlicher Lebensmittel und daraus hergestellter Produkte, wie z. B. Fruchtsäften, mit gesundheitlich positiven Effekten verbunden. So hat sich im Volksmund bereits früh der Spruch „An apple a day, keeps the doctor away“ herausgebildet. Wobei dieser Spruch sich ursprünglich auf den hohen Vitamingehalt bezog und mehr einen Schutz vor Infektionskrankheiten meinte, als die möglichen chemopräventiven Eigenschaften durch die als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe enthaltenen Polyphenole. Von einheimischen Früchten nimmt insbesondere der Apfel eine herausragende Rolle ein. So konsumiert der deutsche Durchschnittsverbraucher im Jahr ungefähr 40 Liter Fruchtsaft, wovon etwa 10 Liter allein auf Apfelsäfte entfallen. Im Jahr 2005 wurden ca. 1,33 Mio. Tonnen Äpfel geerntet und 405 Mio. Liter Apfelsaft produziert [VDF, 2006]. Somit stellen Äpfel und daraus hergestellte Produkte auch einen bedeutenden Wirtschaftsfaktor dar.

Da durch entsprechende Aufklärungskampagnen das Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung zugenommen hat und demzufolge auch eine zunehmende Sensibilisierung für eine gesundheitsbewusste Ernährung stattgefunden hat, reagiert der Lebensmittelsektor darauf mit einem steigenden Angebot an „funktionellen Lebensmitteln“, die mit pflanzlichen Extrakten und Einzelkomponenten angereichert sind und entsprechend der „Health Claims“ Verordnung eine gesundheitsfördernde Wirkung aufweisen sollen.

Dementsprechend ist auch in der Forschung das Interesse an der Identifizierung von chemopräventiven Inhaltsstoffen aus Obst und Gemüse gestiegen. Hier stehen polyphenolische Substanzen im Fokus der Forschung, die aufgrund ihrer Struktur einerseits als direkte Radikalfänger fungieren, als auch über Signalkaskaden intrazelluläre Abwehrmechanismen gegenüber freien Sauerstoffradikalen aktivieren können. Zudem konnten antiproliferative Effekte von Apfelpolyphenolen an Tumorzellen nachgewiesen werden [Fridrich et al., 2007a; Gossé et al., 2005; Kern et al., 2005].

Während der Tumorbildung kommt es häufig zu Veränderungen von Schlüsselementen zellulärer Signaltransduktionskaskaden wie der mitogenaktivierten Proteinkinasekaskade (MAPK), zu deren Beginn der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) steht, der über nachgeschaltete Signalkettenelemente zur Regulation von Zellwachstum und Differenzierung führt. Da komplexe Apfelextrakte in der Lage sind die Aktivität des EGFR zu potent hemmen, soll diese Arbeit im Weiteren dazu beitragen, relevante Inhaltsstoffe, die für diese potente Hemmwirkung verantwortlich sind, zu identifizieren.

Ferner sollte überprüft werden, inwieweit Polyphenole aus industriellen Prozessen, die bei der Pektingewinnung aus Apfeltrestern anfallen, antioxidative und DNA-protektive Eigenschaften besitzen und dadurch die Grundlagen für einen möglichen Einsatz als chemopräventiver Zusatz in funktionellen Lebensmitteln liefern.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Eukaryotische Zellen sind in der Lage über verschiedene Wege Informationen auszutauschen, wobei entsprechende Signalmoleküle und Botenstoffe, wie Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Cytokine zum Einsatz kommen. Das Ziel dieser Moleküle sind Rezeptorproteine, die entweder intrazellulär oder als Transmembranproteine vorliegen. Letztere sind in der Plasmamembran verankert und leiten das extrazelluläre Signal ins Zellinnere weiter. Ein wichtiger Vertreter aus dieser Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor („epidermal growth factor receptor“, EGFR). Der EGFR spielt eine wichtige Rolle für zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Adhäsion, Differenzierung, Migration und Apoptose [Yarden und Sliwkowski, 2001; Wells, 1999]. Daher findet sich auch in vielen Tumoren eine durch Mutation verursachte Überexpression des Rezeptors, was zu einem erhöhten Wachstumsstimulus führt. Diese charakteristische Veränderung der Rezeptordichte wird bei diesen Tumoren auch für entsprechende therapeutische Ansätze zur Krebsbekämpfung genutzt [Steeghs et al., 2007; Thiel und Rössler, 2005; de Larco und Todaro, 1978].

Die Familie der Erb-Rezeptoren umfasst 4 strukturverwandte, aber funktionell unterschiedliche Rezeptortyrosinkinasen. Dazu gehören der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB1 (Her1), ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4). Die Abkürzung Her steht für „human epidermal growth factor receptor“ und ErbB leitet sich vom viralen Homolog v-erbB ab. Sie werden zum Typ 1 der RTK gezählt [Prenzel, 2001]. Der EGFR wurde erstmals von Carpenter et al. [1987] beschrieben und wird von einem einzelnen Gen kodiert, welches auf dem Chromosom 7p11-13 lokalisiert ist und aus 26 Exons besteht [Merlino, 1985; Wells, 1999].

2.1.1 Struktur und Aufbau des EGFR

Der EGFR ist ein 170 kDa großes Glykoprotein, das wie alle membranständigen Rezeptortyrosinkinasen, aus einer glykosylierten extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembranhelix, sowie einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne besteht (siehe Abb. 2.1). Im inaktiven Zustand liegt der EGFR als Monomer in der Zellmembran vor. Nach der Bindung eines entsprechenden Liganden an die extrazelluläre Bindungsstelle des Rezeptors erfolgt eine Homo- oder Heterodimerisierung, sowie die Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität, die wiederum zur Autophosphorylierung des Rezeptors an den Tyrosinresten führt und in Folge zur Phosphorylierung weiterer Zielmoleküle der Signalkaskade. Die Struktur des EGFR ist aus insgesamt 1186 Aminosäuren aufgebaut [Bazley und Gullick, 2005; Thiel und Rössler, 2005].

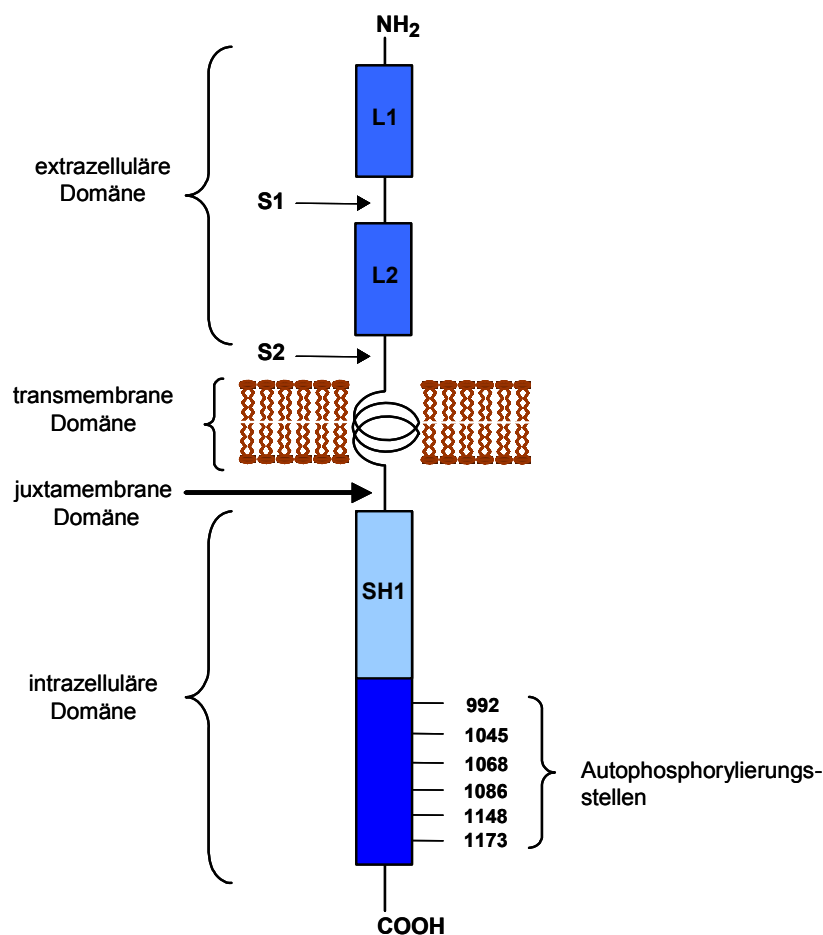


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau des EGFR [modifiziert nach Bazley und Gullick, 2005]. L1, L2: Ligandenbindungsstellen; S1, S2: cysteinreiche Domänen; SH1: Tyrosinkinase Domäne.

Der EGFR weist den für RTKs charakteristischen Aufbau einer extrazellulären Domäne auf, die 622 Aminosäuren umfasst und in vier Subdomänen unterteilt werden kann: die Ligandenbindungsstellen (L1, L2), sowie die zwei cysteinreichen Subdomänen (S1, S2), welche untereinander jeweils eine hohe Sequenzhomologie aufweisen [Sebastian et al., 2006; Bazley und Gullik, 2005; Jorissen et al., 2003]. Innerhalb der Subdomäne S1 kommt es bei der Homo- oder Heterodimerisierung zum Kontakt der Rezeptoren [Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002].

Die Plasmamembran wird von der α -helikalen transmembranen Domäne durchspannt, die eine Größe von 22 Aminosäuren besitzt. Die daran anschließende, 542 Aminosäuren große intrazelluläre Domäne kann wie folgt in drei Regionen unterteilt werden:

- die juxtamembrane Region (ca. 50 Aminosäuren), die sich direkt an den transmembranen Teil anschließt und regulatorische Funktionen wie die ligandenabhängige Internalisierung besitzt [Fuller et al., 2008; Jorissen et al., 2003].
- die Tyrosinkinasedomäne (ca. 250 Aminosäuren), die den Transfer einer γ -Phosphatgruppe eines Adenosintriphosphats (ATP) auf eine Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes katalysiert [Jorissen et al., 2003; Wells, 1999]
- das nicht katalytische carboxyterminale Ende (229 Aminosäuren), das sechs spezifische tyrosinhaltige Aminosäuresequenzen aufweist, an denen nach erfolgter Autophosphorylierung die Bindung von Adapterproteinen stattfinden kann [Fuller et al., 2008 ; Wells, 1999]

Die weiteren Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie besitzen denselben schematischen Aufbau, wobei sie eine hohe Homologie innerhalb der Kinasedomäne aufweisen (59-81 %), aber die carboxyterminale Domäne stärker divergiert (Homologie 11-30 %), was auf die Autophosphorylierungsstellen zurückzuführen ist, da diese für jeden ErbB-Rezeptor spezifisch sind [Jorissen et al., 2003; Wells, 1999].

2.1.2 Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung

Die Signalweiterleitung durch den EGFR wird durch die Bindung spezifischer Liganden reguliert, bei denen es sich um Typ I Transmembranproteine handelt, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und mittels proteolytischer Abspaltung durch Zelloberflächenproteasen freigesetzt werden können [Higashiyama et al., 2008; Harris et al., 2003; Yarden und Sliwkowski, 2001]. Den 12 bisher identifizierten ErbB-spezifischen Liganden ist eine Konsensussequenz gemeinsam, die so genannte EGF-„like“-Domäne. Sie ist durch eine 45 bis 55 Aminosäuren lange Sequenz charakterisiert, die hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen besteht und essentiell für die Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor ist [Nautiyal et al., 2006; Harris et al., 2003]. Innerhalb dieser Domäne befinden sich sechs homologe Cysteinreste, die drei intramolekulare Disulfidbrückenbindungen ausbilden [Sebastian et al., 2006; Yarden und Sliwkowski, 2001].

Die Liganden verfügen über spezifische Bindungsaffinitäten zur EGF-„like“-Domäne und werden daraus folgend in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt [Fuller et al., 2008; Wieduwilt und Moasser, 2008; Olayioye et al., 2000].

- EGF, Amphiregulin, Epigen und TGF- α , spezifisch für den EGFR
- Betacellulin, Epiregulin und der heparinbindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor HB-EGF, spezifisch für EGFR und ErbB4-Rezeptor
- Neureguline oder auch Hereguline, spezifisch für ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren oder nur für den ErbB4-Rezeptor

In Abwesenheit von Liganden ist der Rezeptor inaktiv und liegt monomer in der Plasmamembran vor (siehe Abb. 2.2). Bindet ein spezifischer Ligand an den Rezeptor, so kommt es zwischen der cysteinreichen S1-Subdomäne des Rezeptors durch Interaktion mit der S1-Subdomäne des zweiten Rezeptors zur Dimerisierung. Die Aktivierung des EGFR kann sowohl mit einem weiteren EGFR (Homodimerisierung), als auch mit anderen ErbB-Rezeptoren erfolgen (Heterodimerisierung) [Yarden und Sliwkowski, 2001; Wells, 1999]. Aufgrund der Heterodimerisierung ist die Dimerisierungsschleife der Subdomäne S1 auch bei allen ErbB-Rezeptoren homolog [Ogiso et al, 2002]. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor geschieht schnell, so dass nach 5-10 min die Rezeptoren auf der Zelloberfläche abgesättigt sind [Carpenter, 1987].

Die extrazelluläre Domäne besitzt in der monomeren Form eine autoinhibierende Konformation. Hierbei liegt eine intramolekulare Bindung zwischen der Dimerisierungsschleife der Subdomäne S1 und S2 vor. Nach der Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne des Rezeptors, was infolge zu einer Freilegung der Dimerisierungsschleife führt und es zur Rezeptordimerisierung kommt. Diese Dimerisierungsschleife stellt den engsten Kontakt zwischen den dimerisierenden Rezeptoren dar [Dawson et al., 2005; Jorissen et al., 2003; Ogiso et al., 2002], wobei van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung des Dimers beitragen [Bazley und Gullick, 2005].

Für den ErbB2-Rezeptor wurde bisher noch kein nativer Ligand gefunden und da er eine ligandenunabhängige Aktivität aufweist wird eine konstitutive Aktivierung postuliert. Möglich wäre dies, wenn die extrazelluläre Domäne eine Konformation besitzt, in der die Dimerisierungsschleife permanent exponiert wäre [Wieduwilt und Moasser, 2008; Half et al, 2004; Olayioye et al., 2000].

Allgemein werden von den ErbB-Rezeptoren Heterodimere bevorzugt, da sie potentere Signale erzeugen, als Homodimere. Bevorzugt wurde die Dimerisierung des EGFR mit den Rezeptoren ErbB2 und ErbB3 beobachtet [Citri und Yarden, 2006;

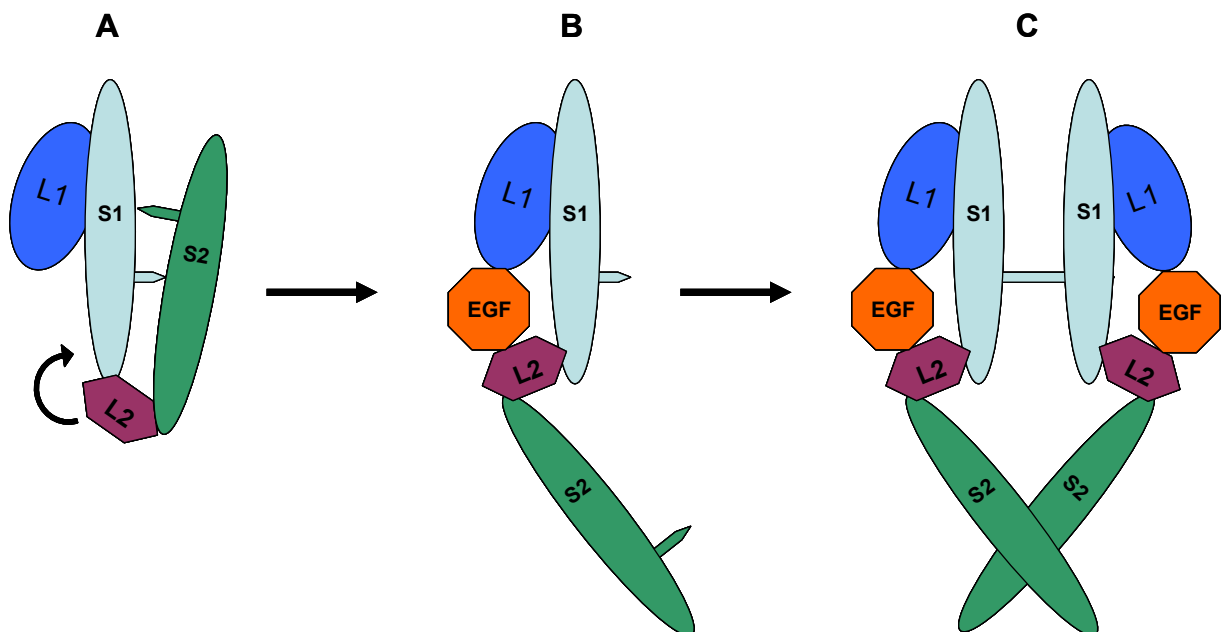


Abb. 2.2: Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des EGFRs nach Ligandenbindung [modifiziert nach Dawson et al., 2005]. A) monomere autoinhibierte Form des Rezeptors; B) ligandengebundener Zustand des Rezeptors; C) dimerisierter Rezeptorkomplex. EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; L1, L2: Ligandenbindungsdomänen; S1, S2: cysteinreiche Subdomänen.

Yarden und Sliwkowski, 2001]. Wobei der Dimerisierungspartner von der Art des Liganden abhängig ist. Unter dem Einfluss von EGF erfolgt eine Dimerisierung mit dem ErbB2-Rezeptor, mit Neuregulinen dagegen eine Dimerisierung mit dem ErbB3-Rezeptoren [Pinkas-Kramarski et al., 1998, 1996].

Nach der Ligandenbindung und der Rezeptordimerisierung erfolgt die Aktivierung der Kinasedomäne. Der Mechanismus, der der Aktivierung zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt und wird daher kontrovers diskutiert.

In Kristallstrukturanalysen konnte keine Konformationsänderung der katalytischen Tyrosinkinasedomäne nach Ligandenbindung festgestellt werden, wobei diese der inaktiven Form der cyclinabhängigen Kinase 2 und der Src (humanes Homolog des Rous-Sarcoma-Virusonkogens) Kinasen gleicht [Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2006; Stamos et al., 2002]. Es wird angenommen, dass ein allosterischer Aktivator des einen Rezeptors die Tyrosinkinase des zweiten Rezeptors im Dimer aktiviert [Zhang et al., 2006]. Dies ist aber nur über ein asymmetrisches Dimer möglich, bei dem das C-terminale Ende der Kinasedomäne eines Rezeptors in Kontakt mit der N-terminalen Schleife der Kinasedomäne des zweiten Rezeptors kommt [Zhang et al., 2006]. In Folge kommt es zur Autophosphorylierung, bei der 3-6 spezifische Tyrosinreste (Tyr992, Tyr1045, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148, Tyr1173) innerhalb der Aktivierungsschleife der zytoplasmatischen Domäne des Dimerisierungspartners phosphoryliert werden, wobei die Autophosphorylierung eigentlich eine Transphosphorylierung darstellt [Bazley und Gullick, 2005; Yarden und Sliwkowski, 2001]. Infolge der Transphosphorylierung verbessert eine Konformationsänderung der Tyrosinkinasedomäne die intrinsische Phosphotyrosinkinase (PTK)-Aktivität. Gleichzeitig wird der Zugang von Substratmolekülen, wie ATP, zum katalytischen Zentrum der PTK verbessert [Jorissen et al. 2003; Schlessinger, 2000]. Die phosphorylierten Tyrosinreste stellen hierbei die Bindungsstellen für Adapterproteine dar, die das vom Rezeptor empfangene extrazelluläre Signal intrazellulär weiterleiten [Bazley und Gullick, 2005].

Nach neueren Untersuchungen wird auch ein Einfluss der juxtamembranen Domäne auf die Aktivierung der PTK diskutiert, wobei die Steuerung über den Einfluss auf die Konformation der transmembranen und extrazellulären Domäne angenommen wird [Jura et al., 2009].

2.1.3 Nachgeschaltete Signalwege

Für die Weiterleitung und Verstärkung extrazellulärer Signale sind in der Zelle verschiedene Signalkaskaden verantwortlich, wobei die Signaltransduktion sehr komplex ist und es zu sogenannten „Crosstalks“ mit Signalwegen anderer Rezeptoren kommen kann. Die Signalkaskaden, die mit Hilfe der ErbB-Rezeptoren aktiviert werden, sind die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Kaskade und die Phospholipase C- γ (PLC γ). Die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade kann in zwei Module unterteilt werden, die sich durch ihre Aktivierung unterscheiden. Das eine Modul wird durch Wachstumsfaktoren (mitogen) aktiviert, das andere Modul durch Stress, Zytokine oder Zell-Zell-Interaktionen, wobei die beiden Module in ihrem prinzipiellen Aufbau identisch sind [Djahansouzi et al., 2004]. Auf die stressinduzierte MAPK-Kaskade wird im Folgenden nicht näher eingegangen, da im Rahmen dieser Arbeit nur die Modulation des mitogen aktivierten Moduls durch Apfelpolyphenole untersucht wurde.

Das potenteste EGF-induzierte Signal innerhalb der ErbB-Rezeptoren wird über das Homodimer EGFR-EGFR oder über das Heterodimer EGFR-ErbB2 entlang der MAPK-Kaskade vermittelt [Bazley und Gullick, 2005]. Die MAPK-Signaltransduktion besteht aus einer Kaskade von Proteinphosphorylierungen, die die drei entscheidenden Kinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2 einschließt (siehe Abb. 2.3). Durch die Kinasen wird das extrazelluläre Signal vom Rezeptor in den Zellkern weitergeleitet, wo es zur Modulation der Expression spezifischer Zielgene kommt.

Nach Aktivierung des Rezeptors durch Transphosphorylierung erfolgt die Bindung von Adapterproteinen, die über eine entsprechende SH2-Domäne verfügen und an die phosphorylierten Tyrosinreste binden. Eines dieser Adapterproteine ist Grb2 („growth factor receptor bound protein 2“) [Thiel und Rössler, 2005]. Dieses vermittelt dabei die Translokation des GDP/GTP-Austauschfaktors Sos („son of sevenless“), der GDP gegen GTP austauscht und damit das GTP bindende, membranassoziierte Protein Ras („rat sarcoma“) in seine aktive Form überführt [Hilger et al., 2002]. Das G-Protein Ras bindet anschließend mit hoher Affinität an die Serin-/Threoninkinase Raf („rapidly growing fibrosarcomas“) und bewirkt ihre Translokation zur Zellmembran, wo Raf über eine Proteinkinase aktiviert wird [Moodie und Wolfman, 1994].

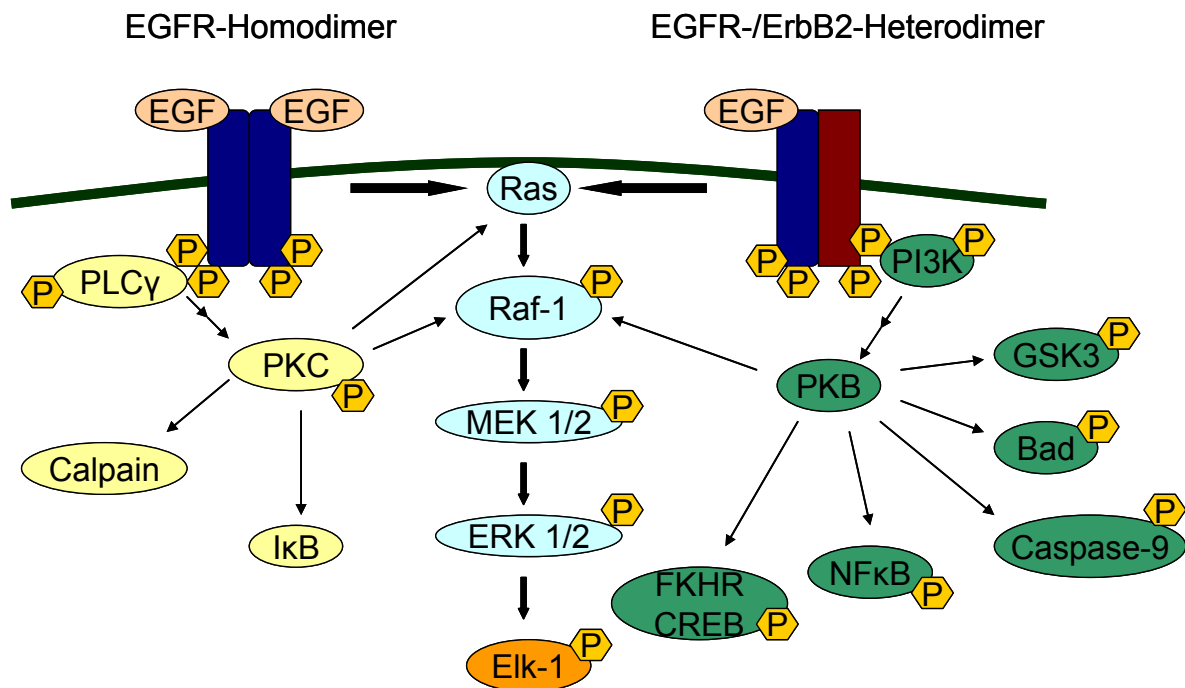


Abb. 2.3: ErbB-Rezeptor vermittelte Signalwege bzw. „Crosstalks“ der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade: Calpain, calciumabhängige Kinase; EGF, Epidermaler Wachstumsfaktor; Elk-1, Transkriptionsfaktor („Ets like“ Kinase); ERK1/2, extrazellulär regulierte Kinasen; IκB, Transkriptionsfaktorinhibitor; MEK1/2, MAPKKinase; PI3K, Phosphoinositol-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PLCγ, Phospholipase Cγ; PTK, Proteintyrosinkinase; Raf-1, Serin-/Threoninkinase; Ras, GTP bindendes Protein.

Von Raf sind bislang drei Isoformen bekannt (Raf-1, A-Raf und B-Raf), die alle drei in der Lage sind durch Phosphorylierung die MAPK-Kinase-Kinasen MEK1 und MEK2 zu aktivieren [Schaeffer und Weber, 1999]. MEK1/2 aktivieren durch Phosphorylierung der Aminosäuren Tyrosin und Threonin des Tyrosin-Glutaminsäure-Threonin Motivs die extrazellulär regulierten Serin/Threonin-Kinasen ERK1/2 („extracellular signalregulated kinase“), auch MAPK genannt [Chen et al., 1992].

Aktiviertes ERK1/2 kann nun zytosolische und nukleäre Substrate aktivieren. Erfolgt die Translokation in den Zellkern (siehe Abb. 2.3), so kann der Transkriptionsfaktor Elk1 („ets like kinase“) phosphoryliert werden, wodurch dieser aktiviert wird und an die Promotorregion seiner Zielgene binden kann.

Dies führt zur Transkription verschiedener Zielgene, wie z.B. den Onkogenen c-fos und c-myc, die Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation der Zelle nehmen können [Roux und Blenis, 2004; Wang und Prywes, 2000; Wilkinson und Millar, 2000].

2.1.4 Hemmstoffe

Da der EGFR und seine Liganden großen Einfluss auf die Tumorentwicklung und die Entstehung von Therapieresistenzen haben, ist es das naheliegendste die Aktivität des Rezeptors selbst oder der nachgeschalteten Signalkaskaden zu unterdrücken, um Proliferation und Vitalität der Tumorzellen zu reduzieren. Dazu wurden bereits Strategien entwickelt:

- Monoklonale Antikörper, Blockierung der Ligandenbindungsdomäne (z. B. C225/Cetuximab, Erbitux[®]) [Cunningham et al., 2004].
- Inhibitoren der intrinsischen PTK-Aktivität (z.B. Tyrphostin AG1478, Gefitinib/Iressa[®]) [Osherov et al., 1993].
- Antikörper-basierende Immunkonjugate, wie z.B. Immuntoxine, die ein Konjugat aus Ligand und Toxin sind. Nach Bindung an den Rezeptor und anschließender Endozytose wird das Toxin freigesetzt und die Zelle stirbt ab [Mamot et al, 2003].

Immunkonjugate sind noch nicht als Medikament zugelassen, wohingegen monoklonale Antikörper und Inhibitoren der PTK-Aktivität bereits als Therapeutikum für die Behandlung von geeigneten Tumoren mit EGF-Anomalien zugelassen sind. Die Anwendung von Antikörpern ist jedoch bei Tumoren des zentralen Nervensystems, wie z. B. bei Glioblastomen problematisch, da die großen monoklonalen Antikörper die Blut-Hirnschranke schlecht überwinden können. Problematisch ist ebenfalls die Anwendung bei mutierten Rezeptoren, da hier durch Veränderungen des Epitops, wie bei der mutierten Form des EGFR (EGFRvIII), die erfolgreiche Bindung des Antikörpers verhindert wird [Huang et al., 1997].

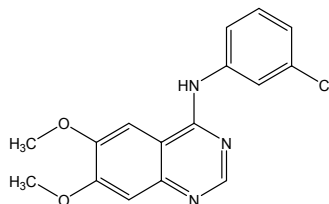


Abb. 2.4: Struktur des spezifischen EGFR Inhibitors Tyrphostin AG1478 [Levitski, 1999].

Die PTK-Inhibitoren hemmen über die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne den EGFR. Wirkmechanistisch relevant ist dabei die strukturelle Ähnlichkeit mit ATP, die eine kompetitive Hemmung der Tyrosinkinase bewirkt. Ein spezifischer und hochpotenter PTK-Inhibitor ist Tyrphostin AG1478 (4-(3-Chloroanillino)-6,7-dimethoxyquinazolin), siehe Abb. 2.4, mit einem IC₅₀-Wert von 3 nM (isolierter EGFR) [Levitzki und Gazit, 1995; Osheroov und Levitski, 1994; Osheroov et al., 1993]. Die PTK-Inhibitoren können nicht nur das Zellwachstum des Tumors hemmen, sondern auch *in vitro* Tumorzellen gegenüber der Induktion von Apoptose sensibilisieren und somit neue Ansatzpunkte bei strahlen- und zytostatikaresistenten Tumoren darstellen [Steinbach et al., 2004].

Neben den erwähnten synthetischen Hemmstoffen der Autophosphorylierung ist seit längerem bekannt, dass Polyphenole ebenfalls in der Lage sind, die Aktivität des EGFR zu hemmen. Insbesondere polyphenolreiche Extrakte des Apfels, aber auch Anthocyanidine sind bisher als potente Hemmstoffe beschrieben worden [Fridrich, et al., 2008; Fridrich et al., 2007 a, b; Kern, et al., 2005].

2.1.5 Überexpression des EGFR bei Krebs

Nachdem 1978 von de Larco und Todaro erstmals der Einfluss von Rezeptortyrosinkinasen bei Krebserkrankungen gezeigt werden konnte, wurden inzwischen in 33 – 50 % aller epithelialen Tumoren (z. B. der Brust, des Zentralnervensystems und des Kolons) eine veränderte Expression des EGFR nachgewiesen [Sebastian, 2006; Earp et al., 2003]. Insgesamt ist eine Beteiligung des EGFR an Tumorwachstum, Tumorprogression, Angiogenese, Invasivität, Metastasierung und Hemmung der Apoptose nachgewiesen [Hanahan und Weinberg, 2000; Wosikowski et al., 1997]. Dabei wird die Überexpression des EGFR mit schlechter Überlebensprognose, schlechter Ansprechrate auf Zytostatika und der Entwicklung von Resistenzen in Verbindung gebracht [Nair, 2005; Brabender et al., 2001; Wu et al., 1995]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vulvakarzinomzelllinie A431 weist eine Dichte von etwa 2,6 Mio. EGF-Rezeptoren pro Zelle auf [Haigler et al., 1978]. Nichttransformierte Zellen besitzen üblicherweise zwischen 20 000 - 200 000 Rezeptoren pro Zelle [Carpenter, 1987].

Neben einer Überexpression des Rezeptors, sind auch direkte Mutationen des EGFR beschrieben, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen und folglich eine Hemmung der Apoptose und ein konstanter Wachstumsstimulus bewirkt wird. Der häufigste EGFR Mutant ist der EGFRvIII, bei dem durch eine Deletionsmutation innerhalb der ligandenbindenden Region eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors bewirkt wird [Jorissen et al., 2003; Garcia de Palazzo et al., 1993].

Diese Beobachtung führte zur Entwicklung neuer wirkmechanistischer Therapieansätzen bei Krebserkrankungen, wie Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonalen Antikörpern zur Unterdrückung der EGFR-aktivierten Signalwege (siehe Abb. 2.3) [Cunningham et al., 2004; Levitski, 1999].

Jedoch ist es Tumorzellen möglich die anti-apoptotischen Eigenschaften des EGFR-Signalweges nach Blockierung mit Tyrosinkinaseinhibitoren durch die Aktivierung anderer Rezeptortyrosinkinasen wieder zu kompensieren und Resistenzen zu entwickeln. In primären Glioblastomzelllinien konnte gezeigt werden, dass nach Hemmung des EGFR mit AG1478 der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor IGF-1R durch gesteigerte Phosphorylierung die Funktion des EGFR kompensieren kann [Chakravarti et al., 2002].

2.2 Oxidativer Stress

Viele Oxidations- und Reduktionsreaktionen des metabolischen Stoffwechsels verlaufen in Einelektronenschritten und führen somit zu radikalischen Zwischenstufen. Einelektronenoxidationen werden beispielsweise von der Prostaglandinsynthase, Einelektronenreduktionen von der Cytochrom P-450 Reduktase katalysiert. Auch in der mitochondrialen Atmungskette wird Sauerstoff in Einelektronenschritten zu Wasser umgesetzt, jedoch werden etwa 3 % des aufgenommenen Sauerstoffs nicht direkt zu Wasser, sondern zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt. Dabei können Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie hoch reaktive Hydroxylradikale (HO^{\cdot}) entstehen. Neben dem Energiestoffwechsel laufen eine Reihe weiterer oxidativer Prozesse innerhalb der Zelle ab, bei denen nicht-radikalische Formen wie Singulett-Sauerstoff, Hydroperoxide (ROOH), sowie radikalische Derivate von Alkyl- (R^{\cdot}) oder Peroxylradikalen (ROO^{\cdot}) entstehen. Die entstandenen Radikale können dimerisieren, an zelluläre Makromoleküle binden, durch Wasserstoffabstraktion neue Radikale erzeugen oder ein Elektron auf freie Sauerstoffmoleküle, unter Bildung des Superoxidradikalanions, übertragen [Toyokuni und Akatsuka, 2007; Halliwell, 2006]. Auch durch eine Vielzahl exogener Faktoren wie Ozon, UV-Strahlung, Chemikalien, oder auch verhaltensabhängige Risikofaktoren wie Ernährungsgewohnheiten, Rauchen, Alkoholkonsum und körperliche Aktivität können eine erhöhte Belastung der Zellen mit ROS zur Folge haben [Willcox et al., 2004].

Dem Organismus steht zum Schutz vor ROS jedoch eine Vielzahl von entgiftenden Enzymen und endogenen Antioxidantien zur Verfügung. Auch exogene Antioxidantien, wie Vitamin E und C oder Polyphenole, werden zur Eliminierung von Sauerstoffradikalen vom Körper eingesetzt [Halliwell, 2006; Halliwell und Gutteridge, 1996].

2.2.1 Redox-Cycling und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die radikalischen Metabolite mancher Fremdstoffe mit Chinonstruktur übertragen ihr freies Elektron auf Sauerstoff und reduzieren diesen zum Superoxidradikalanion. Dabei wird der Metabolit oxidiert, um dann erneut durch zelluläre Reduktasen reduziert zu werden. Es kann jetzt erneut ein Sauerstoffmolekül reduziert werden. Dieser Kreislauf wird als „Redoxcycling“ bezeichnet und kommt vor allem bei Semichinon-, Azo-, und Nitroanion-Radikalen vor. „Redoxcycler“ wirken letztlich nur als Katalysatoren, die Elektronen aus zellulären Reduktionsäquivalenten, wie NADPH oder NADH, auf freie Sauerstoffmoleküle übertragen. In Abb. 2.5 ist der Ablauf des „Redoxcyclings“ am Beispiel von Menadion dargestellt. Menadion gehört zur Familie der K-Vitamine (K3) [Eisenbrand und Metzler, 2002].

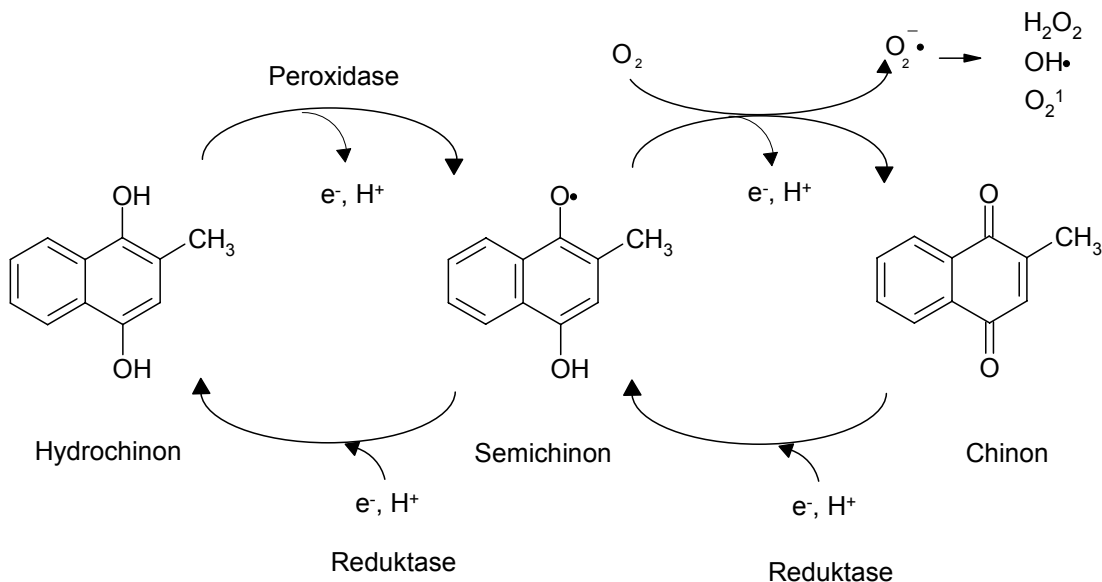


Abb. 2.5: Prinzip des „Redoxcyclings“ von Menadion [nach Eisenbrand und Metzler, 2002]

Das gebildete Superoxidradikalanion ist nicht besonders reaktiv, doch es können daraus weitere reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Die Superoxid-Dismutase überführt das Superoxidradikalanion in molekularen Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Letzteres kann, unter der katalytischen Wirkung von Fe^{2+} , über die Fenton Reaktion in das hochreaktive Hydroxylradikale überführt werden (Fenton Reaktion: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$). Da das Hydroxylradikal in wässrigen Lösungen eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt (< 1 ns), reagiert es folglich mit Substanzen in der Nähe seines Entstehungsortes [Halliwell, 2006].

2.2.2 Nrf2/ARE – Signalweg

Phase-II-detoxifizierende und antioxidativ wirkende Enzyme bilden ein zelluläres Abwehrsystem gegen ROS und elektrophile Metabolite. Die Induktion dieser Enzyme wird auf der transkriptionellen Ebene reguliert und durch das antioxidative responsive Element (ARE, „antioxidant responsive element“), welches sich in der Promotorregion der Gene für die Phase-II-Enzyme befindet, vermittelt. Der Transkriptionsfaktor „nuclear factor erythroid 2p45 (NFE2)-related factor“ 2 (Nrf2) ist für die Transkription ARE-abhängiger Gene als Antwort von oxidativem Stress von großer Bedeutung [Nguyen et al., 2003]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Polyphenole in der Lage sind, den Nrf2-ARE-Signalweg zu aktivieren und eine verstärkte Bildung von entgiftenden Enzymen des so genannten Phase-II-Metabolismus zu bewirken [Tanigawa et al., 2007; Na et al., 2007; Veeriah et al., 2006; Balogun et al., 2003].

2.2.2.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Das humane Nrf2-Protein besteht aus 590 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 66,1 kDa und unterteilt sich in sechs homologe Sequenzregionen, die so genannten „Nrf2-ECH-homology“-Domänen (siehe Abb. 2.7) [Itoh et al., 1999]. Die erste konservierte Domäne Neh1 ist für die Bindung an das ARE im Zellkern verantwortlich. Die 100 Aminosäuren lange N-terminale Neh2-Domäne enthält zwei spezifische AS-Sequenzen. Das DIDLID-Element (Aminosäuren 17-32), das für die Ubiquitinierung durch sogenannte Ubiquitinligasen verantwortlich ist und das ETGE-Motiv (Aminosäuren 79-82), das die Rekrutierung von Nrf2 an das Keap1-Protein

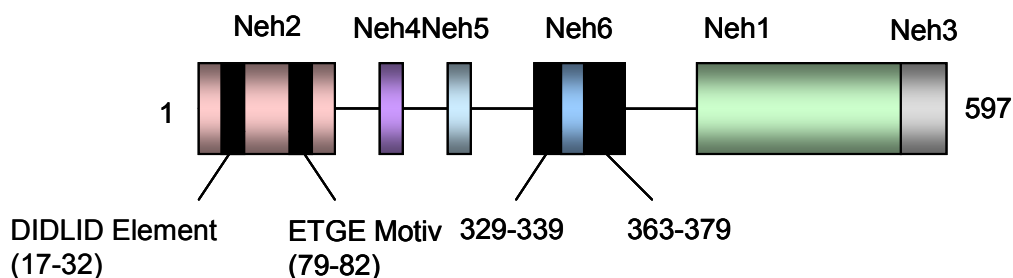


Abb. 2.7: Aufbau des Nrf2-Proteins der Maus [modifiziert nach McMahon et al., 2004]. Neh: „Nrf2-ECH-homology“.

ermöglicht [Giudice und Montella, 2006]. Itoh et al. [1999] konnten zeigen, dass die Neh2-Domäne mit der DGR-Domäne des Keap1-Proteins („Kelch-like ECH-associated protein“ 1), an das Nrf2 in inaktivem Zustand gebunden ist, interagiert. Die zwei Domänen Neh4 und Neh5 binden kooperativ an den Coaktivator CREB (c-AMP-„responsive element-binding protein“) und aktivieren damit die Transkription von Zielgenen. Die Redox-unempfindliche und Serin-reiche Neh6-Domäne reguliert den proteasomalen Abbau von Nrf2 in der oxidativ-gestressten Zelle [McMahon et al., 2004].

2.2.2.2 Aufbau und Eigenschaften des Keap1- Proteins

Im inaktiven Zustand ist Nrf2 im Zytosol an ein Dimer aus Keap1-Proteinen gebunden, das wiederum selbst mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts interagiert [Kang et al., 2004]. Dadurch wird Nrf2 von Keap1 unter basalen Bedingungen im Zytoplasma zurückgehalten und die Translokation von Nrf2 in den Zellkern gehemmt [Itoh et al., 1999; Giudice und Montella, 2006; Eggler et al., 2008]. Auf Grund von Strukturuntersuchungen des humanen Keap1-Proteins können fünf homologe Domänen unterschieden werden (siehe Abb. 2.8) [Dinkova-Kostova et al., 2002].

Die BTB/POZ-Domäne, die sich direkt an die N-terminale Region (NTR, Aminosäuren 1-60) anschließt, ist für die Homodimerisierung von Keap1 verantwortlich [Zipper und Mulcahy, 2002]. Als Sensor für oxidativen Stress in der Zelle fungiert die Intervenierende Region (IVR), die reich an reaktiven Cysteinresten ist [Dinkova-Kostova et al., 2002]. Mit der DGR („double glycine repeats“)-Domäne (Aminosäuren 315-598) wird die Assoziation mit der Neh2-Domäne des Nrf2-Proteins ermöglicht. Die Untersuchungen von Kang et al. [2004] zeigten, dass Keap1 mit einer defekten C-terminalen Domäne (CTR; Aminosäure 599-624) nicht in der Lage ist, mit Nrf2 zu assoziieren, folglich ist diese Domäne essentiell an der Ausbildung des Nrf2-Keap1-Komplexes beteiligt.

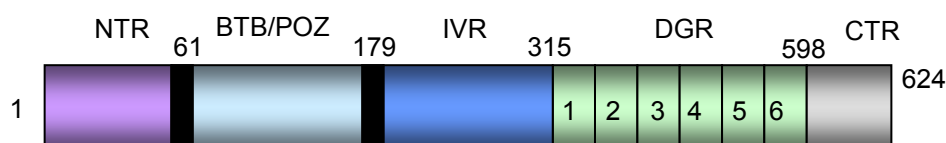


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des Keap1-Proteins [mod. nach Giudice und Montella, 2006]. NTR: N-terminale Region, BTB: „broad complex, tram track, and bric a brac“, POZ: „poxvirus and zincfinger“, IVR: „intervening region“, DGR: „double glycine repeat“, CTR: C-terminale Region.

2.2.2.3 Modulation des proteasomalen Abbaus

Der Aktivierung des Nrf2-Signalweges liegt ein Modell zugrunde, bei dem der Nrf2-Keap1-Komplex durch direkte Einwirkung von Induktoren [2004]. Hierbei liegt Keap1 unter reduzierenden Bedingungen als Homodimer vor und die beiden monomeren Einheiten sind dabei über die BTB-Domänen miteinander und über die DGR-Region an Aktin-Filamente assoziiert. In dieser Konformation ist das Keap1-Homodimer in der Lage, ein Nrf2-Molekül zwischen zwei DGR-Domänen im Zytoplasma zu halten (siehe Abb. 2.9).

Unter Einwirkung von Enzyminduktoren kommt es zur Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken zwischen den beiden Keap1-Einheiten, woraus eine Konformationsänderung des Komplexes resultiert und es zu einer Freisetzung von Nrf2 kommt, das anschließend in den Zellkern translozieren kann [Wakabayashi et al., 2004].

Keap1 scheint jedoch nicht nur als Sensor für oxidativen Stress zu fungieren, sondern auch eine Art Regulator für den Nrf2-Abbau nach Ubiquitynylierung durch das proteasomale System [Kang et al., 2004; McMahon et al., 2003]. Das 26S-Proteasom ist ein 700 kDa schwerer Proteinkomplex, der aus einer katalytischen Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit besteht. Durch Interaktion der reaktiven Cystein-Reste Cys257, Cys273, Cys288 sowie Cys297 mit Phase-II-Induktoren wird eine Dissoziation des Komplexes hervorgerufen [Dinkova-Kostova et al., 2002]. Ein darauf basierendes

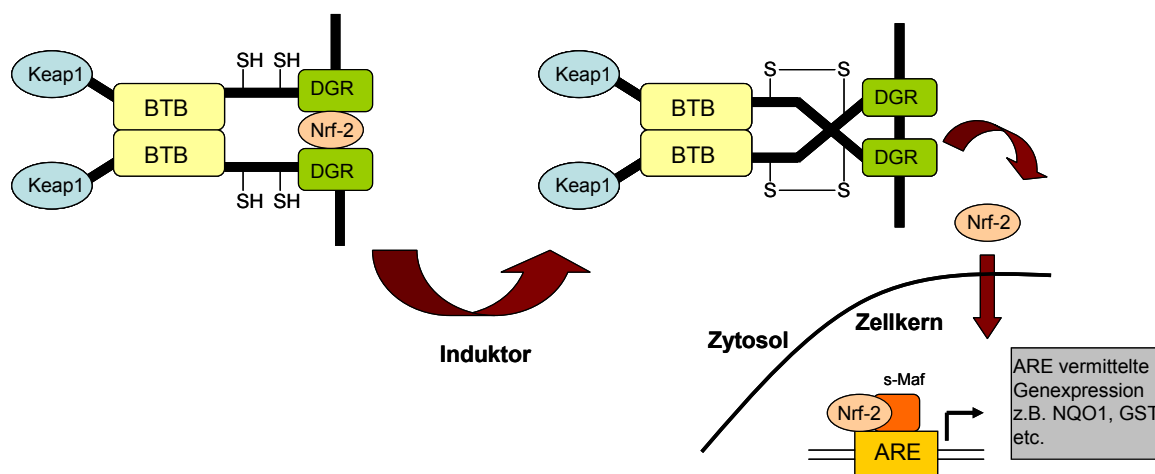


Abb. 2.9: Postulierter Mechanismus der Nrf2 Freisetzung [mod. nach Wakabayashi et al., 2004.] ARE: "antioxidant responsive element", BTB: "broad complex, tram track, and bric a brac", DGR: "double glycine repeat", Keap1: "Kelch-like ECH associated protein" 1; Nrf2: "nuclear-factor-E2-related factor" 2.

Aktivierungsmodell entwickelten Wakabayashi et al. Das 20S-Untereinheit und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten besteht, die den Zugang zum 20S-Komplex regulieren. Die Markierung für den Abbau läuft in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess ab, wobei mehrere Ubiquitin-Moleküle unter Verbrauch von ATP an das Zielprotein gebunden werden. Anschließend kann jeweils eine 19S-Untereinheit spezifisch an die gebildete Polyubiquitinkette binden. Somit wird gewährleistet, dass nur Ubiquitin-markiertes Protein abgebaut wird. An der Ubiquitin-Konjugation sind drei verschiedene Enzyme beteiligt, dies sind das ubiquitinaktivierende Enzym E1, das ubiquitinkonjugierende Enzym E2 sowie die Ubiquitin-Ligase E3 [Berg et al., 2007]. Die Cullin (Cul) E3-Ligasen, eine Unterfamilie der Ubiquitin-Ligasen, erkennen das abzubauen Zielprotein und katalysieren die Konjugation mit Ubiquitin [Chew et al., 2007]. Keap1 ist über die BTB-Domäne mit Cul3 assoziiert und katalysiert die Konjugation von Nrf2 in der Neh2-Domäne mit Ubiquitinmolekülen und markiert so das Protein für den proteasomalen Abbau [Zhang, 2006; Kobayashi et al., 2006]. Keap1 scheint somit als Bestandteil der E3-Ubiquitin-Ligase gezielt Nrf2 dem proteasomalen Abbau zuzuführen und dessen „turnover“ zu regulieren [Kang et al., 2004; Zhang et al., 2004; Zhang, 2006]. Zudem gibt es Hinweise, dass eine durch Nrf2-Aktivatoren bedingte Modifikation von Keap1 am Cysteinrest Cys151 zu einer verminderten Assoziation von Keap1 und Cul3 führt, was die Ubiquitinierung und den damit verbundenen proteasomalen Abbau von Nrf2 verringert und somit die Stabilität von Nrf2 im Zytosol erhöht wird. Dadurch kommt es zu einer Translokation und Akkumulation von Nrf2 im Zellkern [Kobayashi et al., 2006].

2.2.2.4 Regulation der *de novo* Synthese von Nrf2

Neben der Modulation des Nrf2-Abbaus durch das 26S-Proteasom, ist die *de novo* Synthese ein weiterer Faktor für eine gesteigerte Translokation zur Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Untersuchungen von Kobayashi et al. [2006] haben gezeigt, dass die Hemmung der Nrf2-Proteinbiosynthese eine Unterdrückung der *tert.*-Butylhydrochinon (*t*BHQ)-induzierten nukleären Translokation bewirkt. Dies wurde als Hinweis auf den Einfluss der *de novo* Synthese bei der ROS vermittelten Translokation von Nrf2 gewertet. Eine vergleichbare Beobachtung machten Itoh et al. [2003] an Makrophagen. Die Coinkubation mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid führt zu einer Verminderung der durch Dimethylmalat induzierten

Translokation von Nrf2. Gleichzeitig konnte jedoch durch keine der beiden eingesetzten Substanzen ein Einfluss auf den mRNA-Gehalt gemessen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Modulation des nukleären Nrf2-Gehaltes durch die *de novo* Synthese entscheidend beeinflusst wird.

2.2.2.5 Modulation des Kernimports und des -exports von Nrf2

Neben den bisher aufgeführten Aktivierungsfaktoren von Nrf2 spielt auch der nukleäre Import und Export eine wichtige Rolle in der Nrf2-Signalübertragung. Die bisherigen Hypothesen basieren auf einer Lokalisation des Keap1 an Aktin-Filamenten der Zelle. Velichkova und Hasson [2005] zeigten hingegen, dass sich Nrf2 bei homöostatischen Bedingungen zwar im Zytosol befindet und Ubiquitin-vermittelter Degradation unterliegt, aber nicht mit Aktin-Filamenten interagiert. Mittels Immunfluoreszenz-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass sich Keap1 in der oxidativ gestressten Zelle vom Zytoskelett löst und sowohl im Zytosol als auch im Kern lokalisiert ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Keap1 mit Nrf2 im Komplex in den Zellkern transloziert. In diesem Zusammenhang wurde ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) für den nukleären Exportfaktor CRM1/Exportin in der IVR-Domäne von Keap1 lokalisiert. Zudem wird angenommen, dass Nrf2 eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localisation signal*, NLS) besitzt, das in der ungestressten Zelle vom NES dominiert wird, wodurch Nrf2 einem verstärkten proteasomalen Abbau unterliegt. In oxidativ gestressten Zellen hingegen ist die NES maskiert, sodass der Nrf2-Keap1-Komplex durch das dominante NLS in den Zellkern translozieren und dort die Expression von ARE-vermittelten Genen aktivieren kann [Velichkova und Hasson, 2005]. Untersuchungen von Jain et al. [2005] haben gezeigt, dass durch gezielte Mutationsversuche des Nrf2-Proteines, welche einen Verlust der NLS-Sequenz bedingten, eine Translokation in den Zellkern ausblieb. Die Funktionalität der NLS konnte somit bestätigt werden.

Jain und Jaiswal [2006] konnten weiterhin zeigen, dass die Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr 586 durch die Tyrosinkinase Fyn für den Export in das Zytoplasma, die anschließende Bindung an Keap1 und den daraus resultierenden proteasomalen Nrf2-Abbau essentiell ist.

2.2.2.6 Aktivierung durch vorgeschaltete Signalkaskaden

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung stellt die post-translationale Modifizierung (Phosphorylierung) des Keap1-Protein-Komplexes durch verschiedene Proteinkinasen dar. Die drei wichtigsten Signalübertragungswege, welche ebenfalls durch oxidativen Stress die Genexpression über ARE vermitteln, sind die Proteinkinase C (PKC), die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade sowie die Kinase des Phosphatidylinositols-3 (PI3K). Es besteht sogar die Möglichkeit, dass alle drei Signalkaskaden gleichzeitig an der Signaltransduktion und transkriptionalen Regulierung des AREs beteiligt sind [Giudice und Montella, 2006]. Die Untersuchungen von Cullinan et al. [2003] zeigten, dass bei oxidativem Stress die Aktivierung des Nrf2-Keap1-Systems durch die direkte Phosphorylierung von Nrf2 am endoplasmatischen Retikulum (ER) mittels PERK (PKR-„like endoplasmic reticulum-resident kinase“) stattfinden kann. Nach Einwirkung von Stress-induzierenden Substanzen ist die am ER lokalisierte PERK-Kinase in der Lage, Nrf2-Proteine zu erkennen und zu phosphorylieren. Dadurch dissoziiert der Nrf2-Keap1-Komplex und das freigesetzte Nrf2 transloziert in den Zellkern. Dort erfolgt dann die Expression der Nrf2-regulierten Zielgene [Cullinan et al., 2003].

2.2.2.7 Das Antioxidative Responsive Element (ARE)

In der zellulären Abwehr gegen ROS spielt die Regulation von detoxifizierenden und/oder antioxidativ wirkenden Enzymen durch das sogenannte „antioxidative response element“ (ARE) eine wichtige Rolle (siehe Abb. 2.10). Das ARE befindet sich in der Promotorregion einer Reihe von Genen, die Phase-II-Enzyme kodieren. Als Reaktion auf die vermehrte Anwesenheit von oxidativen und elektrophilen Substanzen, kann die Expression dieser Enzyme erhöht werden [Eggler, 2008; Lee et al., 2005]. Zu diesen ARE-regulierten Proteinen gehören Enzyme des Glutathionsyntheseweges wie γ -Glutamylcysteinylase, Redoxproteine mit aktiven Sulfhydrylgruppen und Fremdstoff-metabolisierende Enzyme wie GST, NQO1 oder HO1 [Köhle und Bock, 2006; Nguyen et al., 2003].

2.2.2.8 Aktivierung des Nrf2-Keap1-Komplexes

In Abwesenheit von oxidativem Stress ist Nrf2 an Keap1 im Zytoplasma der Zelle gebunden. Dabei erfolgt die Bindung über die Neh2-Domäne des Nrf2 und die DGR-Domäne des Keap1-Proteins [Itoh et al., 1999]. Wird die Zelle oxidativem Stress oder Phase-II-Enzyminduktoren ausgesetzt, kommt es zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern, wo es nach Bildung eines Heterodimers mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie sMaf („small Maf“) die Transkription ARE-vermittelter Gene induziert [Lee und Johnson, 2004; Köhle und Bock, 2006]. Die Translokation von Nrf2 kann durch die Modifikation des Keap1-Proteins oder auch durch vorgeschaltete Signalkaskaden erfolgen [Huang et al., 2002].

2.2.2.9 ARE-Aktivatoren

Eine Reihe unterschiedlicher Substanzen sind in der Lage, das ARE und die Transkription von detoxifizierenden Phase-II-Enzymen zu aktivieren. Zu ihnen gehören chemisch reaktive Verbindungen mit elektrophilen sowie sulfhydrylbindenden Eigenschaften [Lee und Surh, 2005, Nguyen et al., 2003]. Die Induktoren werden hinsichtlich ihrer Wirkung in drei Klassen eingeteilt. Monofunktionelle Induktoren aktivieren dabei lediglich das ARE. Zu ihnen gehören beispielsweise Michael-Reaktions-Akzeptoren, Isothiocyanate, Schwermetalle und polyphenolische Antioxidanzien wie Quercetin [Dinkova-Kostova et al., 2005]. Bifunktionelle Induktoren hingegen induzieren Phase-I-Enzyme über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR). Nach ihrer Metabolisierung können sie zudem Phase-II-Enzyme über das ARE induzieren. Solche bifunktionellen Induktoren sind beispielweise Benzylisothiocyanat, Cumarin, Ethoxyquin und Oltipraz [Nguyen et al., 2003]. Dual wirkende Induktoren induzieren zwar Phase-II-Enzyme, hemmen jedoch Phase-I-Enzyme. Zu ihnen gehören beispielweise 4-Methoxyphenol und Butylhydroxyanisol [Lee und Surh, 2005; Henderson et al., 2000].

Ein monofunktioneller Induktor stellt das oxidierbare Diphenol tBHQ dar, welches aus dem in Lebensmitteln zugelassenen Antioxidans Butylhydroxyanisol (3-BHA) durch Demethylierung entsteht (siehe Abb. 2.10) [De Long et al., 1985].

*t*BHQ reagiert durch anschließende Autoxidation weiter zum entsprechenden Semichinon sowie Chinon. Hierbei entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die als bekannte Aktivatoren von Nrf2 und dessen Translokation diskutiert werden [Yu et al., 1997; Pinkus et al., 1996].

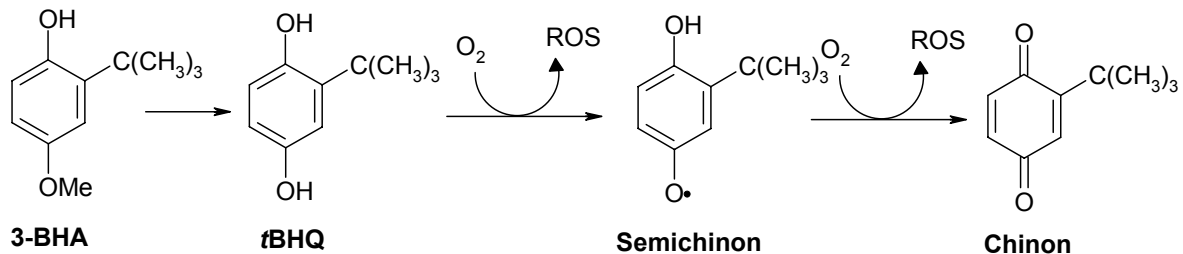


Abb.2.10: Autoxidation von *t*BHQ [mod. nach Yu et al., 1997]. 3-BHA: 3-Butylhydroxy-anisol, *t*BHQ: *tert*-Butylhydrochinon.

2.2.3 Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein körpereigenes Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin (γ -Glutamylcysteinylglycin), das in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiert wird und besonders in der Leber in hoher Konzentration vorkommt (siehe Abb. 2.11). GSH spielt beim Schutz der Zellen vor oxidativen toxischen Noxen eine entscheidende Rolle. Aufgrund der Nukleophilie der Thiolgruppe reagiert es leicht mit elektrophilen Substanzen. Dabei ist GSH in der Lage, direkt in einer nichtenzymatischen Reaktion mit Radikalen zu reagieren. Gleichzeitig dient GSH als Elektronendonator in der durch die Glutathionperoxidasen (GPx) katalysierten Reduktion von Peroxiden und H₂O₂. Wird GSH unter Abgabe des Wasserstoffatoms oxidiert, so entsteht aus zwei Molekülen GSH ein Molekül des

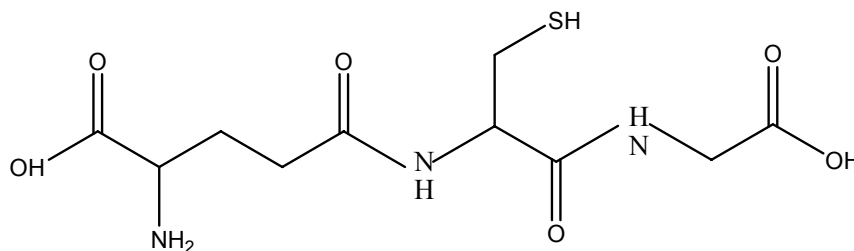


Abb. 2.11: Struktur von Glutathions (GSH) [mod. nach Halliwell und Gutteridge, 1999].

Disulfids GSSG, welches die oxidierte Form des GSH darstellt (siehe Abb. 2.11 + 2.12). GSH wird ubiquitär exprimiert, wobei der intrazelluläre GSH-Spiegel 100x höher ist als der von GSSG [Nelson und Cox, 2001]. Um den GSH/GSSG-Quotienten aufrechtzuerhalten, wird das gebildete GSSG mittels Glutathionreduktase (GSR) in einer NADPH-abhängigen Reaktion wieder zu zwei GSH-Molekülen reduziert, sodass diese erneut der Zelle für die Reduktion schädlicher Verbindungen zur Verfügung stehen (siehe Abb. 2.12). Dabei stellen die beiden Formen ein Redoxsystem der Zelle dar und schützen diese vor oxidativem Stress [Kaplowitz et al., 1985].



Abb. 2.12: Abbau von Hydroperoxiden durch GSH. GSR: Glutathionreduktase, GPx: Glutathionperoxidasen, ROOH: Hydroperoxide, NADPH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid.

2.2.4 γ -Glutamylcysteinligase

Die γ -Glutamylcysteinligase (γ GCL), auch als γ -Glutamylcysteinsynthetase bezeichnet, ist zusammen mit der Glutathionsynthetase für die Synthese von GSH aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutaminsäure verantwortlich. Die GSH-Biosynthese erfolgt in zwei enzymatischen Schritten. Unter ATP-Verbrauch und in Anwesenheit von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen wird durch die γ GCL zunächst aus Glutaminsäure und Cystein γ -Glutamylcystein gebildet. Mittels der Glutathionsynthetase erfolgt dann unter erneutem ATP-Verbrauch die Bindung von Glycin an das terminale Kohlenstoffatom des zuvor gebildeten γ -Glutamylcystein [Lu, 2008]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der GSH-Bildung erfolgt durch die γ GCL. Diese ist daher essentiell für die Kontrolle und Aufrechterhaltung der intrazellulären GSH-Konzentration. Da GSH eine wichtige Funktion im Phase-II-Metabolismus hat, ist auch die γ GCL von zentraler Rolle beim Schutz der Zelle vor Angriffen durch ROS [Lu, 2008; Shepherd et al., 2000].

Die γ GCL besteht als heterodimeres Enzym, aus einer schweren katalytischen (γ GCLh) und einer leichten regulatorischen (γ GCLl)-Untereinheit, wobei die beiden Untereinheiten zwar durch getrennte Gene kodiert werden, aber unter bestimmten Umständen auch abhängig voneinander reguliert werden können. Durch Sequenzanalyse konnte bei beiden Untereinheiten eine ARE (EpRE) Sequenz als Regulator der transkriptionellen Aktivierung nachgewiesen werden. Für die Expression beider γ GCL-Untereinheiten scheint Nrf2 ein Aktivator zu sein. So führte eine β -Naphthoflavon-bedingte Überexpression von Nrf2 zu einer Aktivierung der γ GCL-Untereinheiten [Rahman und MacNee, 2000; Shepherd et al., 2000; Wild et al., 1999].

2.3 Polyphenole

Unter dem Begriff Polyphenole werden mehr als 8000 aromatische Verbindungen zusammengefasst [Ramos, 2008]. Die zu den sekundären Pflanzenstoffen zählenden Verbindungen kommen in der Natur als bioaktive Substanzen, wie Farbstoffe, Geschmacksstoffe und Tannine vor. Je nach Anzahl der phenolischen Ringe und dem strukturellen Element, mit dem die Ringe verbunden sind, werden die Polyphenole in folgende Gruppen eingeteilt:

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

2.3.1 Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate

Phenolcarbonsäuren kommen meist in den Randschichten von Pflanzen vor, wo sie zur Stabilität der Zellwände beitragen. Die häufig mit organischen Säuren oder Zucker veresterten Phenolcarbonsäuren lassen sich in Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren unterteilen [Watzl und Rechkemmer, 2001].

Die zu der Gruppe der Hydroxyzimtsäuren gehörende Chlorogensäure, die sich aus Kaffeesäure und Chinasäure zusammensetzt, ist insbesondere in Früchten zu finden (siehe Abb. 2.13) [Hermann, 1992]. In Abhängigkeit von der Sorte liegt der Gehalt an Chlorogensäure bei Tafeläpfeln zwischen 30-60 mg/kg. In Apfelsäften kann er bis zu 208 mg/l betragen [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Die Hydroxyzimtsäuren p-Cumarsäure, Kaffeesäure und 5-Cumaroylchinasäure sind neben der Chlorogensäure und ihren Isomeren weitere Apfelinhaltsstoffe. Die nur in begrenzten Konzentrationen vorkommenden Hydroxybenzoesäuren bilden die zweite Gruppe der Phenolcarbonsäuren. Zu den wichtigsten Vertretern, die mehr in Steinobst und Beerenarten als in Kernobst vorkommenden Hydroxybenzoesäuren, gehören 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Gallussäure und Vanillinsäure [Ebermann und Elmadfa, 2008].

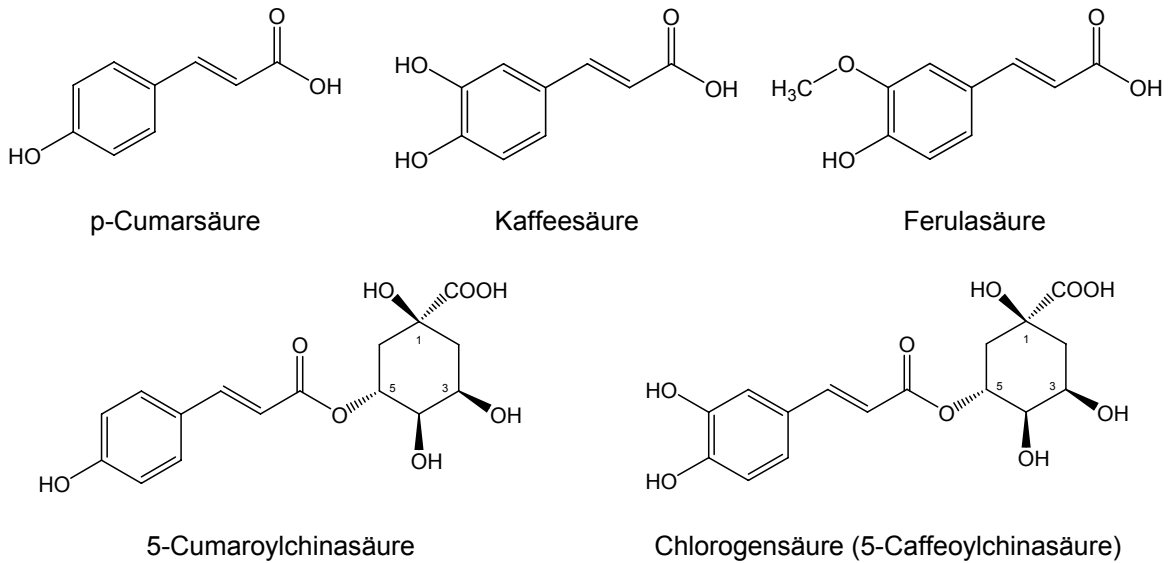


Abb. 2.13: Strukturen von apfelrelevanten Phenolcarbonsäuren.

2.3.2 Flavonoide

Die Flavonoide (lat.: flavus = gelb) stellen die größte Gruppe der in der Humanernährung vorkommenden Polyphenole dar. Sie besitzen ein Flavan-Grundgerüst [Harborne, 1994]. Flavonoide bestehen grundsätzlich aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A und B) sowie einem O-heterozyklischen Ring (C) (siehe Abb. 2.14). Sie werden abhängig von Hydroxylierungsgrad, Oxidationsstufe am C-Ring, Art der Substituenten und Polymerisierungsgrad in 6 weitere Untergruppen eingeteilt: Flavonole, Flavone, Flavanone, Flavanole, Anthocyanidine und Isoflavone [Ebermann und Elmadfa, 2008]. Aufgrund der strukturellen Vielfalt, die sich durch Unterschiede in der Anzahl an Hydroxy- und Methoxysubstituenten, als auch in Art, Anzahl und Anordnung der Zuckerreste ergeben, sind derzeit über 5000 verschiedene Flavonoide beschrieben [Harborne und Williamson, 2000]. Die meisten Flavonoide treten in der Natur nicht frei in Form ihres Aglykons auf, sondern liegen glykosidisch gebunden vor [Stahl et al., 2003; Hollmann et al., 1997; Harborne, 1994]. Glukose, Galaktose, Rutinose, Rhamnose, Arabinose und Xylose sind die am häufigsten eingebauten Zuckerbausteine. Sie sind in Form von Mono-, Di- oder Oligosacchariden bevorzugt an Position 3 des C- Ringes β -glykosidisch mit dem Aglykon verknüpft [Watzl und Rechkemmer, 2001; Hermann, 1992]. Die Glykosylierung trägt dazu bei, dass ihre Löslichkeit im Pflanzensaft

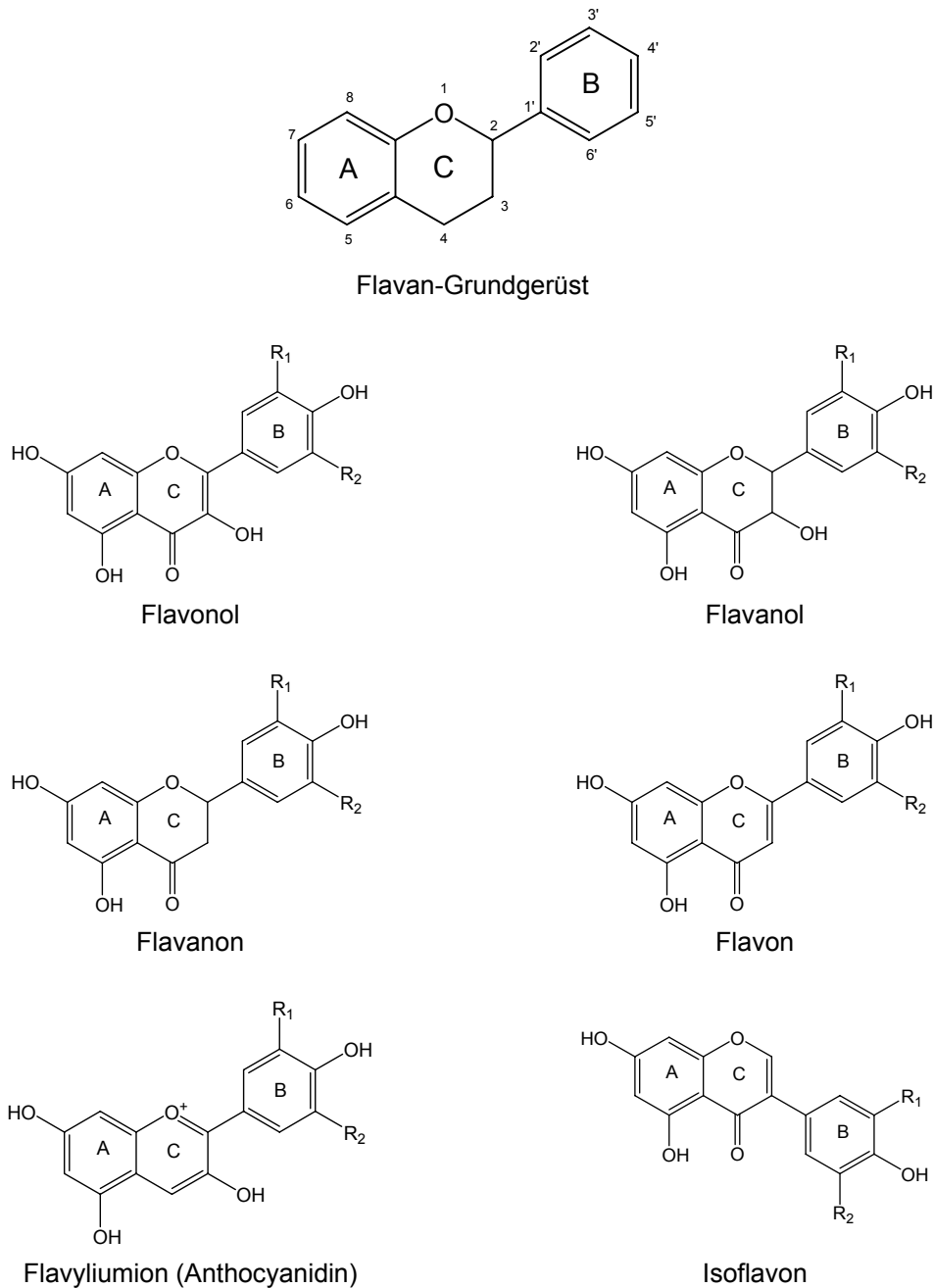


Abb. 2.14: Familie der Flavonoide [Aherne und O'Brien, 2002].

erhöht wird und stabilisiert die Flavonoide gegenüber einem UV-bedingten oder hydrolytischen Abbau [Aherne und O'Brien, 2002]. Die Flavan-3-ole sind hier jedoch eine Ausnahme. Sie kommen in der Natur hauptsächlich als Aglyka vor.

Je nach Pflanzensorte und Klima schwankt der Gehalt der überwiegend in den Randschichten von Pflanzen sowie den äußeren Blättern befindlichen Flavonoide. Sie verleihen bestimmten Pflanzenteilen (z.B. Blüten und Früchten), als zellsaftlösliche Pigmente, ihre charakteristische Farbe [Harborne und Williamson, 2000]. Sie schützen die Pflanzen zudem vor Fressfeinden und dem Befall durch

Pathogene [Watzl und Rechkemmer, 2001]. Durch stufenweise Kondensation der aromatischen Aminosäure Phenylalanin mit drei aktivierten Malonsäuren, erfolgt die Biosynthese von Flavonoiden. Durch 1,6-Cyclisierung entstehen zunächst die Chalkone, aus denen durch Folgereaktionen (u.a. Hydroxylierungen) die nachfolgenden Flavonoide gebildet werden. Flavonoiden werden antikanzerogene, antioxidative, antivirale, antimikrobielle, antiatherogene, antiinflammatorische, antiallergene immunstimulierende und zellprotektive Wirkungen zugesprochen [Da Silva et al., 2000; Scalbert und Williamson, 2000; Rice-Evans et al., 1996]. Diese Aussage stützt sich auf epidemiologische Studien wie z.B. der „Zutphen-Elderly“-Studie [Hertog et al., 1993] oder der „Finnish Mobile Clinic“-Studie [Knekt et al., 2002, 1996]. Die gesundheitsförderlichen Eigenschaften beruhen jedoch im Wesentlichen auf dem Einfang freier Radikale, die sich durch folgende Strukturmerkmale auszeichnen [Bors et al., 1999, 1990]:

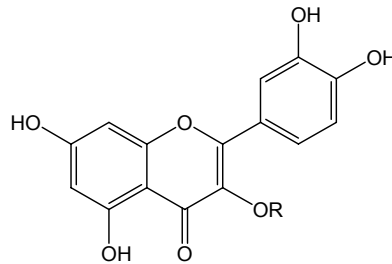
- O-Dihydroxystruktur (Catecholstruktur) im B-Ring für den Radikalangriff.
- Doppelbindung in Position 2,3 in Kombination mit einer 4-oxo-Gruppe für eine effiziente Elektronendelokalisation zur Stabilisierung des Flavonoidradikals.
- Gleichzeitige Anwesenheit einer 3'-OH und einer 4'-OH-Gruppe ebenfalls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

Äpfel stellen eine bedeutende Flavonoidquelle für die humane Ernährung in Europa dar [Arts et al., 2001; Knekt et al., 1997]. Regelmäßiger Apfelkonsum geht nach epidemiologischen Studien mit einer Reduzierung des Lungenkrebsrisikos einher [Feskanich et al., 2000; Knekt et al., 1997].

2.3.2.1 Flavonole

In der Humanernährung ist die Gruppe der Flavonole die mengenmäßig vorherrschende Stoffgruppe der Flavonoide [D'Archivio et al., 2007; Manach, 2004]. Über eine Doppelbindung zwischen C2 und C3, sowie einer Hydroxylgruppe in C3' Position werden die Flavonole charakterisiert (siehe Abb. 2.15). Quercetin und Kaempferol gehören zu den Hauptvertretern der Flavonole [Manach, 2004]. Vor allem Äpfel, Zwiebeln, Brokkoli und Blaubeeren gelten mit Gehalten bis zu 1,2 g/kg Frischgewicht als Hauptaufnahmequelle von Flavonolen. In Tee und Rotwein sind ebenfalls hohe Konzentrationen bis 45 mg/l enthalten. Die geschätzte tägliche

Aufnahme liegt bei etwa 4 – 68 mg [Rice-Evans et al., 2000]. In Nahrungsmitteln liegt Quercetin nicht als Aglykon, sondern in glykosylierter Form meist mit Rhamnose, Galaktose, Arabinose, Xylose oder auch Glucuronsäure verestert vor. Ihre lichtinduzierte Synthese erklärt ihre starke Varianz und ihre Lokalisierung in den äußeren Pflanzenschichten [Boyer et al., 2005; Manach et al., 2004].



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

Abb. 2.15: Quercetin und apfelrelevante Quercetinglykoside, glc: Glucose, gal: Galaktose, rha: Rhamnose

Biologische Verfügbarkeit

Unter den Flavonoiden ist die Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin am Besten untersucht. Quercetin liegt im Plasma nach Resorption in Form seiner glucuronidierten, sulfatierten oder O-methylierten Metabolite vor [Mullen et al., 2006]. Im Plasma konnten bisher weder Glykoside noch das Aglykon nachgewiesen werden [Day et al., 2001; Moon et al., 2001]. Über aktiven Transport mittels dem Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) kann die Resorption der Flavonolglykoside aus dem Dünndarm erfolgen, im Dickdarm kann das Glykosid durch die Mikroflora gespalten werden [Walgren et al., 2000; Hollmann et al., 1999]. Als Hauptmetaboliten des Quercetin im humanen Plasma identifizierten Day et al. [2001] Quercetin-3-O-glukuronid, 3'-O-Methylquercetin-3-O-glukuronid und Quercetin-3'-O-sulfat. Charakteristisch sind langsame Ausscheidungsraten der Metabolite mit Halbwertszeiten von 11 bis 28 h [Manach et al., 2004]. Es konnten

nach wiederholter Zwiebelaufnahme im humanen Plasma Quercetin-Metaboliten Konzentrationen von 0,6 μM nachgewiesen werden [Moon et al., 2000]. Da die Resorption des Weiteren vom Zuckerrest des Quercetins abhängig ist, wurden Quercetinglykoside aus Zwiebeln als besser bioverfügbar charakterisiert, als Quercetinglykoside aus Äpfeln [Kahle et al., 2005; Hollmann et al., 1997, 1995].

2.3.2.2 Flavan-3-ole

Im Gegensatz zu den anderen Unterklassen der Flavonoide, liegen Flavan-3-ole als Aglyka vor. Als (+)-Catechin nehmen sie eine [2R, 3S]-Konformation ein und als (-)-Epicatechin eine [2S, 3S]-Konformation [Scalbert und Williamson, 2000]. In erster Linie schützen sie die Pflanze vor mikrobakteriellem Befall. Die Aglyka sind in monomerer Form als Catechine in Aprikosen (100-250 mg/kg FG) oder Äpfeln (20-120 mg/kg FG) zu finden und werden in polymerer Form als Procyanidine oder kondensierte Tannine bezeichnet [D'Archivio et al., 2007]. Die zumeist über C4, C6 und C8 miteinander verknüpften di-, oligo- oder polymeren Procyanidine weisen ein hohes Molekulargewicht auf. Durch die hohe Anzahl an Hydroxygruppen besitzen sie proteindenaturierende Eigenschaften (Gerbstoff). Wichtige Vertreter sind: (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, die Procyanidindimere B1 ((-) Epicatechin (4 β \rightarrow 8)-(+)-Catechin) und B2 ((-) Epicatechin (4 β \rightarrow 8)-(-)-Epicatechin) (siehe Abb. 2.16). Die strukturelle Vielfalt innerhalb der oligomeren und polymeren Procyanidine ist sehr groß, so dass eine umfassende Charakterisierung des Procyanidinanteils in Extrakten bisher nicht möglich ist [Dixon et al., 2005]. Daher beschränkt sich die Procyanidin-Analytik meist auf die photometrische Bestimmung des Gesamtgehalts und des mittleren Oligomerisierungsgrades [Zessner et al., 2008].

In Trauben, Kakao, Äpfeln, Rotwein und grünem Tee sind hohe Konzentrationen zu finden [Arts et al., 2000 a, b; Fraga, 2007]. Die Aufnahmemenge an Flavan-3-olen wird auf 10 mg – 0,5 g/Tag geschätzt [Deprez et al., 2000]. Abhängig von Geschlecht und Alter liegt die geschätzte Aufnahmemenge in den USA bei 57,8 mg/Tag pro Person [Gu et al., 2004].

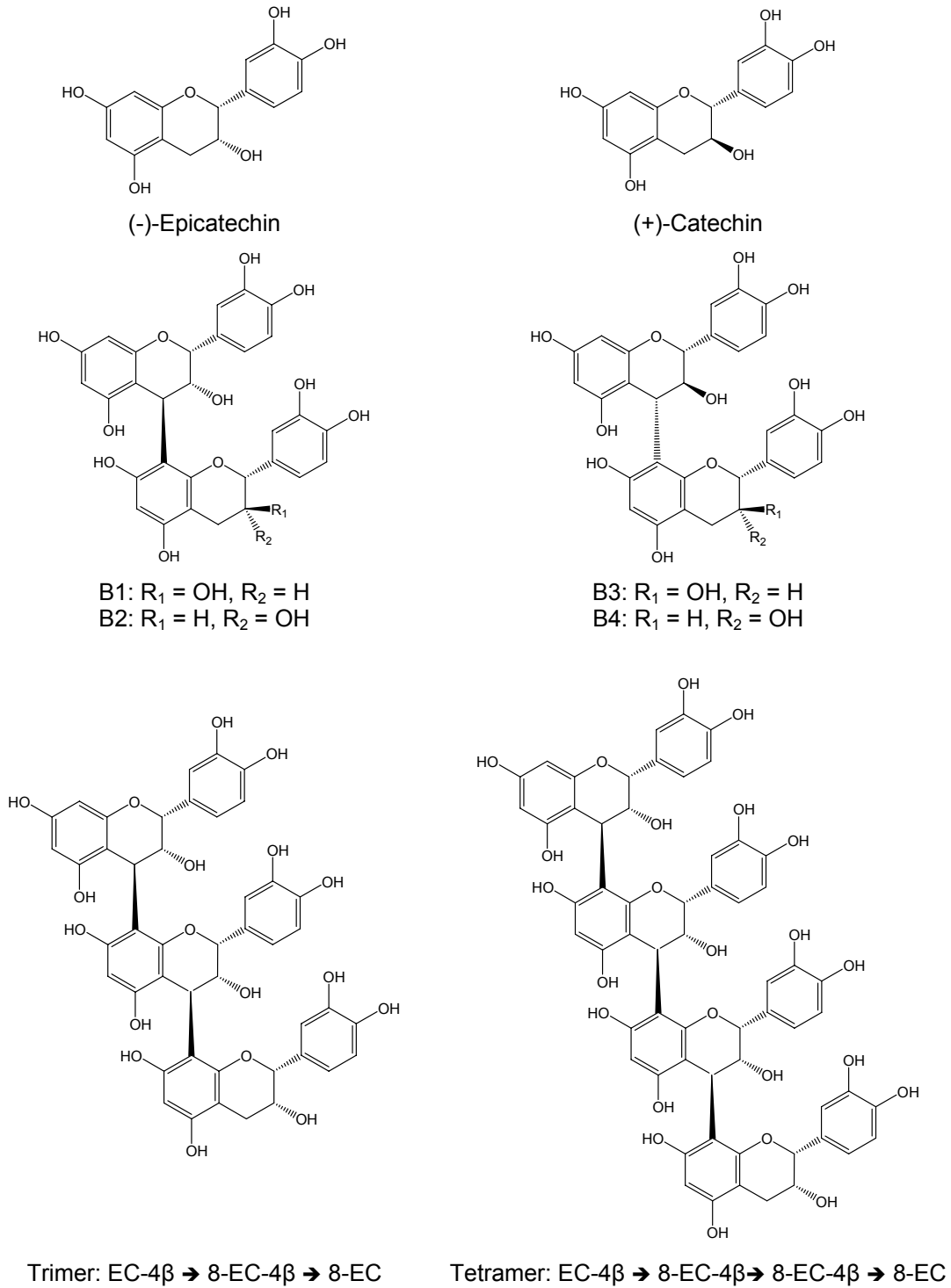


Abb. 2.16: Strukturen der monomeren Catechine, der dimeren Procyanidine B1-B4, sowie eines Procyanidintrimers und eines Procyanidintetramers; EC: (-)-Epicatechin.

Biologische Verfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit der Flavan-3-ole wurde zum größten Teil nach der Aufnahme von Tee und Schokolade untersucht [Manach et al., 2005]. Nach Resorption liegen Flavan-3-ole hauptsächlich als glucuronidierte, methylierte und sulfatierte Metabolite vor [Meng et al., 2002; Kuhnle et al., 2000]. Im Plasma von Menschen und Ratten sind folgende Metabolite von Epicatechin (EC) identifiziert worden: EC-3'-O-glukuronid, 4'-O-Methyl-EC-3'-glukuronid, 4'-O-Methyl-EC-5-glukuronid und 7-O-EC-glukuronid und 4'-O-Methyl-EC, sowie das Aglykon EC [Natsume et al., 2003]. Kahle et al. [2005] hingegen, konnten nach Gabe von Apfelsaft in der Ileostomaflüssigkeit von Probanden weder (+)-Catechin noch seine methylierten bzw. glukurondierte Metabolite detektieren. Monomere Flavan-3-ole werden allgemein schnell über den Urin ausgeschieden ($t_{1/2} = 1-7$ h) [Amelvoort et al., 2001; Manach et al., 2005]. Die Bioverfügbarkeit der monomeren Flavan-3-ole wird des Weiteren stark vom Galloylrest beeinflusst. Demnach sind Flavan-3-ole mit Galloylrest deutlich schlechter bioverfügbar [Amelvoort et al., 2001; Chen et al., 1997].

Kontrovers diskutiert wird auch die Resorption der polymeren Procyanidine. Deprez et al. [2001] und Kahle et al. [2007] berichten über eine intakte Aufnahme der Procyanidine bis zu einem bestimmten Oligomerisierungsgrad im Dünndarm. Die intakte unmetabolisierte Aufnahme von dimeren Procyanidinen in den Dünndarm von Ratten mittel *in situ* Perfusionsmodell konnten ebenso die Untersuchungen von Appeldoorn et al. [2009] zeigen. Andere Untersuchungen sprechen gleichzeitig für eine Spaltung der Procyanidine [Kahle et al., 2005; Zhu et al., 2002; Spencer et al., 2001]. Untersuchungen von Spencer et al. [2001] identifizierten als Abbauprodukt der Procyanidine Monomere und Phenolcarbonsäuren (z.B. Phenylpropionsäuren, Phenylelessigsäuren). Ebenso konnten Studien von Kahle et al. [2005] in der Ileostomaflüssigkeit von Patienten keine Procyanidine nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen möglichen Abbau hin. Bisher noch wenig untersucht ist der mikrobielle Metabolismus. Eine *in vivo* Studie mit Ratten zeigte, dass mit steigendem Oligomerisierungsgrad der mikrobielle Abbau der Procyanidine sinkt. Die antimikrobiellen Eigenschaften der Procyanidine wären hierfür eine mögliche Erklärung. Appeldoorn et al. [2009] vermuten einen anderen Abbauweg der Procyanidine, als den über die monomeren Flavan-3-ole, da keine Monomere der Flavan-3-ole detektiert werden konnten.

2.3.2.3 Dihydrochalkone

Die Dihydrochalkone Phloridzin und in marginalen Mengen auch das Aglykon Phloretin, sind typische Apfelinhaltsstoffe (siehe Abb. 2.17) [Kahle et al., 2005]. Dihydrochalkone entstehen durch Hydrierung der durch Ringöffnung in Chalkone überführten Flavanonglykoside [Belitz, 2001].

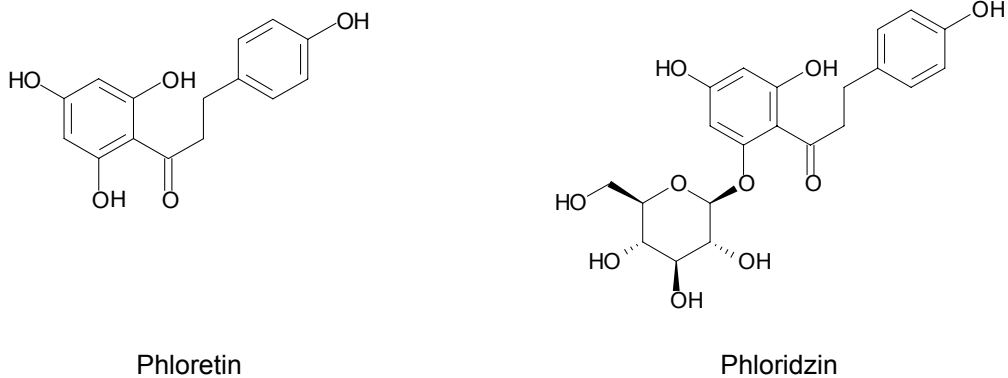


Abb. 2.17: Strukturen von Phloretin und Phloridzin [Kern et al., 2005]

Biologische Verfügbarkeit

Im Dünndarm findet hauptsächlich die Resorption der Dihydrochalkone statt. Crespy et al. [2001] konnten diese erstmals mit Hilfe eines *in situ* Perfusionsmodell nachweisen. Das Aglykon Phloretin und die Glukuronide und Sulfate des Phloretins konnten nach Gabe von Phloridzin nachgewiesen werden. Bestätigt wird diese Beobachtung von Marks et al. [2009]. So konnte nach Gabe von 500 ml Apfelsidre eine Plasmakonzentration des Metaboliten Phloretin-2'-O-Glukuronid von 73 nmol/l mittels HPLC-MS nachgewiesen werden. Da sich vergleichbare Konzentrationen im Plasma und Exkretionsraten im Urin bei gesunden Probanden als auch bei Ileostomapatienten fanden, wurde postuliert, dass es sich um eine Aufnahme über den Dünndarm handelt. Auf eine Hydrolyse von Phloridzin vor der Resorption deutet jedoch eine Untersuchung von Kahle et al. [2005] hin. So konnte in Versuchen neben dem Glucuronid auch das Aglykon Phloretin in der Ileostomaflüssigkeit detektiert werden.

2.3.3 Gesundheitsfördernde Wirkung von Apfelpolyphenolen

Zahlreiche Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von Früchten und ihren Polyphenolen führen zu der Erkenntnis, dass besonders Äpfel, die reich an polyphenolischen Verbindungen sind, ein hohes antioxidatives Potential aufweisen. Wobei die Apfelschale generell ein stärkeres antioxidatives und antiproliferatives Potential zeigt, als das Fruchtfleisch des Apfels [Wolfe et al., 2003 a, b]. Diese Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Schale des Apfels den größeren Anteil an bioaktiven Verbindungen stellt. Die antioxidative Aktivität nimmt demzufolge von der reinen Fruchtschale zum reinen Fruchtfleisch hin ab [Wolfe et al., 2003]. Die Strukturmerkmale der polyphenolischen Verbindungen gewährleisten bei einer Wasserstoff-Übertragung auf Radikale eine ausgeprägte Elektronen-delokalisierung, was eine erhöhte Stabilität und folglich eine geringe Reaktivität des Phenoxyradikals zur Folge hat.

Apfelextrakte haben in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen die Eigenschaft gezeigt, das Wachstum von humanen Tumorzelllinien zu hemmen [Fridrich et al., 2007 a; Veeriah et al., 2006; Gossé et al., 2005; Kern et al., 2005]. Hierbei zeigten Untersuchungen von Kern et al. [2005], dass ein polyphenolreicher Apfelsaftextrakt in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 nach 72 Stunden eine potente Wachstumshemmung hervorruft. Ein Apfelmaischeextrakt zeigte im Vergleich zum Apfelsaftextrakt eine geringere wachstumshemmende Wirkung auf HT29-Zellen [Fridrich et al., 2007 a]. Für Flavonole wurde ähnliches festgestellt, wobei nur Quercetin und nicht dessen Glykoside das Zellwachstum hemmen [Kern et al., 2005]. Eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Zellproliferation von Tumorzelllinien spielen der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), sowie die nachgeschaltete mitogenaktivierte (MAPK)-Signalkasade. Dabei wurden polyphenolreiche Apfelsaftextrakte sowie ausgewählte Einzelverbindungen als potente Inhibitoren des EGFR im zellfreien System identifiziert [Fridrich et al., 2007 a; Kern et al., 2005]. Eine Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR konnte durch Untersuchungen an HT29-Zellen mit polyphenolreichen Apfelsaftextrakten nachgewiesen werden. Die Inhibierung der Rezeptoraktivität wird mit einer Hemmung des Tumorzellenwachstums über den MAPK-Signalweg in Verbindung gebracht [Fridrich et al., 2007 a; Kern et al., 2005].

Untersuchungen von Veeriah et al. [2006] haben durch die Inkubation von HT29-Zellen mit Apfelsaftextrakt, eine Veränderung der Expression verschiedener Phase II-Enzyme aufgezeigt. Es war hierbei zu erkennen, dass der Transkript-Status der Glutathion-S-Transferasen (GSTs), sowie der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), deutlich erhöht wird. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der zelluläre Abwehrmechanismus durch Apfelpolyphenole moduliert werden kann und dadurch potentiell die Wirkung von Karzinogenen im Kolon reduziert wird. Auch Studien an humanen Kolonadenomzellen (LT97) haben ergeben, dass die Enzymaktivitäten von GSTs und UGT durch Apfelextrakte gesteigert wird [Veeriah et al., 2006]. Antioxidative Eigenschaften einzelner Polyphenole, sowie polyphenolreiche Apfelextrakte wurden von Schäfer et al. [2006 a] untersucht. Die Untersuchungen mit HT29- und Caco2-Zellen zeigen eine Verminderung Menadion-induzierter oxidativer DNA-Schäden durch polyphenolreiche Apfelextrakte. Eine erhöhte biologische Wirksamkeit gegenüber oxidativen DNA-Schäden zeigen auch die Inhaltsstoffe Rutin, (-)-Epicatechin und Kaffeesäure [Schäfer et al., 2006]. Die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole stehen laut Wild und Mulcahy [2000] im Zusammenhang mit einem erhöhten Glutathion-Spiegel.

Die signifikante Abnahme von 1,2-Dimethylhydrazin-induzierten DNA-Schäden in Mukosazellen des distalen Kolons, sowie der Kryptenzellproliferation, durch die Verabreichung von naturtrübem Apfelsaft konnte durch Studien an Ratten belegt werden [Barth et al., 2007; Barth et al., 2005]. Im distalen Rattenkolon konnte auch die Anzahl an sogenannten aberranten Krypten (ACF) durch Apfelsaft gesenkt werden. Dabei zeigte sich, dass klarer Apfelsaft im Vergleich zum naturtrübem Apfelsaft eine geringere Wirksamkeit aufwies [Barth et al., 2005; Barth et al., 2007]. Weitere Tierstudien von Sembries et al. [2006], bei denen Ratten oral Apfeltresterextraktionssaft verabreicht bekamen, zeigten im Kolon eine erhöhte Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren. Diese deuten auf eine protektive Wirkung gegen Kolonkrebserkrankungen hin [Sembries et al., 2006]. Untersuchungen von Gossé et al. [2005] an Ratten gaben weitere Hinweise auf die chemopräventiven Eigenschaften von Apfelextrakten. Eine aus Apfelsaftextrakten isolierte, procyanidinreiche Fraktion führte zu einer signifikanten Verringerung präneoplastischer Läsionen [Gossé et al., 2005].

Fazit: In zahlreichen *in vitro* Untersuchungen kann die antioxidative Wirkung einiger Apfelpolyphenole beobachtet werden. Aufgrund ihrer positiven Wirkung im Rahmen

der Chemoprävention leistet sie einen entscheidenden Beitrag zu den gesundheitsfördernden Eigenschaften der Apfelextrakte. Es bedarf jedoch weiterer *in vivo* Untersuchungen, um dieses Potential in Bezug auf den menschlichen Organismus genauer einschätzen zu können.

2.3.4 Polyphenolreiche Apfeltresterextrakte

Pflanzliche Nahrungsmittel werden in der Regel mit positiven gesundheitlichen Effekten in Verbindung gebracht. Auch Fruchtsäften kommt hierbei ein hoher Stellenwert zu. Vor allem Äpfel sind in Ländern wie Deutschland, Österreich, der Schweiz und einigen weiteren Ländern gemäßigter Klimazonen eine wichtige Rohware für die Fruchtsaftindustrie [Birus, 2001]. Apfelsaft nimmt mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 11,4 Liter im Jahr 2007 die führende Position unter den Fruchtsäften ein [Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie, 2008]. Als Pressrückstand fallen bei der Herstellung von Apfelsaft jährlich 100.000 – 300.000 t Nassrester an. Dieser kann zur Gewinnung von Biogas, Apfelpektin sowie zur Vieh- und Wildfütterung herangezogen werden [Carle und Schieber, 2006; Binnig, 2001]. Apfeltrester konnte bisher keiner weiteren sinnvollen Nutzung zugeführt werden. Bei der Saftgewinnung enthält der Pressrückstand jedoch noch eine hohe Konzentration an Polyphenolen. Aufgrund der möglichen krankheitsvorbeugenden Wirkung der Polyphenole gewinnt der Apfeltrester zunehmend an Interesse [Schieber et al., 2001; Carle und Schieber, 2006].

Mit Hilfe neuer Verfahren wird versucht vermehrt die im Apfeltrester befindlichen bioaktiven Komponenten zu isolieren und zu quantifizieren. In einem neuartigen Ansatz wurden so Apfeltrester von Carle et al. [2001] sowie Schieber et al. [2003] zur simultanen Pektin und Polyphenolgewinnung herangezogen (siehe Abb. 2.18). Um den Abbau von Pektin durch depolymerisierende Enzyme zu verhindern, wurde der Trester zunächst nach der Saftgewinnung getrocknet. Als weitere Aufarbeitungsschritte folgten die Extraktion des Pektins mit Mineralsäure und Aufkonzentrierung des Tresters, sowie die Auftrennung mittels eines unpolaren, lebensmitteltauglichen Adsorberharzes. Während der Festphasenextraktion wird der Großteil der phenolischen Verbindungen vom Adsorberharz gebunden. Das Pektin wird hingegen vollständig und ohne Retardierung von der Säule gespült. Nach Elution und anschließender Evaporation erfolgt schließlich die Gewinnung der

phenolischen Verbindungen. Das erhaltene Eluat wurde zur Stabilisierung der Polyphenole lyophilisiert [Carle und Schieber, 2006].

Bei der Herstellung von Pektin aus Apfeltrester (Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg) fällt solch ein polyphenolhaltiger Rohextrakt im Rahmen der Pektinschönung an. Dabei werden die zusammen mit dem Pektin isolierten Polyphenole mit einem Adsorberharz abgetrennt. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Carle (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim) wurde anschließend dieser Rohextrakt durch verschiedene Methoden aufgereinigt und aufkonzentriert. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Extrakte im Rahmen eines FEI/AIF-Projektes *in vitro* auf ihre antioxidativen Eigenschaften hin untersucht.

Aufgrund der Pektinextraktion mit Mineralsäure bei erhöhter Temperatur, unterscheidet sich dieser Tresterextrakt vom Polyphenolprofil her deutlich von Apfelsaftextrakten. Insbesondere der Gehalt an freien Aglyka ist im Tresterextrakt aufgrund der säurekatalysierten Spaltung durch den Einsatz von Mineralsäure bei der Pektinextraktion, deutlich erhöht. Wohingegen der Gehalt an Phenolcarbonsäuren niedriger ist, als in Apfelsaftextrakten.

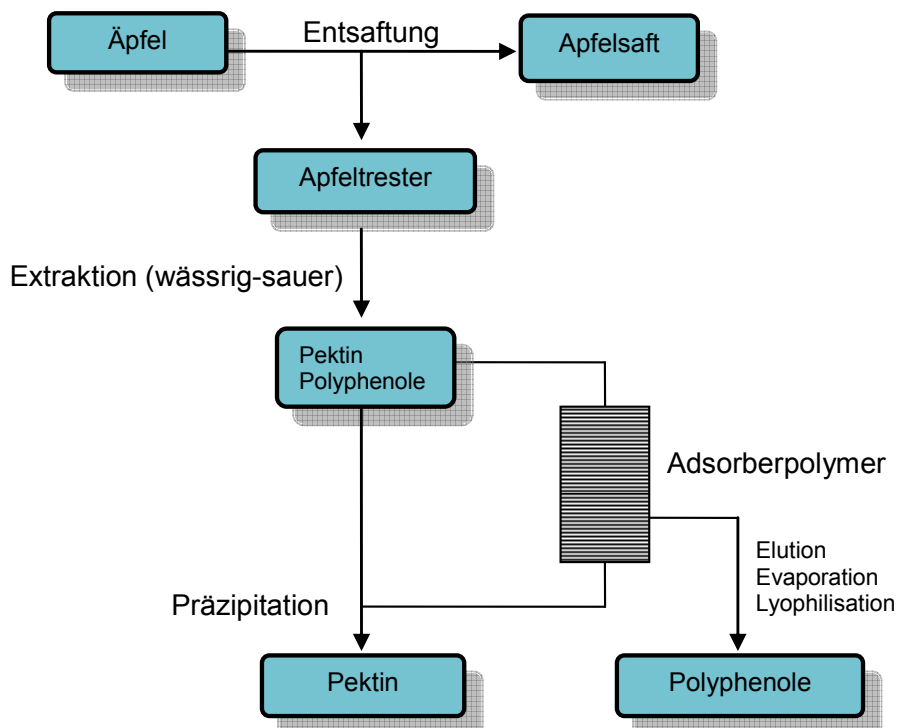


Abb. 2.18: Schema zur Gewinnung von Pektin und phenolischen Verbindungen aus Apfeltrester [modifiziert nach Schieber et al., 2003].

3 Problemstellung

In den westlichen Industrieländern gehört das kolorektale Karzinom geschlechtsunspezifisch zu den häufigsten Tumorarten. Daher wird der Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen mit chemopräventivem Potential ein bedeutender Stellenwert im Hinblick auf das wirtschaftliche, wissenschaftliche und öffentliche Interesse zugeschrieben.

Diese Funktion erfüllen insbesondere Substanzen mit polyphenolischer Struktur, die als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in Obst und Gemüse vorkommen. Als einheimische Frucht fällt hier dem Apfel eine besondere Rolle zu, da er neben großer Verbreitung und Verbrauch auch einen hohen Gehalt an Polyphenolen aufweist.

Trübem Apfelsaft und Apfelsaftextrakten konnte bisher ein antioxidatives und DNA-protektives Potential nachgewiesen werden [Schäfer et al., 2006 a, b]. Diese biologischen Eigenschaften der Apfelpolyphenole konnten durch *in vivo* Studien verifiziert werden [Barth et al., 2007, 2005; Gossé et al., 2005].

Bei der Pektinproduktion aus Apfeltrester fällt als Nebenprodukt ein polyphenolreicher Rohextrakt an, der bislang weder charakterisiert, noch auf seine biologische Aktivität hin untersucht wurde. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carle der Universität Hohenheim wurde der Rohextrakt über verschiedene Verfahren weiter aufgereinigt und die verschiedenen Extrakte charakterisiert. Diese Extrakte unterscheiden sich von bereits *in vitro* untersuchten Apfelsaftextrakten insbesondere durch einen hohen Gehalt an Dihydrochalkonen und freien Aglyka, wie Phloretin und Quercetin, sowie einem niedrigen Gehalt an Phenolcarbonsäuren.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Bestandteile der Apfeltresterextrakte mit einer Schutzwirkung gegen DNA-schädigende Agenzien zu identifizieren und diese in Zusammenarbeit mit der Uni Hohenheim durch entsprechende Aufreinigungsmethoden aus dem Tresterrohextrakt anzureichern bzw. unerwünschte Komponenten zu minimieren. Mit Hilfe eines zweistufigen Inkubationsprotokolls werden die Extrakte an der Kolonkarzinomzelllinie HT29, auf eine antioxidative und DNA-protektive Wirkung gegenüber dem Redoxcycler Menadion, untersucht. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist dabei die Aktivierung von Nrf2 und die damit verbundene Induktion von Enzymen der zellulären Abwehr, wie der γ -

Glutamylcysteinylgase, die für die *de novo* Synthese des zellulären Antioxidans Glutathion verantwortlich ist.

Der zweite thematische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Aktivitätshemmung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch Apfelpolyphenole.

Während der Tumorbildung kommt es häufig zu Veränderungen von Schlüsselementen zellulärer Signaltransduktionskaskaden. Die mitogenaktivierte Proteinkinasekaskade (MAPK-Kaskade), die an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt ist, stellt einen dieser Signalwege dar. Zu Beginn der MAPK-Kaskade befindet sich der EGFR, der als transmembraner Rezeptor, extrazelluläre Signale durch Aktivierung der Kinasekaskade in einen intrazellulären Wachstumsstimulus umsetzt [Thiel und Rössler, 2005; Djahansouzi et al, 2004; Peters, 2003]. In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Apfelpolyphenole das Tumorzellwachstum *in vitro* hemmen und die Aktivität des EGFR inhibieren [Fridrich et al., 2007 a, b; Kern et al., 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, welche Inhaltsstoffe der Apfelextrakte für die hochpotente Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR verantwortlich sind. Hierzu wurden verschiedene Apfelextrakte, aktivitätsgeleitete Fraktionierungen, apfelsaftmimetrische rekonstituierte Mischungen, sowie identifizierte Einzelverbindungen eingesetzt, die uns von Partnern des BMBF-geförderten Netzwerkes „Ernährung und Darmgesundheit“ zur Verfügung gestellt wurden.

Diese Frage wurde sowohl mittels isoliertem EGFR-Testsystem (ELISA), als auch mit Versuchen am EGFR der Vulvakarzinomzelllinie A431 versucht zu beantworten. Die Zelllinie A431 ist hierfür, aufgrund einer Überexpression des EGFR, gut geeignet [Carpenter, 1987].

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zytotoxische und wachstumshemmende Eigenschaften von polyphenolhaltigen Extrakten

Die Bestimmung von zytotoxischen, bzw. wachstumshemmenden Eigenschaften einer Substanz dient vor allem der Ermittlung des Konzentrationsbereiches für die Untersuchung weiterer biologischer Endpunkte, da eine Beeinflussung des Zellwachstums dort zu artifiziellen Ergebnissen führen könnte.

Hierzu wurden die Trypanblau-Auszählung und der Sulforhodamin B (SRB) Test [Skehan et al. 1990] als Standardverfahren herangezogen.

Es muss jedoch bei der Bestimmung der Zytotoxizität zwischen Langzeit- und Kurzeiteffekten unterschieden werden. Zytotoxizität ist ein Endpunkt, der bereits nach sehr kurzen Zeiträumen bestimmt werden kann, beispielsweise wenn die Zellmembran durch denaturierende Substanzen unspezifisch geschädigt wird. Wird dagegen das Zellwachstum spezifisch über Interaktion mit Rezeptoren oder Signalkaskaden gehemmt, oder es erfolgt Apoptoseinduktion so ist dieser Effekt erst nach mehrtägiger Inkubation messbar [Neuwirt et al., 2008]. In diesem Fall wird auch von Wachstumshemmung gesprochen. Zu beachten ist aber, dass kurzzeitige zytotoxische Effekte in einer Langzeitinkubation zu artifiziellen Ergebnissen führen können und eine potente Wachstumshemmung vortäuschen, obwohl die Zellen bereits innerhalb der ersten Stunde der Langzeitinkubation geschädigt wurden. Daher ist es angebracht bei einer auffällig potenten Wachstumshemmung, die in einer Langzeitinkubation ermittelt wurde, das Ergebnis durch einen Kurzzeit-Zytotoxizitätstest zu verifizieren.

4.1.1 Kurzzeit-Zytotoxizität

Die Trypanblau-Auszählung ist besonders für eine schnelle Bestimmung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen (Viabilität) bei Inkubationen geeignet, in denen zytotoxische Kurzzeit-Effekte im Vordergrund stehen. Vorteil der Methode ist die zusätzliche visuelle Kontrolle der Zellen beim Auszählen am Mikroskop, wie es beim SRB-Assay so nicht möglich ist. Die visuelle Kontrolle erlaubt eine Abschätzung über die Stärke der Zellschädigung, also ob die Zellen noch intakt oder bereits fragmentiert sind.

4.1.1.1 Zytotoxische Effekte des Speierlingextraktes RZ SP70

Der Speierling (*Sorbus domestica*) gehört zu der Familie der Rosenholzgewächse (*Rosaceae*). Er besitzt apfelförmige Früchte, deren Säfte gerne Apfelweinen zur Aromasteigerung beigesetzt werden [Will, Forschungsanstalt Geisenheim, persönliche Mitteilung]. Speierlingextrakte sind sehr reich an polyphenolischen Verbindungen und zeigten eine sehr potente Wachstumshemmung im SRB-Assay nach 72 h Inkubation. Da Speierlingextrakte aber auch reich an Gerbstoffen sind [Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim, persönliche Mitteilung], wurde der Speierlingextrakt Rebenzüchtung SP70 in einer Kurzzeitinkubation mittels Trypanblau-Auszählung auf mögliche zytotoxische Effekte untersucht. Das Inkubationsprotokoll wurde an die Western Blot Analyse angelehnt, da der Extrakt auf eine mögliche Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR im Zellsystem untersucht werden sollte. Nach einer 24 h Serumreduktion auf 1 % erfolgte die serumfreie Inkubation für 45 min an der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 für 45 min.

Wie in Abb. 4.1 zu sehen ist, wies der untersuchte Speierlingextrakt RZ SP70 in serumfreiem Medium nach 45 min ein konzentrationsabhängiges zytotoxisches Potential auf. In der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 µg/ml war noch keine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten. Ab 10 µg/ml war eine signifikante

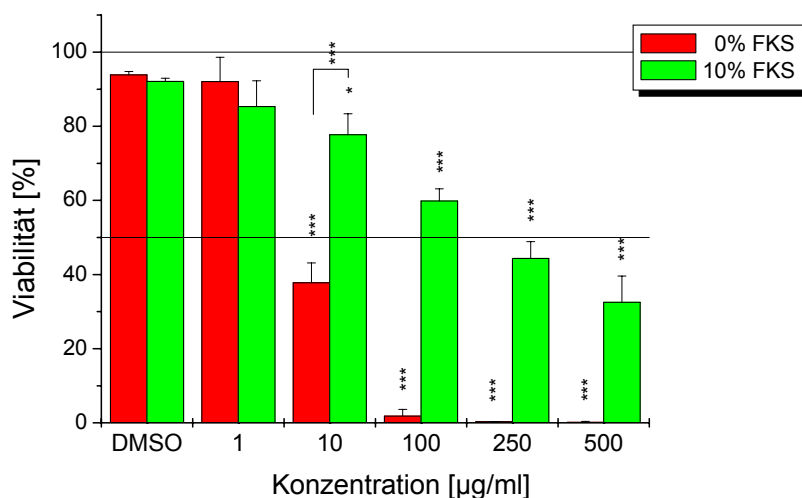


Abb. 4.1: Zytotoxische Effekte des Speierlingextraktes RZ SP70 in A431 Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase; 45 min Inkubation; MW ± SD von 3 unabhängigen Experimenten; *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO)

Abnahme der Viabilität auf ca. 40 % lebende Zellen zu sehen und im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg/ml waren nahezu keine lebenden Zellen mehr mikroskopisch auswertbar. In den zwei höchsten Konzentrationen (250, 500 µg/ml) lagen nur noch fragmentierte Zellen vor. Verglichen mit den Ergebnissen aus dem 72 h SRB-Test (IC_{50} -Wert: $82,6 \pm 16$ µg/ml, Daten nicht gezeigt) zeigte der Extrakt nach 45 min eine deutlich potentere zytotoxische Wirkung, obwohl erstmal anzunehmen wäre, dass bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden der Effekt hätte stärker ausgeprägt sein müssen. Daher wurde die Trypanblau Auszählung, analog zum SRB-Test, in serumhaltigem Medium wiederholt. Wie in Abb. 4.1 zu sehen ist, milderte das anwesende FKS die zytotoxische Wirkung des Extraktes signifikant ab, so dass die gemessene Wirkung in der Größenordnung der Daten aus dem SRB-Assay lag. Es war zwar auch eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität ab 10 µg/ml zu beobachten, doch waren bei dieser Konzentration, mit 80 % Viabilität, noch doppelt so viele lebende Zellen vorhanden, als ohne FKS. Im Konzentrationsbereich von 100 µg/ml bis 500 µg/ml sank die Viabilität von ca. 60 % auf ca. 30 % ab, wohingegen die Viabilität ohne FKS in diesen Konzentrationen annähernd bei 0 % lag.

4.1.1.2 Zytotoxische Eigenschaften des Apfelsaftextraktes AE06

Ebenso wie beim Speierlingextrakt ergaben sich beim Apfelsaftextrakt AE06 Hinweise auf zytotoxische Substanzeigenschaften. Als Vorversuch für die geplante Western Blot Analyse erfolgte eine Untersuchung auf Zytotoxizität analog dem Western Blot Inkubationsprotokoll, wie dies bereits beim Speierlingextrakt durchgeführt wurde. Der AE06 zeigte eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität ab 10 µg/ml, die Viabilität lag aber noch bei über 80 % (siehe Abb. 4.2). Ab einer Konzentration von 100 µg/ml kam es zu einem Einbruch der Lebendzellzahl und die Viabilität sank unter 20 %. Da von den Zytotoxizitätsuntersuchungen des Speierlingextraktes bekannt war, dass ein erhöhter Proteingehalt im Medium die Zytotoxizität der enthaltenen Gerbstoffe vermindert, erfolgte eine Wiederholung der Untersuchung, jedoch diesmal in Gegenwart von 0,5 % BSA. FKS konnte in diesem Fall nicht verwendet werden, da FKS Wachstumsfaktoren enthält, aber der EGFR bei der Western Blot Inkubation unstimuliert vorliegen muss. Aus diesem Grund wird bei

der Bestimmung der Autophosphorylierung mit serumfreiem Medium inkubiert. BSA dagegen stimuliert den EGFR nicht und konnte daher bei Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus des Rezeptors verwendet werden. Ein BSA-Gehalt von 0,5 % entspricht einem Proteingehalt von etwa 10 % FKS im Medium. Es zeigte sich, dass das Protein des BSA genauso wie FKS in der Lage ist die Gerbstoff-vermittelte Zytotoxizität des Extaktes signifikant zu vermindern. Eine signifikante Abnahme der Viabilität war erst ab 250 µg/ml zu beobachten.

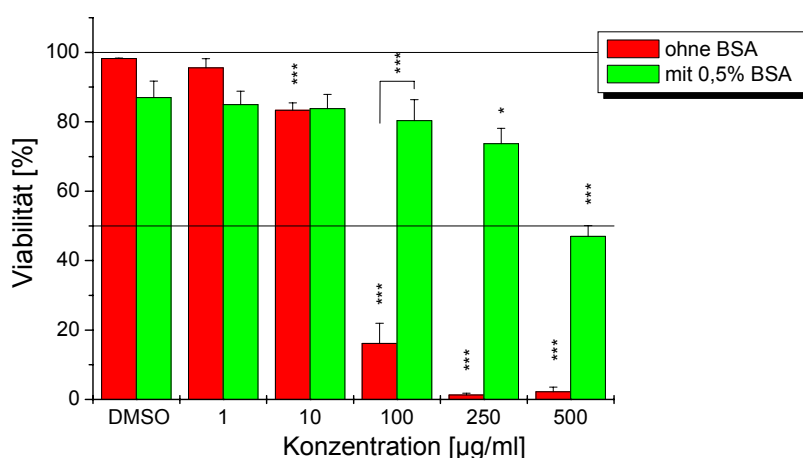


Abb. 4.2: Zytotoxische Effekte des Apfelsaftextraktes AE06 in A431 Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase; 45 min Inkubation, serumfrei; MW ± SD von 3 unabhängigen Experimenten; *:p<0,05; ***:p<0,001; bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO)

4.1.2 Zytotoxische Effekte von Apfeltresterextrakten

Mit dem SRB-Test nach Skehan et al. [1990] lassen sich wachstumshemmende und zytotoxische Effekte bestimmen. Die nach Ablauf der Inkubation noch lebenden Zellen werden mit 50%iger Trichloressigsäure (TCA) fixiert, während tote Zellen in den anschließenden Waschschrinen entfernt werden. Der eingesetzte Farbstoff Sulforhodamin B bindet an das fixierte Protein und kann nach Waschung und Trocknung durch Zusatz einer basischen Puffer-Lösung wieder von dem Zellprotein gelöst werden. Da innerhalb einer Zelllinie eine relativ konstante Korrelation zwischen Zellzahl und Proteingehalt besteht, lässt sich über eine anschließende photometrische Messung bei 570 nm eine Aussage über zytotoxische bzw. wachstumshemmende Substanzeigenschaften treffen. Die gemessenen

Absorptionswerte einer Platte werden zur Lösungsmittelkontrolle, die auf 100% festgelegt wird, ins Verhältnis gesetzt („test over control“, T/C). Allerdings ist eine Aussage über die Wachstumshemmung nur dann möglich, wenn die Inkubationsdauer über der Verdopplungszeit der verwendeten Zelllinie liegt. Da nur die relative Proteinmenge der lebenden Zellen ins Verhältnis gesetzt wird, ist keine Aussage möglich, ob die substanzbedingte Abnahme der Zelldichte durch Hemmung des Zellwachstums über proliferationsassoziierte Signalkaskaden oder durch kurzfristige (zytotoxische) Verminderung der Anfangszellzahl, sowie Mischformen aus beiden Faktoren, verursacht wurde.

4.1.2.1 Apfeltresterextrakte

Um bei weiterführenden zellulären Untersuchungen eine potentielle zytotoxische Beeinflussung des Zellwachstums durch Apfeltresterextrakte ausschließen zu können, wurden diese für 24 h an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg/ml in Hinblick auf ihr zytotoxisches Potential im SRB-Test untersucht. Für die Inkubation mit den Extrakten wurde serumhaltiges Medium verwendet, wie dies auch bei den weiteren Testsystemen mit 24 h Inkubationszeit verwendet wurde. Eine eindeutige Aussage über den Effekt auf die Proliferation konnte nach 24 h Inkubation aufgrund der Verdopplungszeit der HT29-Zellen von 40-60 Stunden nicht gemessen werden [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ].

Die untersuchten Apfeltresterextrakte zeigten im SRB-Assay nach 24 Stunden eine nahezu identische konzentrationsabhängige Verminderung der Zelldichte, wie in Abb. 4.3 zu erkennen ist. Nur die Extrakte 4 und 5 zeigten schon ab einer Konzentration von 200 µg/ml marginale zytotoxische Effekte. Ein potentes zytotoxisches Potential wiesen alle untersuchten Extrakte erst ab einer Konzentration von 300 µg/ml auf. Der IC_{50} -Wert wurde von allen Extrakten um 400 µg/ml erreicht (siehe Tabelle 4.1).

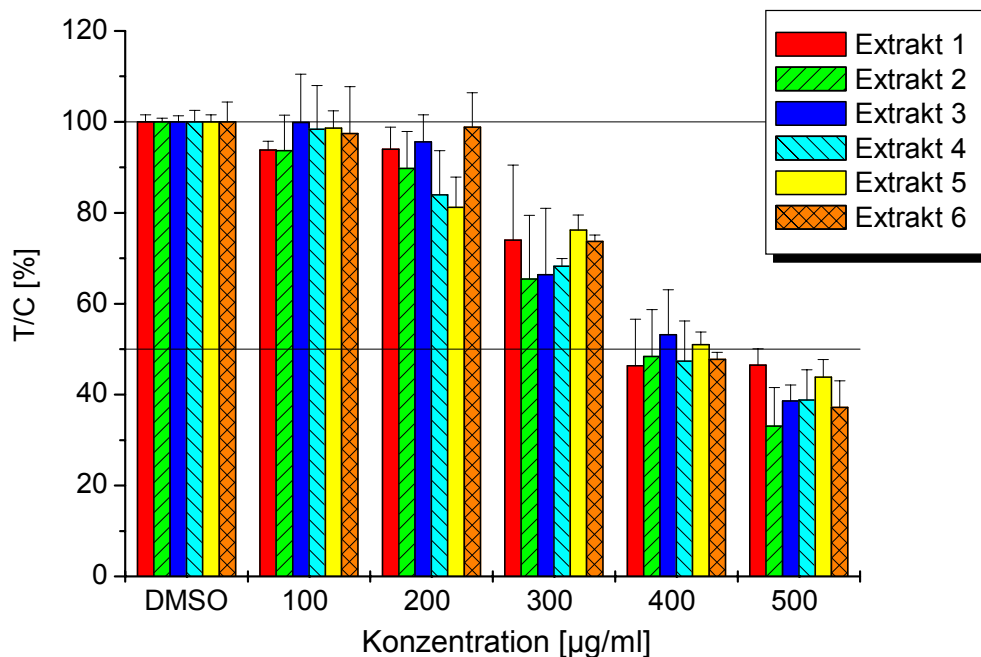


Abb. 4.3: Zytotoxische Wirkung auf HT29 Zellen durch Apfeltresterextrakte im Sulforhodamin B Test nach 24 h Inkubation, serumhaltig, in Gegenwart von 100 U/ml Katalase; MW \pm SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4.1: IC₅₀-Werte der im SRB-Test untersuchten Extrakte

Extrakt	IC ₅₀ -Wert [µg/ml]
1	387 \pm 23
2	393 \pm 19
3	419 \pm 16
4	398 \pm 68
5	425 \pm 89
6	397 \pm 62

Aufgrund der Ergebnisse zur Zytotoxizität wurde der Konzentrationsbereich für die zukünftigen zellulären Untersuchungen auf maximal 250 µg/ml begrenzt. Wie aus den Analysendaten (siehe Tabelle 4.2) ersichtlich wird, waren die Extrakte 1, 2, 3 und 6 von ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich, nur die Extrakte 4 und 5 besaßen ein deutlich verändertes Polyphenolprofil. Obwohl sich die Extrakte teilweise in ihrer Zusammensetzung unterschieden, zeigten alle untersuchten Extrakte eine annähernd identische Zytotoxizität. Das legte die Vermutung nahe, dass HT29-Zellen nach 24 h Inkubation unspezifisch auf unterschiedliche Extraktzusammensetzungen

Ergebnisse und Diskussion

reagieren. So konnten Veeriah et al. [2007] unter selben Inkubationsbedingungen an HT29-Zellen, für zwei verschiedene Apfelextrakte ebenfalls einen fast identischen zytotoxischen Konzentrationsverlauf ermitteln, wohingegen dieselben Extrakte sich an der Kolonadenomzelllinie LT97 in ihrem zytotoxischen Potential deutlich unterschieden (IC₅₀-Werte von 280, bzw. 430 µg/ml).

Tabelle 4.2 : Gehalte [mg/g] an monomeren Polyphenolen der aufgereinigten Extrakte aus der Pektinproduktion; n.n.: nicht nachweisbar [M. Fromm, Universität Hohenheim].

Substanz	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Protocatechusäure	2,33 ± 0,15	1,78	2,05	n.n.	3,58 ± 0,13	2,02 ± 0,11
3-Cumaroylchinasäure	2,82 ± 0,16	2,59	2,77	n.n.	1,95 ± 0,02	2,63 ± 0,13
Chlorogensäure	11,58 ± 0,89	9,59	10,61	n.n.	25,92 ± 0,08	13,87 ± 0,37
Kaffeesäure	0,85 ± 0,14	0,57	0,72	n.n.	3,32 ± 0,10	1,02 ± 0,04
4-Cumaroylchinasäure	4,71 ± 0,07	5,02	5,34	n.n.	7,97 ± 0,16	5,21 ± 0,23
5-Cumaroylchinasäure	5,76 ± 0,04	5,32	6,31	n.n.	9,12 ± 0,46	6,17 ± 0,27
p-Cumarsäure	4,65 ± 0,26	4,25	4,49	1,11 ± 0,01	7,78 ± 0,43	4,96 ± 0,14
Ferulasäure	6,05 ± 0,38	5,57	5,78	1,34 ± 0,03	11,41 ± 1,06	6,29 ± 0,09
Sinapinsäure	3,56 ± 0,05	3,6	3,86	n.n.	4,48 ± 0,23	3,85 ± 0,11
Quercetin-rutinosid	2,97 ± 0,07	3,27	3,46	n.n.	2,63 ± 0,10	3,328 ± 0,17
Quercetin-galactosid	14,36 ± 1,52	12,58	9,31	12,89 ± 0,22	20,28 ± 1,66	14,99 ± 0,29
Quercetin-glucosid	3,80 ± 1,02	2,07	0,96	6,07 ± 0,19	8,86 ± 0,67	3,51 ± 0,05
Quercetin-rhamnosid	9,78 ± 0,61	9,28	8,06	11,98 ± 0,20	2,74 ± 0,25	10,39 ± 0,27
Quercetin	12,59 ± 0,24	19,36	22,52	17,78 ± 0,29	n.n.	14,82 ± 1,12
Isorhamnetin-hexosid, berechnet als Glucosid	6,50 ± 0,28	7,38	7,55	2,32 ± 0,04	1,80 ± 0,15	7,13 ± 0,48
3-OH-Phloridzin	7,62 ± 0,70	5,68	4,85	7,91 ± 0,19	1,55 ± 0,04	7,74 ± 0,13
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	40,49 ± 1,44	34,48	28,78	16,94 ± 1,41	89,20 ± 1,42	48,47 ± 1,43
Phloridzin	283,64 ± 23,74	248,93	217,51	453,4 ± 43	29,92 ± 5,72	296,75 ± 6,41
Phloretin	6,63 ± 0,10	7,45	13,68	10,29 ± 1,3	n.n.	5,26 ± 0,18
Summe	430,69	388,8	358,6	542	225,7	458,4

4.1.3 Wachstumshemmende Eigenschaften von Apfeltresterextrakten

Der 72 h SRB-Test unterscheidet sich von dem 24 h SRB-Test nur in der Inkubationsdauer und daraus folgend, in einer veränderten Aussagekraft des Ergebnisses. Wie bereits erwähnt, sind Aussagen über einen Einfluss auf die Proliferation nur möglich, wenn theoretisch alle Zellen während der Inkubation die Möglichkeit zur Teilung haben, daher sollte die Inkubationsdauer mindestens eine Verdopplungszeit der verwendeten Zelllinie betragen. Es können daher bei einer Inkubationsdauer von 72 h und einer Verdopplungszeit der verwendeten HT29-Zellen von 40-60 Stunden Aussagen zum Einfluss der Extrakte auf die Proliferation gemacht werden.

In der Literatur wurden bereits mehrfach die wachstumshemmenden Eigenschaften von Apfelpolyphenolen auf Krebszellen beschrieben. Allerdings handelte es sich hierbei um Apfelsaft-, bzw. Apfelmaischeextrakte [Veeriah et al., 2006; Kern et al., 2005]. Die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Apfeltresterextrakte unterschieden sich von den Apfelextrakten durch ein verändertes Polyphenolprofil, bedingt durch das andere Ausgangsmaterial (Trester statt Saft) und die verfahrenstechnischen Aufarbeitungsschritte im Rahmen der Pektinproduktion. So fanden sich in den Apfeltresterextrakten höhere Gehalte an Phloridzin, Quercetinglykosiden und freien Aglyka, wie Phloretin und Quercetin, im Gegenzug waren sie ärmer an phenolischen Säuren, verglichen mit Apfelsaftextrakten.

Die Polyphenole werden zusammen mit dem Pektin aus dem Trester extrahiert. Bei der anschließenden Schönung des Pektins mittels Adsorberharzen fallen sie als polyphenolhaltiges Eluat an, aus dem durch anschließende Trocknung ein polyphenolhaltiger Rohextrakt erhalten wird.

Es sollte zunächst der Einfluss von drei verschiedenen Trocknungsverfahren, Sprühtrocknung (Extrakt HF1), Bandtrocknung (Extrakt HF2) und Gefriertrocknung (Extrakt HF3) auf wachstumshemmende Eigenschaften, als erster wichtiger Parameter für die biologische Aktivität, untersucht werden. Unabhängig vom Trocknungsverfahren zeigten alle 3 Extrakte moderate wachstumshemmende Effekte und unterschieden sich in ihren wachstumshemmenden Eigenschaften praktisch nicht.

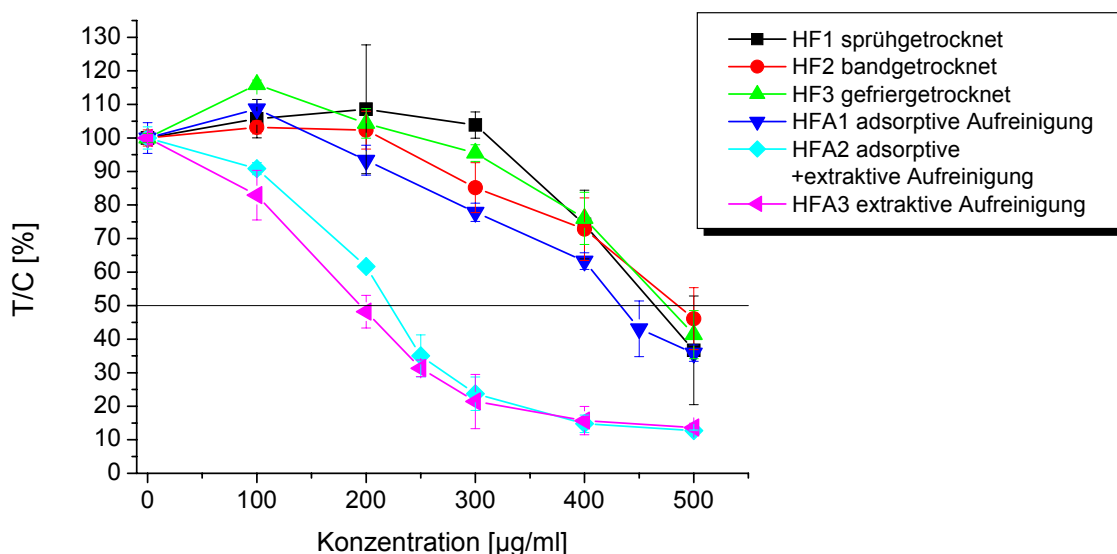


Abb. 4.4: Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Apfeltresterextrakte im Sulforhodamin B (SRB)-Test; 72 h Inkubation, serumhaltige Inkubation, 100 U/ml Katalase; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

Bei der weiteren Aufreinigung wurden drei Ansätze verfolgt. Entweder eine adsorptive Säulenaufreinigung mittels Amberlite® XAD 16 HP (Extrakt HFA1) oder eine Extraktion bei pH 1 mittels Ethylacetat (Extrakt HFA3) und die Kombination beider Methoden (erst Säulenaufreinigung, dann Extraktion; Extrakt HFA2).

Die Aufreinigung mittels Adsorberharz (Extrakt HFA1) bewirkte nur eine marginale Verstärkung der wachstumshemmenden Effekte gegenüber dem Rohextrakt, was auch im Einklang mit den Analysedaten stand, da sich der Gesamtpolyphenolgehalt (photometrische Bestimmung nach Folin-Ciocalteu, Universität Hohenheim) bei der Methode im Vergleich zum Rohextrakt um 3,2% verringerte. Dagegen wurde durch Extraktion mit Ethylacetat (HFA3) eine substantielle Verstärkung des wachstumshemmenden Potenzials erreicht (Abb. 4.4). Die Kombination beider Verfahren (HFA2) konnte keine weitere Steigerung des Effektes, gegenüber dem reinen Ethylacetat-Extrakt bewirken. Diese beiden letzten Extrakte erwiesen sich als äquipotent zu einem nativen Apfelsaftextrakt [Fridrich et al., 2007a]. Die Extraktion mittels Ethylacetat hat zu einer deutlichen Anreicherung des Gesamtpolyphenolgehaltes um bis zu 20% geführt. Beim Vergleich der Zusammensetzung des Rohextraktes mit dem Ethylacetat-Extrakt kam es, mit Ausnahme von Quercetin-3-rutinosid und Phloretin-2'-O-xyloglucosid, zu mindestens einer Verdopplung des Gehaltes an identifizierten Polyphenolen (siehe Tabelle 4.3).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.3: Gehalte [mg/g] an monomeren Polyphenolen des Rohextraktes und der aufgereinigten Extrakte aus der Pektinproduktion [Kammerer, Universität Hohenheim, 2006].

Verbindung	Originalprobe (Rohextrakt) HF1	Säulen-aufreinigung HFA1	Originalprobe + Ethylacetat HFA3	Säulenaufreinigung + Ethylacetat HFA2
Chlorogensäure	4,6	5,7	11,5	12,8
4-Cumaroylchinasäure	1,3	1,6	3,3	3,5
p-Cumarsäure	1,3	1,6	3,5	3,9
Ferulasäure	1,8	2,1	4,9	5,4
Sinapinsäure	0,8	0,9	1,9	2,1
Quercetin-3-rutinosid	3,1	3,8	n.b.	n.b.
Quercetin-3-galactosid	8,4	8,5	17,8	18,5
Quercetin-3-glucosid	4,1	4,7	9,9	10,3
Quercetin-3-rhamnosid	4,4	4,9	9,5	9,9
Quercetin	8,4	6,0	18,6	13,2
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	12,5	16,3	16,4	19,8
Phloridzin	98,8	127,2	289,7	308,7
Phloretin	3,0	2,6	6,3	6,0

Tabelle 4.4: Molare Konzentrationen der Einzelkomponenten in der höchsten eingesetzten Konzentration des Extraktes HFA3. Grau hinterlegt: Quercetin-Mischung; *kursiv*: in Gesamt-Mischung nicht enthalten, da nicht verfügbar.

Substanz	[μ M] bei 500 μ g/ml HFA3
Chlorogensäure	16,3
<i>4-Cumaroylchinasäure</i>	4,9
p-Cumarsäure	10,6
Ferulasäure	12,5
Sinapinsäure	4,3
Quercetin-galactosid	19,2
Quercetin-glucosid	10,6
Quercetin-rhamnosid	10,6
Quercetin	27,5
<i>Phloretin-2'-O-xyloglucosid</i>	14,1
Phloridzin	331,9
Phloretin	11,4

Um herauszufinden, in wie weit die bekannten Inhaltsstoffe des Extraktes HFA3 an der potenten Wachstumshemmung beteiligt sind, wurden äquimolare Mischung en aller identifizierten monomeren Polyphenole (Gesamtmischung; mit Ausnahme von 4-Cumaroylchinasäure und Phloretin-2'-O-xyloglucosid), sowie der enthaltenen Quercetinglykoside und des Quercetins (Quercetinmischung) hergestellt. Letztere diente dazu, den Anteil des Quercetin und seiner Glykoside an der Wachstumshemmung gegenüber den anderen Polyphenolen in der

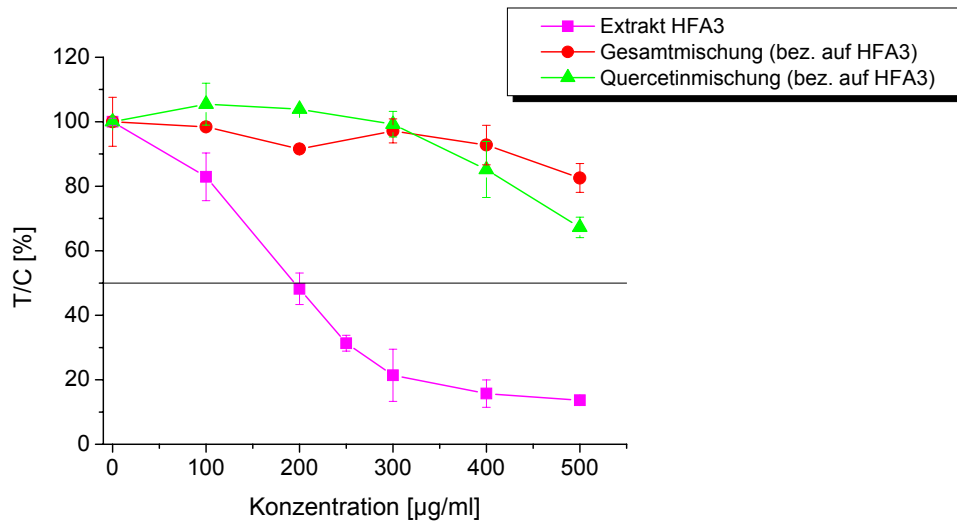


Abb. 4.5: Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch den Apfeltresterextrakt HFA3 und rekonstituierte Mischungen im Sulforhodamin B (SRB)-Assay; 72 h, serumhaltige Inkubation, 100 U/ml Katalase; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

Gesamtmischung besser abschätzen zu können, da Quercetin von Kern et al. [2005 a] als potenter Wachstumsinhibitor an HT29-Zellen beschrieben wurde. In Tabelle 4.4 sind die den Einzelsubstanzen zugrunde liegenden Molaritäten bei einer Extraktkonzentration von 500 µg/ml aufgeführt.

Jedoch zeigten beide äquimolaren Mischungen nur marginale wachstumshemmende Effekte (siehe Abb. 4.5), die sogar noch schwächer ausgeprägt waren, als bei den nicht aufgereinigten Rohextrakten HF1-3. Dieses Ergebnis zeigte klar, dass bislang nicht identifizierte Komponenten in den Apfeltresterextrakten maßgeblich zur Hemmung des Tumorzellwachstums beitragen.

4.1.4 Diskussion Zytotoxizität und Wachstumshemmung

Wie mittels Trypanblau-Auszählung gezeigt werden konnte, besitzen gerbstoffreiche Extrakte von Früchten des Speierlings potente zytotoxische Eigenschaften in A431-Zellen (siehe Abb. 4.1). Der IC_{50} -Wert für die Viabilität lag $<10 \mu\text{g/ml}$ bei einer 45 min Inkubation. Der Apfelsaftextrakt AE06 zeigte unter selben Bedingungen ein schwächer ausgeprägtes zytotoxisches Verhalten mit einem IC_{50} -Wert $<100 \mu\text{g/ml}$ (siehe Abb. 4.2). Ein erhöhter Proteingehalt im Kulturmedium bewirkte eine signifikante Reduktion der Zytotoxizität bei beiden Extrakten. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob FKS oder BSA eingesetzt wird, solange der Proteingehalt mengenmäßig vergleichbar ist. Diese Beobachtung ist mit der Reaktivität von Gerbstoffen gegenüber Proteinen erklärbar [Baxter et al., 1997]. Daher ist auch anzunehmen, dass die zytotoxische Wirkung durch eine Denaturierung der zellulären Membranproteine verursacht wurde und es dadurch zu einer massiven Schädigung der Zellmembran kam. Dies wurde auch durch die visuelle mikroskopische Beobachtung bestätigt, da besonders in den hohen Konzentrationen nur noch durch Trypanblau angefärbte Zellfragmente zu sehen waren. Ein höherer Proteingehalt im Medium schützte die Zellproteine, da ein großer Teil der Gerbstoffe bereits im Medium durch Proteine abgefangen wurde. Jedoch war diese protektive Kapazität auch beschränkt und bei hohen Gerbstoffkonzentrationen wurden auch zunehmend wieder Membranproteine denaturiert. Zudem schien die zytotoxische Wirkung der Gerbstoffe unabhängig vom Zelltyp zu sein, wie orientierende Messungen mit dem Speierlingextrakt an der Kolonkarzinomzelllinie HT29 ergeben haben. Dabei zeigten sich ebenfalls zytotoxische Effekte in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich, wie bei A431-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Wie Kern et al. [2005] bereits zeigen konnten, hemmte der Apfelsaftextrakt AE02 potent das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie HT29 im SRB-Test nach 72h. Eine spätere Wiederholung der Versuche unter Katalasezusatz (100 U/ml) zeigte, dass ein signifikanter Anteil der Wachstumshemmung dem artifiziell entstehenden Wasserstoffperoxid zuzuschreiben war, der untersuchte Apfelsaftextrakt aber mit einem IC_{50} -Wert von $188 \pm 35 \mu\text{g/ml}$ unter Katalasezusatz immer noch eine potente Wachstumshemmung aufwies [Fridrich et al., 2007 a].

So konnten verschiedene Studien zeigen, dass Polyphenole unter Zellkulturbedingungen H_2O_2 generieren. Die Anreicherung von H_2O_2 stellt ein

Problem dar, da diese artifizielle Effekte hervorrufen können und auch die Stabilität der zu testenden Substanz beeinflussen können [Kern et al., 2007]. Beiderseits können hieraus Fehlinterpretationen von Messergebnissen entstehen [Lapidot et al., 2002; Long et al., 2002]. Der Mechanismus über welche Reaktion H_2O_2 gebildet wird ist bislang noch unbekannt. Es wird vermutet, dass Puffersubstanzen des Zellkulturmediums, insbesondere Natriumbicarbonat, mit polyphenolischen Verbindungen reagieren und es dabei zur Bildung von H_2O_2 kommt [Bellion et al., 2009]. Um derartige Artefakte bereits im Vorfeld zu eliminieren erfolgten alle Zellinkubationen im Rahmen dieser Arbeit in Gegenwart von 100 U/ml Katalase.

Wachstumshemmende Eigenschaften auf Tumorzellen werden in der Literatur als eine positive, bzw. nicht explizit negative Substanzeigenschaft beurteilt [Veeriah et al., 2006; Kern et al., 2005]. Dabei ist die Modulation wachstumsassoziierter Signalkaskaden oder die Induktion von Apoptose, als Ursache der wachstumshemmenden Effekte gemeint und dies wird mit Hinblick auf eine mögliche antikanzerogene Wirkung als günstig beurteilt. Doch in das Ergebnis des SRB-Tests fließen auch andere Faktoren, wie zytotoxische Kurzeiteffekte mit ein. Diese können ohne ergänzende Versuche nicht erkannt und daher nie völlig ausgeschlossen werden. Dies wurde am Speierling-Extrakt deutlich. Dieser zeigte im SRB-Test eine hochpotente Wachstumshemmung an HT29-Zellen nach 72 Stunden mit einem IC_{50} -Wert von 83 $\mu\text{g/ml}$. Diese beobachtete Wachstumshemmung beruhte jedoch zum größten Anteil auf zytotoxischen Effekten, die sich innerhalb der ersten 45 min der 72h Inkubation ereigneten. Daher muss beim SRB-Test, wenn eine hochpotente Wachstumshemmung beobachtet wird, die für eine Substanz oder ein Extrakt als untypisch angesehen werden kann, immer noch ein Differentialabgleich mit anderen Zytotoxizitätstests vorgenommen werden, um das Ergebnis zu verifizieren oder eine bestimmte Interpretation der Ergebnisse zu untermauern. Daher wurde mit dem Apfelsaftextrakt AE06 auch kein 72 h SRB-Test durchgeführt, da selbst mit einem Proteingehalt auf FKS-Niveau (10%) noch zytotoxische Kurzzeit-Effekte zu beobachten waren.

Die durch unterschiedliche Verfahren hergestellten Apfeltrestereextrakte zeigten nach 24 h eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung an HT29-Zellen. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, unterscheiden sich die Extrakte in ihrer Wirkung nur marginal voneinander. Die aus dem Kurvenverlauf ermittelten IC_{50} -Werte der Extrakte lagen von 390 $\mu\text{g/ml}$ bis etwa 420 $\mu\text{g/ml}$ in einem sehr engen Bereich. Dies

mag neben der teilweise ähnlichen Extraktzusammensetzung, auch in der Inkubationsdauer von 24 h begründet sein, nach der proliferationsassoziierte Effekte zeitlich noch nicht voll zum Tragen kommen, sondern mehr rein zytotoxische Effekte. Bei der Betrachtung der Extrakt-Zusammensetzungen (Tabelle 4.2) wird ersichtlich, dass die Extrakte 1, 2, 3 und 6 eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen, was mit den nahezu identischen Herstellungsverfahren erklärbar ist. Unterschiede in der Zusammensetzung finden sich bei diesen Extrakten vor allem im Gehalt an freiem Quercetin, 3-OH-Phloridzin, Phloretin-2'-O-xyloglucosid, Phloridzin, und Phloretin. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Extrakten nicht groß genug, um sich signifikant durch eine unterschiedlich starke Hemmwirkung auf das Zellwachstums auszuwirken. Diese Annahme wurde auch von den Extrakten 4 und 5 bestätigt, da sie die größten Unterschiede bei der Herstellung und Zusammensetzung aufwiesen, aber auch keine veränderte Wirkung im SRB-Assay zeigten. Zur Herstellung der Extrakte 4 und 5 wurde der Rohextrakt wässrig gelöst, adsorptiv über eine XAD-16 Säule aufgereinigt und dann in eine „neutrale“ (Extrakt 4) und „saure“ (Extrakt 5) Komponente fraktioniert. Dazu wurde zuerst eine Ethylacetat-Extraktion bei pH 7 durchgeführt und dieser Extrakt noch mal bei pH 1 nachextrahiert. Extrakt 4 enthielt dadurch nur Spuren an phenolischen Säuren, aber dafür kam es zu einer potenten Anreicherung von Phloridzin (45 % Gesamtanteil am Extrakt). Diese Anreicherung war auch der Grund für den mit 542 mg/g höchsten Gesamtpolyphenolgehalt aller sechs Extrakte. Extrakt 5 war reich an Phloretin-2'-O-xyloglucosid, sowie an phenolischen Säuren, insbesondere an Chlorogensäure und wies aber im Vergleich zu allen anderen Extrakten den mit Abstand niedrigsten Gehalt an Phloridzin auf. Zudem war er frei von Quercetin und besaß mit 226 mg/g den niedrigsten Gesamtpolyphenolgehalt aller sechs Extrakte.

Die phenolischen Säuren können nur einen marginalen Einfluss auf das Zellwachstum nehmen, da zwischen Extrakt 4 und 5 kein Unterschied in der Modulation des Zellwachstums zu beobachten war. Zudem sind wachstumsmodulierende Eigenschaften bei den phenolischen Säuren nur schwach ausgeprägt, wie Kern et al. [2005] herausfanden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Chlorogensäure und Kaffeesäure nach 72 h das Wachstum von HT29-Zellen nur marginal hemmen (IC_{50} -Wert: 205 ± 53 , bzw. $132 \pm 19 \mu\text{M}$). In der höchsten Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt 5 lag die Chlorogensäure mit 37 μM Endkonzentration im Medium vor, die Kaffeesäure sogar nur mit 9,2 μM . Auch die

enthaltene Protocatechusäure zeigt nur marginale Wirkung auf das Zellwachstum [72 h; IC₅₀ Wert: >300 µM; Diplomarbeit Julia Reichert]. Die restlichen phenolischen Säuren lagen in so geringen Konzentrationen vor, dass ein Einfluss auf das Zellwachstum als unwahrscheinlich angesehen werden muss.

Die enthaltenen Quercetinglycoside wurden bereits in isolierter Form an HT29-Zellen untersucht und dabei zeigte keines der untersuchten Glycoside (-Glucosid, -Rhamnosid, -Galactosid und -Rutinosid) eine Wirkung auf das Zellwachstum bis 300 µM. Lediglich das freie Quercetin zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 52 ± 11 µM wachstumshemmende Eigenschaften [Kern et al., 2005]. Extrakt 3 enthielt mit 22,5 mg/g den höchsten Gehalt an freiem Quercetin. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml lag eine Endkonzentration von 33,2 µM an Quercetin vor. Somit könnte freies Quercetin einen Beitrag zu der Hemmwirkung des Extrakts 3 leisten.

Die in den Extrakten, mit Ausnahme von Extrakt 5, mengenmäßig überwiegende Komponente, war das Phloridzin. Es zeigt bis 300 µM keinen Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 72 h [Kern et al., 2005]. Extrakt 4 enthielt mit 453 mg/g die höchste Menge an Phloridzin, was einer Endkonzentration von 520 µM bei 500 µg/ml Extrakt entspricht. In dieser Konzentration kann nicht ausgeschlossen werden, dass Phloridzin an der Wachstumshemmung von Extrakt 4 beteiligt war, da die Beeinflussung von HT29-Zellen nur bis 300 µM getestet wurde [Kern et al., 2005]. Die Extrakte 1, 2, 3 und 6 weisen dagegen nur einen etwa halb so hohen Gehalt an Phloridzin auf, weshalb die Menge an Phloridzin im Inkubationsansatz unter 300 µM lag und der Phloridzinanteil in den erwähnten Extrakten als wirkungslos angesehen werden muss. Auch das Aglykon Phloretin besitzt einzeln betrachtet bestenfalls bei Extrakt 3 einen marginalen Einfluss auf das Zellwachstum, da dieser mit 13,7 mg/g den höchsten Gehalt an Phloretin besaß. Die Endkonzentration an Phloretin bei 500 µg/ml betrug 25 µM und lag damit deutlich unter dem von Kern et al. [2005] ermittelten IC₅₀-Wert von 89 ± 18 µM.

Die Wirkung einzelner Polyphenole in den Extrakten lässt in hohen Konzentrationen einen gewissen Anteil an der Gesamtwachstumshemmung erwarten, wobei überadditive oder synergistische Effekte durch das Zusammenwirken mehrerer Inhaltsstoffe als sehr wahrscheinlich angesehen werden können. Zum anderen wurden bislang nur ~40 % der polyphenolischen Extraktinhaltsstoffe identifiziert. Insbesondere lagen keinerlei Informationen über die nichtmonomeren Bestandteile

vor. Hierzu zählen insbesondere die oligomeren Procyanidine, sie werden in der Literatur als starke Wachstumsinhibitoren beschrieben. Neuwirt et al. [2008] beschrieben die wachstumshemmenden und Apoptose-induzierenden Effekte auf Prostata-tumorzellen nach 48 h, während Ye et al. [1999] von wachstumshemmenden Eigenschaften auf Tumorzelllinien aus Brust (MCF-7), Lunge (A-472) und Magen (CRL-1739) berichteten. Hierbei zeigte sich, dass die oligomeren Procyanidine potent das Wachstum der Tumorzelllinien in Konzentrationen bis 50 µg/ml hemmen. Auch weitere Autoren berichteten von wachstumshemmenden Eigenschaften von Procyanidinen [Fridrich et al., 2007 b; Faria et al., 2006; Gossé et al., 2005; Touriño et al., 2005]. Es ist daher als wahrscheinlich anzusehen, dass möglicherweise enthaltene oligomere Procyanidine einen entscheidenden Beitrag zu den zytotoxischen Eigenschaften der Extrakte beitragen.

Die These der noch unidentifizierten Inhaltstoffe wurde insbesondere durch die Versuche mit der 72 h Inkubation bestätigt. Die drei unterschiedlich getrockneten Rohextrakte zeigten bei der Wachstumshemmung, entsprechend ihrer praktisch identischen Zusammensetzung, denselben Verlauf. Die Säulenaufreinigung führte zu keiner Zunahme des Gesamtpolyphenolgehaltes und die Zusammensetzung der analysierten Polyphenole änderte sich nur marginal. Es kam sogar zu einer Abreicherung einzelner Komponenten, wie Quercetin und Phloretin.

Die Extraktion mit Ethylacetat (HFA3) führte zu einer Erhöhung des Gesamtpolyphenolgehaltes um etwa 20 % gegenüber dem Rohextrakt, die Gehalte an analysierten Einzelkomponenten haben sich aber verdoppelt. Somit müssen sich verschiedene Bestandteile in unterschiedlichem Maße bei der Extraktion angereichert haben. Zudem war die Zusammensetzung von Extrakt HFA3 mit der von den neuen Apfeltrestereextrakten, die im 24 h SRB-Test untersucht wurden, vergleichbar, wo bereits ausführlich der mögliche Anteil von Einzelkomponenten diskutiert wurde. Hierbei wurde klar ersichtlich, dass die Einzelkomponenten bestenfalls in den höchsten eingesetzten Inkubationskonzentrationen für einen marginalen Teil der Wachstumshemmung verantwortlich sein dürften. Lediglich synergistische Effekte wären noch eine Erklärung für eine maßgebliche Beteiligung der bisher bekannten Einzelkomponenten an der gemessenen Wachstumshemmung.

Diese These konnte jedoch durch Versuche mit rekonstituierten Mischungen weitestgehend widerlegt werden. Eine Mischung enthielt alle analysierten und

verfügbaren monomeren Polyphenole („Gesamtmischung“) und die zweite Mischung enthielt nur Quercetin und seine Glycoside („Quercetinmischung“) in den entsprechenden äquimolaren Konzentrationen des Extraktes HFA3. Der Extrakt wurde ausgewählt, da er von den aufgereinigten Extrakten die potenteste Hemmung des Zellwachstums (siehe Abb. 4.4) und der PTK-Aktivität am isolierten EGFR bewirkte.

Dabei zeigten beide Mischungen lediglich eine marginale Wachstumshemmung nach 72 h, die nicht mit der des gesamten Extrakts vergleichbar war. Der Anteil der Summe der Einzelkomponenten an der Wachstumshemmung wäre hierbei mit einem additiven bis überadditiven Mechanismus beschreibbar, jedoch ist ein synergistischer Effekt auszuschließen. Bei analogen Versuchen mit rekonstituierten Mischungen eines Apfelsaftextrakt konnten Kern et al. [2005] ebenfalls beobachten, dass rekonstituierte Extrakte nur eine marginale Wirkqualität im Vergleich zum nativen Extrakt aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Apfeltresterextrakte, insbesondere nach einer Aufkonzentrierung mit Ethylacetat nach 24 h und 72 h das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie HT29 hemmen. Es konnte jedoch bislang nicht geklärt werden, welche(r) Inhaltstoff(e) für diese Wirkung verantwortlich ist/sind.

Die untersuchten Apfeltresterextrakte sind bei einer 24 h Inkubation bis zu einer Konzentration bis 250 µg/ml einsetzbar, ohne dass eine Verfälschung von Messergebnissen weiterer, anstehender Untersuchungen befürchtet werden müsste. Problematisch ist die potente Kurzzeittoxizität vom Speierlingextrakt und vom Apfelsaft AE06, da durch die proteindenaturierende Wirkung auch schon in geringen Konzentrationen eine Verfälschung von Messungen mit zellulären Proteinen, die mit der Zellmembran assoziiert sind, befürchtet werden müsste, weswegen mit den nativen Extrakten von Speierling und AE06 keine weiteren Versuche durchgeführt wurden.

4.2 Modulation der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors durch Apfelpolyphenole

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) spielt in Säuger-Zellen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellwachstums. Es konnte bisher gezeigt werden, dass Apfelpolyphenole potente Inhibitoren des EGFR, als Schlüsselement wachstumsassoziierter Signalkaskaden darstellen [Kern, et al, 2005; Fridrich, et al., 2007 a]. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag bei der Aufklärung, welche Polyphenole komplexer Apfelextrakte für die Wirkqualität verantwortlich sind, insbesondere mit Blick auf die Sortenauswahl, die Herstellung und die Zusammensetzung des Extraktes. Die zu untersuchenden Einzelsubstanzen, Fraktionen und Extrakte wurden erst am isolierten EGFR mittels ELISA untersucht um zu verifizieren, ob überhaupt die Fähigkeit besteht, die Tyrosinkinaseaktivität am Rezeptor zu modulieren. Da jedoch Versuche am isolierten Rezeptor nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen und wesentliche Faktoren, wie zelluläre Aufnahme, Metabolisierung, etc. unberücksichtigt bleiben, wurden in einem weiteren Schritt die potenten Testsubstanzen mittels Western Blot Analyse auf ihr mögliches Hemmpotential der EGFR-Aktivität in der intakten Zelle getestet.

Als Positivkontrolle wurde der EGFR-spezifische Hemmstoff Tyrphostin AG1478 (4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin) in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, siehe Abb. 4.6 [Osherov und Levitsky, 1994; Osherov et al., 1993; Faaland et al., 1991]. Die Positivkontrolle wurde in den nachfolgenden Messungen stets mitgeführt, jedoch nicht immer mit abgebildet.

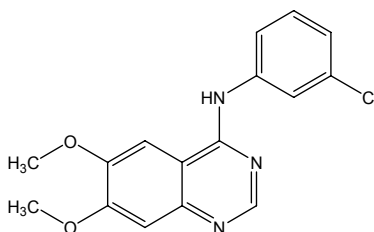


Abb. 4.6: Struktur von Tyrphostin AG1478, spezifischer EGFR Inhibitor [Osherov und Levitsky, 1994].

4.2.1 Apfelsaftextrakte

Die bisher am EGFR untersuchten Apfelsaftextrakte waren immer „Mischextrakte“, die aus mehreren verschiedenen Apfelsorten hergestellt wurden. Dazu wurden zunächst Säfte aus verschiedenen Apfelsorten eines Jahrganges sortenrein hergestellt. In den trüben Saft erfolgte zum Schutz vor Oxidation eine Zugabe von 200 mg/l Ascorbinsäure. Die naturtrüben Säfte wurden nach Kurzzeiterhitzung (85°C, 30-40 sec) in Edeltanks eingelagert. Zur Herstellung des Extraktes wurde der naturtrübe, bzw. geklärte (Fructozym P) Saft auf eine mit Adsorberharz (XAD16HP) gepackte Säule gegeben. Die Polyphenole wurden von der Säule adsorptiv zurückgehalten, während zum Entfernen der übrigen Apfelsaftinhaltsstoffe (Zucker, organische Säuren, Mineralien) diese nach der Aufgabe des Saftes wiederum mit destilliertem Wasser gespült wurde. Zur Elution der polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffe wurde die Säule anschließend mit 96%igem vergällten Ethanol gespült. Das braune bis hellgelbe Eluat des Apfelsaftes wurde gesammelt und anschließend am Rotationsverdampfer soweit eingeengt, bis kein Ethanol mehr enthalten war. Der eingeengte Apfelsaftextrakt wurde anschließend gefriergetrocknet. Die Forschungsanstalt Geisenheim stellte pro Jahr einen Apfelsaftextrakt für das Kooperationspartner im „Apfelnetzwerk“ her (z.B. AE04: Apfelsaftextrakt aus dem Jahr 2004) [BMBF-Netzwerk, Ernährung und Darmgesundheit, Zwischenbericht 2005; Kern et al., 2005].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals sortenreine Apfelsaftextrakte untersucht, wobei der Fokus bei der Frage lag, welchen Einfluss die Sorte, insbesondere der Vergleich von Tafel- und Mostapfel, sowie verschiedene Herstellungsverfahren auf die biologische Aktivität der erzeugten Extrakte haben. Hierbei ging es speziell um die Verwendung eines klaren und parallel eines trüben Saftes einer Sorte bei der Extrakterstellung. Zusätzlich wurde neben dem bereits erwähnten Säulenmaterial noch ein weiteres Adsorberharz (Sepabeads SP70) getestet, so dass von jeder Sorte vier verschiedene Extrakte zur Verfügung standen (XAD16/trüb, XAD16/klar, SP70/trüb, SP70/klar).

Da sich bei vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hatte, dass oligomere Procyanidine potente Inhibitoren der Autophosphorylierung des EGFR darstellen, sollte gezielt der Einfluss dieser Verbindungsklasse auf die Wirkqualität der EGFR-Hemmung durch Apfelextrakte näher untersucht werden [Fridrich et al., 2007 b].

Hierzu wurden zwei unterschiedlich rekonstruierte Extrakte mit dem dazugehörigen nativen Apfelmischsaftextrakt (AE04) verglichen. Beide rekonstituierten Extrakte enthielten (fast alle) analysierten Einzelsubstanzen des nativen Extraktes, wobei ein Extrakt die oligomeren Procyanidine enthielt, während im anderen der Procyanidinanteil durch Glucose substituiert war.

4.2.1.1 Hemmung des EGFR durch sortenreine Apfelsaftextrakte

Die sortenreinen Apfelsaftextrakte wurden je aus einem klaren und einem trüben Saft über jeweils zwei unterschiedliche Adsorberharzsäulen (SP70 und XAD16HP) erzeugt, so dass pro Apfelsorte vier unterschiedliche Extrakte vorlagen. Die verwendeten Apfelsorten zählen bis auf die Sorte Topaz zu den Mostäpfeln, die allgemein als polyphenolreich beschrieben werden [Hümmer et al., 2008; Kahle, et al., 2005]. In der Zusammensetzung unterschieden sich die Extrakte von Most- und Tafelapfel insbesondere im Gehalt an monomeren Polyphenolen (siehe Tabelle 4.5). Aufgrund der großen Anzahl an sortenreinen Extrakten wurde der EGFR-ELISA (96-Lochformat) zur Bestimmung der Hemmwirkung auf die Phosphotyrosinkinase (PTK)-Aktivität des EGFR gewählt. Im zellfreien System zeigten alle untersuchten sortenreinen Apfelsaftextrakte eine potente Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR (siehe Abb. 4.7). Mit IC_{50} -Werten von 0,5 bis 6,7 $\mu\text{g/ml}$ lagen die Wirkqualität im Bereich von verschiedenen, bereits untersuchten Apfelextrakten [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007 a].

Bei der Betrachtung der einzelnen sortenreinen Apfelextrakte schienen tendenziell Mostapfelextrakte, die über eine SP70-Säule generiert wurden, im zellfreien Testsystem bessere EGFR-hemmende Eigenschaften zu besitzen, was jedoch nicht mit der Extrakt-Zusammensetzung erklärt werden konnte, da sich die Gehalte an analysierten Bestandteilen zwischen den zwei Säulentypen bei gleichem Ausgangssaft nur marginal voneinander unterschieden und auch nicht klar mit dem Messergebnis korrelierten. Die Mostapfelextrakte zeigten im Vergleich der Hemmwirkung keinen Unterschied des Ausgangsmaterials, also ob der Extrakt aus einem trüben oder klaren Saft erzeugt wurde, obwohl unabhängig vom Säulentyp mit trüben Säften höhere Gehalte an Polyphenolen im Extrakt realisiert werden können.

Tabelle 4.5: Polyphenolprofil [mg/g] der sortenreinen Apfelsaftextrakte, n.d.: nicht detektierbar [Melanie Oik, Forschungsanstalt Geisenheim, 2008]

Substanz	Topaz XAD16		Topaz SP70		Bohnapfel XAD16		Bohnapfel SP70		Erb. Hofer XAD16		Erb. Hofer SP70		Gehr. Rambour XAD16		Gehr. Rambour SP70		Börtl. Weinapfel XAD16		Börtl. Weinapfel SP70		Bitterfelder XAD16		Bitterfelder SP70	
	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb
Procyanidin B1	6,8	8,2	3,1	0,0	7,2	10,0	7,8	9,9	4,6	4,6	4,0	4,8	5,6	5,1	3,1	4,3	5,0	6,7	5,5	6,5	2,6	3,7	2,3	3,1
Procyanidin B2	8,1	8,8	5,2	2,7	23,4	28,9	25,1	27,7	11,5	13,5	9,4	11,9	34,0	37,6	22,1	30,6	12,9	16,1	14,1	15,0	10,1	14,7	9,1	10,8
Procyanidin C1	0,9	0,0	0,0	0,0	6,9	8,7	10,3	12,2	2,7	4,4	1,9	3,9	13,6	11,6	7,7	8,3	2,5	5,3	5,9	4,5	4,9	6,0	4,4	4,8
Catechin	3,9	4,5	0,0	0,3	7,8	8,9	9,0	9,9	7,4	8,0	7,4	8,0	10,2	8,5	7,1	6,9	10,5	12,2	11,7	12,1	9,4	10,1	9,3	9,7
Epicatechin	6,8	9,6	4,8	4,1	24,6	31,2	27,6	32,0	11,1	12,8	8,7	11,4	39,2	33,7	23,0	24,4	14,5	18,6	16,2	16,3	12,3	15,7	12,1	13,1
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	11,1	11,8	9,3	1,3	92,7	101,5	95,5	108,4	91,4	90,8	85,8	89,3	68,3	62,4	57,0	58,7	31,2	33,9	30,0	34,5	29,5	30,2	30,9	31,4
Phloridzin	6,7	7,0	6,2	10,1	12,7	13,7	13,7	15,0	17,8	17,6	16,8	17,4	12,3	11,5	10,7	11,0	43,4	49,5	41,6	45,0	32,5	35,5	35,1	37,4
unbekanntes Dihydrochalcon	10,6	11,9	9,5	13,5	10,5	13,6	11,4	14,6	13,7	14,3	12,8	16,4	11,5	11,1	8,7	9,9	7,3	5,5	7,1	8,2	3,7	4,4	5,2	5,7
Σ Flavonole & Dihydrochalcone	54,9	61,8	38,1	49,9	185,9	216,6	200,2	229,6	160,3	166,1	146,8	163,1	194,6	181,5	139,4	154,1	127,2	147,7	132,0	142,2	105,0	120,5	108,3	116,1
Kaffeensäure	0,0	0,1	0,0	0,0	11,9	10,6	11,7	11,4	3,1	2,2	4,8	2,4	2,7	0,9	3,3	0,9	7,8	6,1	7,8	6,0	3,5	2,9	5,9	3,3
p-Cumarsäure	1,1	0,2	0,4	1,0	0,6	0,7	0,6	0,6	2,5	2,3	1,0	2,2	1,9	1,7	1,3	1,4	2,6	0,6	2,9	0,5	1,2	1,1	3,1	1,2
Chlorogensäure	39,5	59,0	42,5	49,6	107,8	124,3	117,5	132,6	158,0	163,3	151,5	166,2	158,2	165,0	157,3	164,3	111,7	125,6	110,4	127,9	120,5	133,7	116,2	126,5
Kryptochlorogensäure	7,8	1,0	2,7	1,2	3,2	3,7	3,8	4,2	10,9	10,9	11,0	11,6	9,2	8,5	7,8	8,1	12,8	14,0	14,0	14,8	12,7	13,8	13,4	15,0
3-Cumaroylchinasäure	0,9	1,1	0,9	5,4	4,2	5,0	4,6	5,3	3,9	3,9	3,6	4,0	8,0	7,4	6,5	7,0	10,1	11,4	9,5	9,9	8,7	9,5	8,8	9,8
4-Cumaroylchinasäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,9	26,0	25,8	29,0	72,8	72,2	69,2	74,3	78,7	72,9	67,4	71,7	106,9	123,7	108,0	121,9	81,6	88,4	83,2	94,9
5-Cumaroylchinasäure	2,9	4,9	3,0	5,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	3,9	3,4	3,4	3,7	4,9	3,9	4,5	
Cumaroylglucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	0,3	0,3	0,4	0,7	0,7	1,0	0,8	0,7	0,5	0,7	0,6	1,0	0,9	1,5	1,1	0,8	0,8	1,2	1,1
Σ Phenolcarbonsäuren	52,2	66,4	49,5	62,3	150,0	170,5	164,3	183,6	252,0	255,5	242,0	261,5	259,4	256,9	244,2	254,0	256,3	286,2	257,5	285,7	232,6	255,0	235,6	256,3
Quercetin-3-galactosid	0,2	0,7	0,5	0,9	0,8	1,7	1,0	1,8	0,4	0,6	0,1	0,6	0,6	0,9	0,1	0,8	0,1	1,0	0,1	0,8	0,4	1,0	0,0	1,0
Quercetin-3-glucosid	0,1	0,0	0,1	0,2	0,5	0,5	0,5	0,6	0,4	0,5	0,4	0,5	0,8	0,7	0,6	0,6	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Quercetin-3-xylosid	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,7
Quercetin-3-arabinosid	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	1,0	0,3	1,1	0,3	0,8	0,0	1,0	0,5	0,7	0,2	0,9	0,0	0,9	0,1	0,8	0,2	0,9	0,2	1,2
Quercetin-3-rhamnosid	2,2	0,2	1,9	2,9	2,1	2,5	2,4	2,7	0,9	0,9	0,9	0,9	2,5	2,3	2,1	2,1	0,6	1,1	1,0	0,7	0,9	1,0	1,0	1,0
Σ Flavonole	2,5	0,9	2,5	4,4	3,7	6,2	4,5	6,5	2,5	3,1	1,7	3,3	4,8	4,9	3,4	4,8	1,3	4,0	1,9	3,1	2,3	3,8	2,1	4,2
Σ Polyphenole	109,6	129,1	90,1	116,6	339,6	393,3	369,0	419,7	414,8	424,7	390,5	427,9	458,8	443,3	387,0	412,9	384,8	433,9	391,4	431,0	339,9	379,3	346,0	376,6

Ergebnisse und Diskussion

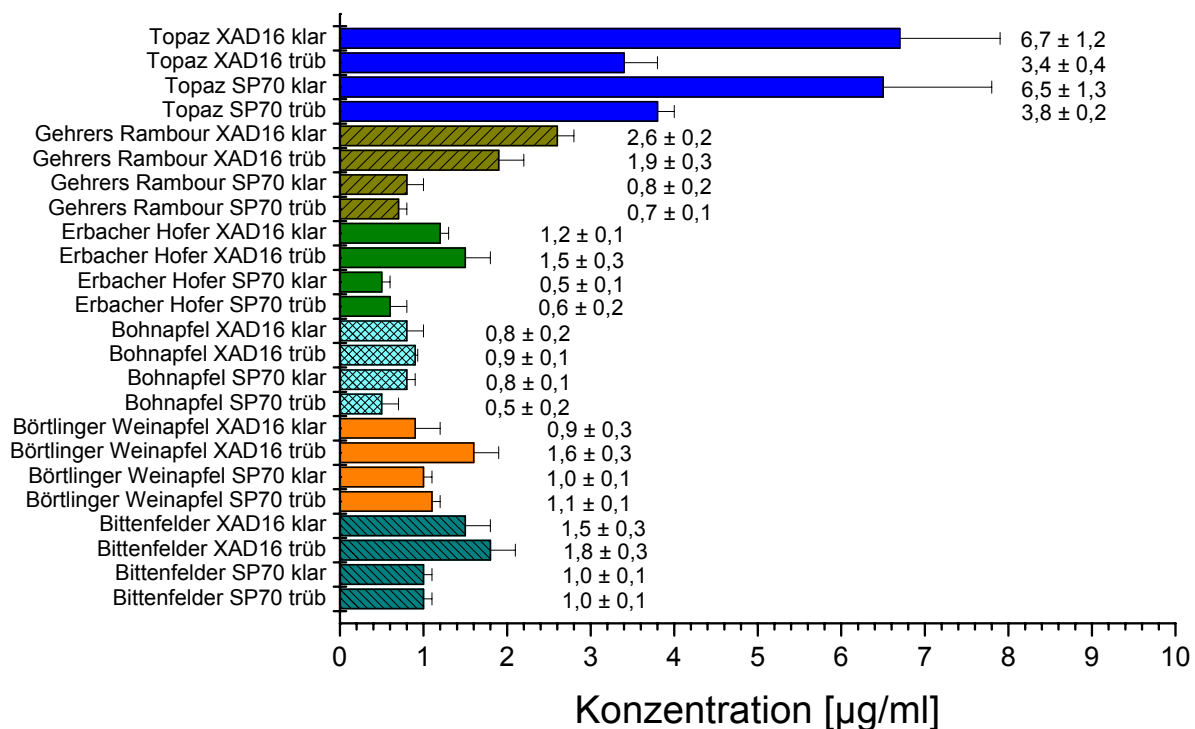


Abb. 4.7: Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR durch sortenreine Apfelsaftextrakte im ELISA, dargestellt als aufgetragene IC₅₀-Werte; MW ± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung.

Bei den vier Tafelapfelextrakten des Topaz zeichnete sich dagegen in der Hemmwirkung eine Präferenz zum trübem Saft ab, da die Topaz trüb Extrakte (IC₅₀ ~ 3 µg/ml) eine potentere Hemmwirkung auf den EGFR besaßen, als die Extrakte, die aus klarem Topazsaft (IC₅₀ ~ 6 µg/ml) gewonnen wurden. Die verwendete Säulenart bei der Aufreinigung zeigte beim Topaz keinen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit.

Da alle untersuchten sortenreinen Apfelsaftextrakte am isolierten EGFR eine potente Hemmwirkung aufwiesen und nur marginale Unterschiede zwischen polyphenolreichen Mostapfelextrakten und polyphenolarmen Tafelapfelextrakten zu sehen waren, sollte in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden, ob sich diese potente Hemmwirkung auch auf den EGFR einer intakten Zelle widerspiegelt.

Ergebnisse und Diskussion

Aus der großen Vielfalt an sortenreinen Extrakten wurde als polyphenolreicher Mostapfel die Sorte Bohnapfel ausgewählt und gegen den polyphenolarmen Tafelapfel Topaz auf eine Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR getestet. Die entsprechenden Messungen erfolgten mittels polyklonaler Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle Tyr1173, nach serumfreier 45 min Inkubation in Gegenwart

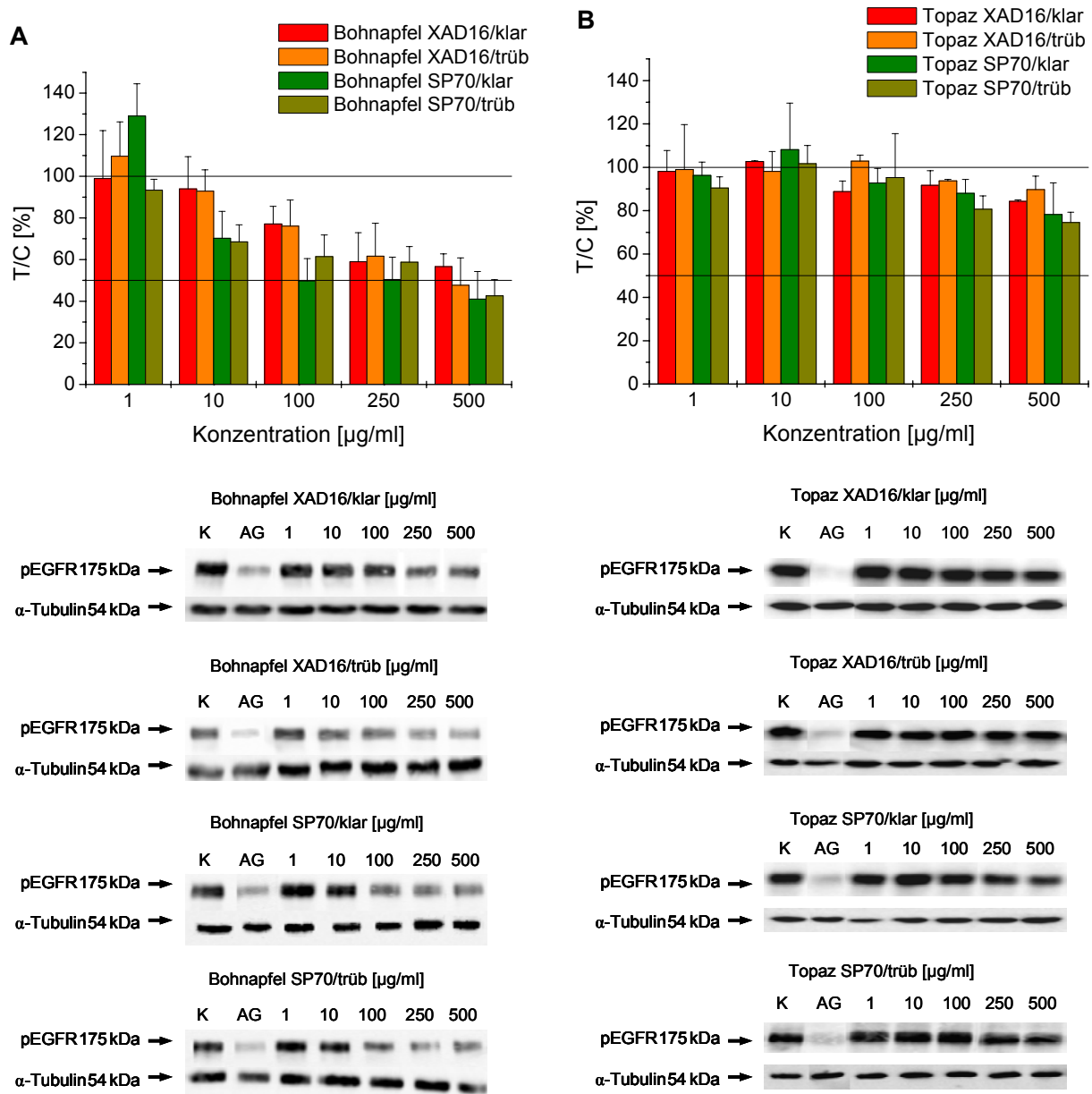


Abb. 4.8: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR (45 min) in EGF-stimulierten A431-Zellen durch die sortenreinen Apfelsaftextrakte **(A)** des Bohnapfels (Diplomarbeit N. Volz) und **(B)** des Topaz; serumfreie Inkubation, Zusatz von 100 U/ml Katalase; K: Kontrolle (1% DMSO), AG: AG1478, spezifischer EGFR-Inhibitor; MW ± SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

von 100 U/ml Katalase. Vor der Inkubation erfolgte für 24 h eine Serumreduktion, um den Rezeptor in seiner Aktivität zu drosseln. Im letzten Drittel der Inkubation wurde der Rezeptor durch Zugabe von EGF stimuliert, wodurch es zur Autophosphorylierung des Rezeptors kommt und folglich gemessen werden kann, ob eine Testsubstanz eine Hemmung der Autophosphorylierung bewirkt. Die Untersuchungen erfolgten an der Vulvakarzinomzelllinie A431, die eine hohe Rezeptordichte auf ihrer Zellmembran aufweist und daher für Messungen am EGFR gut geeignet ist [Carpenter, 1987].

Die polyphenolreichen Bohnapfelextrakte hemmten konzentrationsabhängig die Autophosphorylierung des EGFR (siehe Abb. 4.8). Bei den Bohnapfelextrakten, die über eine SP70-Säule aufgereinigt wurden, war bereits ab 10 µg/ml eine konzentrationsabhängige Hemmwirkung zu beobachten, wohingegen die über das XAD16-Adsorberharz aufgereinigten Extrakte erst ab 250 µg/ml den Phosphorylierungsstatus des EGFR reduzierten.

Im Gegensatz dazu waren die Extrakte des Topaz nahezu wirkungslos. Lediglich der Extrakt des Topaz SP70/ trüb zeigte in den höchsten getesteten Konzentrationen von 250 und 500 µg/ml eine marginale Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR. Bei 500 µg/ml war, bis auf den Extrakt Topaz XAD16/trüb, nur eine marginale Wirkung zu sehen.

Abschließend kann gesagt werden, dass im zellulären Testsystem die Extrakte von Most- und Tafelapfel substanzielle Unterschiede in der Hemmwirkung des EGFR aufwiesen, was auch im Einklang mit den unterschiedlichen Polyphenolprofilen steht. Im zellfreien Testsystem, am isolierten EGFR, dagegen zeigten alle untersuchten Extrakte eine potente Hemmwirkung. Somit führen Untersuchungen von komplexen Extrakten an der Zelle zu aussagekräftigeren Ergebnissen, denen nicht nur die Information zur Aktivität des isolierten Rezeptors zugrunde liegt, sondern auch weitere Parameter, wie die zelluläre Aufnahme, erfasst werden und so realistischere Abschätzungen über die tatsächliche *in vivo*-Situation möglich sind.

4.2.1.2 Apfelsaftextrakt AE04

In vorangegangenen Forschungsarbeiten konnten Procyanidine als potente Hemmstoffe des EGFR, sowohl im isolierten, als auch im zellulären Testsystem, identifiziert werden [Fridrich et al., 2007 b]. Um die Frage nach dem Wirkanteil von Procyanidinen an der Gesamtwirkung von komplexen Extrakten näher zu untersuchen, wurden analog zum Apfelsaftextrakt AE04 zwei rekonstituierte Extrakte getestet. Diese bestanden aus nahezu allen analysierten Einzelverbindungen, wobei einer dieser Extrakte denselben Anteil an oligomeren Procyanidinen enthielt, wie der native Extrakt, der andere rekonstituierte Extrakt war frei von oligomeren Procyanidinen und dieser Anteil im Extrakt war mit Glucose substituiert (siehe Tabelle 4.6). Der native Apfelsaftextrakt AE04 wurde aus verschiedenen Mostapfelsäften (Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambour) hergestellt und wies daher einen hohen Gehalt an oligomeren Procyanidinen auf.

Die drei Extrakte wurden sowohl im zellfreien (ELISA), als auch im zellulären System auf eine Modulation der Autophosphorylierung des EGFR getestet. Bisherige Untersuchungen zeigten mit rekonstituierten Extraktmischungen nur eine marginale Hemmwirkung auf den EGFR im Vergleich mit dem dazugehörigen, nativen Extrakt [Kern et al., 2005]. Jedoch enthielten diese Mischungen nie oligomere Procyanidine, sondern nur die analysierten Einzelverbindungen.

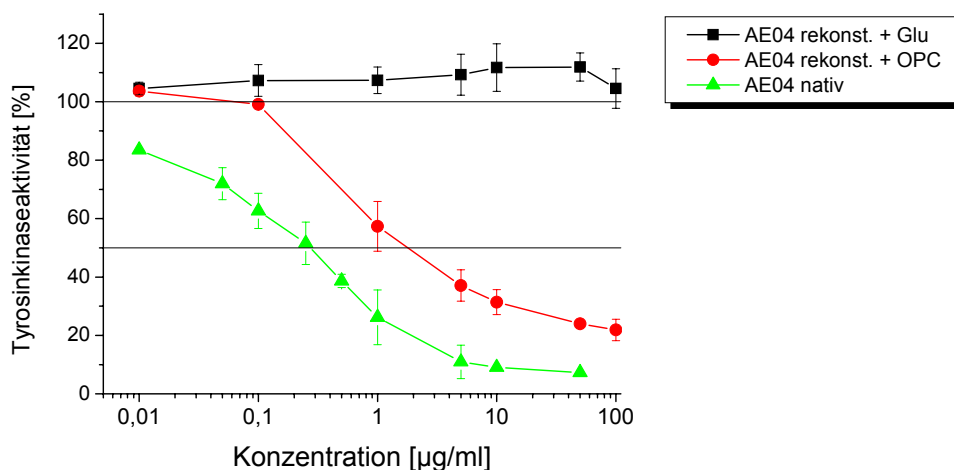


Abb. 4.9: Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR durch den Apfelsaftextrakt AE04 und die unterschiedlich rekonstituierten Extrakte des AE04 im ELISA; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung; Glu: Glucose; OPC: oligomere Procyanidine.

Der procyanidinfreie Extrakt zeigte bis 100 µg/ml keinen Effekt auf die PTK-Aktivität des isolierten EGFR (siehe Abb. 4.9). Wie bereits gezeigt werden konnte, besitzen rekonstituierte Extrakte, die keine oligomeren Procyanidine enthalten, meist nur eine marginale Wirkqualität im Vergleich zu ihrem entsprechenden nativen Gegenstück [Kern et al., 2005]. Dagegen zeigte der procyanidinhaltige, rekonstituierte Extrakt mit einem IC₅₀-Wert von 1,4 ± 3,8 µg/ml einen potenten Wirkungsverlauf, der sehr nahe am nativen Extrakt liegt, der einen IC₅₀-Wert von 0,30 ± 0,04 µg/ml aufweist. Somit besaßen der native und der procyanidinhaltige, rekonstituierte Extrakt AE04 eine vergleichbar potente Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR und waren in ihrer Wirkqualität vergleichbar mit den sortenreinen Apfelsaftextrakten und anderen Apfelsaft- und Apfeltresterextrakten [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007 a]. Dies verdeutlichte den potenten Einfluss von oligomeren Procyanidinen auf die Wirkqualität von Apfelextrakten in Bezug auf die Hemmung der PTK des EGFR und erklärte auch die marginale Wirkung der rekonstituierten Extrakte von Kern et al. [2005].

Tabelle 4.6: Polyphenolprofil [µg/ml] des Extraktes AE04 und der zwei rekonstituierten Extrakte, OPC: oligomere Procyanidine [Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg, persönliche Mitteilung].

Substanz	AE04 nativ	AE04 rekonst.+OPC	AE04 rekonst.+Glucose
Procyanidin B2	12,1	11,0	11,0
Epicatechin	12,5	12,53	12,53
3-OH-Phloretin-2'-O-xyloglucosid	6,7	6,68	6,68
3-OH-Phloridzin	4,3	4,31	4,31
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	68,9	68,88	68,88
Phloridzin	48	48,09	48,09
Kaffeensäure	7,5	8,24	8,24
p-Cumarsäure	2,6	6,27	6,27
Chlorogensäure	183,2	184,75	184,75
3-Cumaroylchinasäure	5	4,94	4,94
4-Cumaroylchinasäure	66	66,01	66,01
Quercetin-3-galactosid	1,8	1,81	1,81
Quercetin-3-glucosid	1,5	1,51	1,51
Quercetin-3-rhamnosid	4,5	0	0
Quercetin-3-rutinosid	4,5	4,51	4,51
Oligomere Procyanidine	411,7	412	0
Glucose	0	0	412,56

Ergebnisse und Diskussion

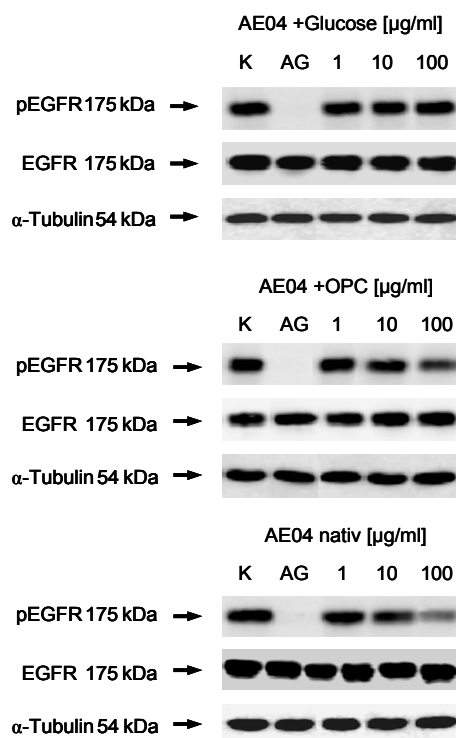
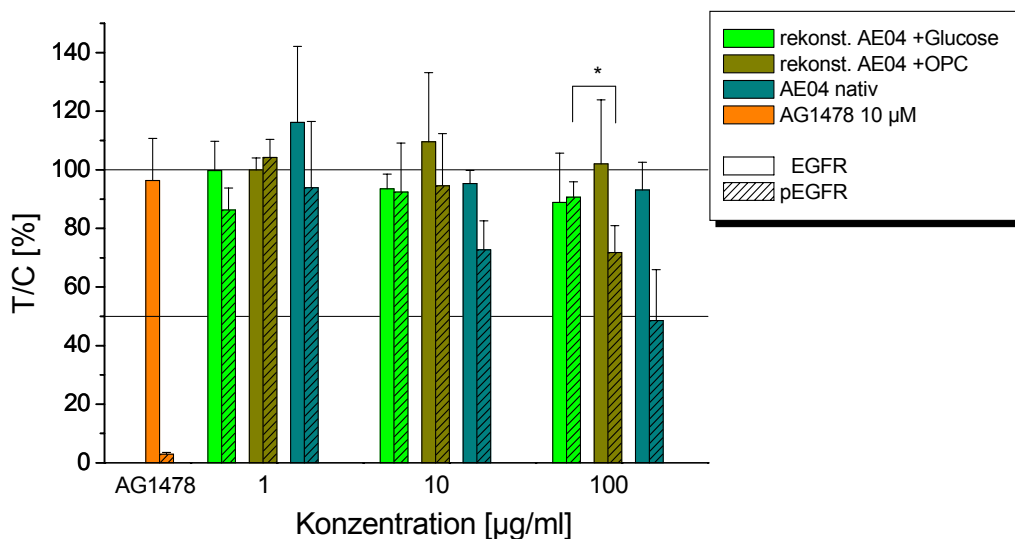


Abb. 4.10: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR (45 min) in EGF-stimulierten A431-Zellen durch den Apfelsaftextrakt AE04 und zwei unterschiedlich rekonstituierten Extrakten des AE04; serumfreie Inkubation, Zusatz von 100 U/ml Katalase; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$; OPC: oligomere Procyanidine.

Im zellulären Testsystem erwies sich der Apfelsaftextrakt AE04 als ein potenter Inhibitor der EGFR-Autophosphorylierung (siehe Abb. 4.10). Er hemmt konzentrationsabhängig die Autophosphorylierung des EGFR und erreicht mit der höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml etwa 50 % Hemmung. Mit einem IC_{50} -Wert von ~ 100 µg/ml besitzt er etwa dieselbe potente Wirkqualität, wie der bereits in der Vergangenheit getestete Apfelsaftextrakt AE02 [Fridrich et al., 2007 a].

Die Wirkqualitäten der rekonstituierten AE04-Extrakte im zellulären System spiegelten die am isolierten Rezeptor ermittelten Ergebnisse wieder. Während der glucosehaltige Extrakt bis zur höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml keine Wirkung auf den EGFR zeigte, hemmte der procyanidinhaltige Extrakt bei 100 µg/ml die Autophosphorylierung des Rezeptors um ca. 30% und nahm von der Wirkqualität eine Mittelstellung zwischen nativem AE04 und rekonstituiertem, procyanidinfreiem Extrakt ein. In ihrem Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR zeigten die zwei rekonstituierten Extrakte eine signifikant unterschiedliche Hemmwirkung. Der endogene Status des Rezeptors wird von beiden Extrakten nicht verändert. Einen Einfluss auf das Messergebnis durch die zugesetzte Glucose im procyanidinfreien Extrakt konnte ausgeschlossen werden, da der Glucosegehalt im Medium (1 g/l) durch den Extrakt (zusätzlich 41,3 mg/l) während der Inkubation nur marginal verändert wurde.

Der procyanidinhaltige, rekonstituierte Extrakt zeigte zwar nicht dieselbe Wirkqualität, wie der native Extrakt, doch machten die Versuche mit den drei Extrakten deutlich, dass die Fraktion der oligomeren Procyanidine in Apfelextrakten einen substantiellen Beitrag zur Hemmwirkung auf den EGFR leistet.

4.2.2 Reinsubstanzen und Extrakt-Fractionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bisher nur Apfelextrakte, bzw. Polyphenolmischungen untersucht. Es ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt, welche Bestandteile der Extrakte für die Hemmqualitäten auf die EGFR Autophosphorylierung verantwortlich sind. Daher erfolgten weitergehende Versuche mit fraktionierten Extrakten und Einzelsubstanzen.

Im Bereich der Einzelsubstanzen lag der Fokus der Untersuchungen bei den verschiedenen Glykosiden und Derivaten des Phloretins, da diese Substanzklasse einen hohen Anteil an den bisher charakterisierten Extrakten besitzt und bereits erste Untersuchungen gezeigt hatten, dass Phloretinderivate im zellfreien System eine potente Wirkqualität bei der Inhibierung des EGFR aufweist [Kern et al., 2005].

4.2.2.1 Fraktionen Apfelsaftextrakt AE06

Die Fraktionierung des Extraktes AE06 diente dazu, den komplex zusammengesetzten Extrakt in Fraktionen mit definiertem Polyphenolprofil zu unterteilen. Der AE06 wurde dazu mittels Größenausschluss-Chromatographie in 7 Fraktionen fraktioniert, die achte Fraktion fiel bei der Regenerierung der Säule an [BMBF-Zwischenbericht 2007, Prof. Dr. Schreier, Universität Würzburg]. In allen Fraktionen waren oligomere Procyanidine zu finden, wobei deren Gehalt mit steigender Fraktionsnummer zunimmt. Die ersten zwei Fraktionen (S.31 und S.32) bestanden nur aus oligomeren Procyanidinen ($\geq 20\%$) und phenolischen Säuren in geringen Mengen. Größere Mengen an monomeren Verbindungen, wie phenolische Säuren, Quercetinglykoside und Phloretinyglykoside fanden sich insbesondere in den Fraktionen S.33 und S.34, wohingegen die Fraktionen S.34 bis S.38 von dimeren und oligomeren Procyanidinen dominiert wurden.

Da die Versuche mit den sortenreinen Apfelsaftextrakten gezeigt hatten, dass der ELISA als zellfreies Testsystem zu un differenziert ist, wenn die Testsubstanzen eine Mindestmenge an Polyphenolen enthalten, erfolgte die Untersuchung direkt am zellulären Rezeptor der Vulvakarzinomzelllinie A431 mittels Western Blot Analyse (siehe Abb. 4.11).

In den Untersuchungen zur Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus des EGFR durch die Fraktionen des AE06 stellte sich Fraktion S.33 als potenteste Fraktion im Hinblick auf die EGFR-hemmenden Eigenschaften heraus. Schon in einer Konzentration von $10\ \mu\text{g/ml}$ wurde der Phosphorylierungsstatus des EGFR durch S.33 um etwa 70% vermindert (siehe Abb 4.11). Von den weiteren getesteten Fraktionen zeigte nur noch die Fraktion S.37 potente EGFR hemmende Eigenschaften (bei $100\ \mu\text{g/ml}$ $\sim 40\%$ Restaktivität). Die Fraktionen S.34, S.36 und S.38 reduzierten in der höchsten Konzentration ($100\ \mu\text{g/ml}$) den Phosphorylierungsstatus des EGFR, ohne jedoch einen IC_{50} -Wert zu erreichen. Keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung wiesen die Fraktionen S.32 und S.35 auf.

Ergebnisse und Diskussion

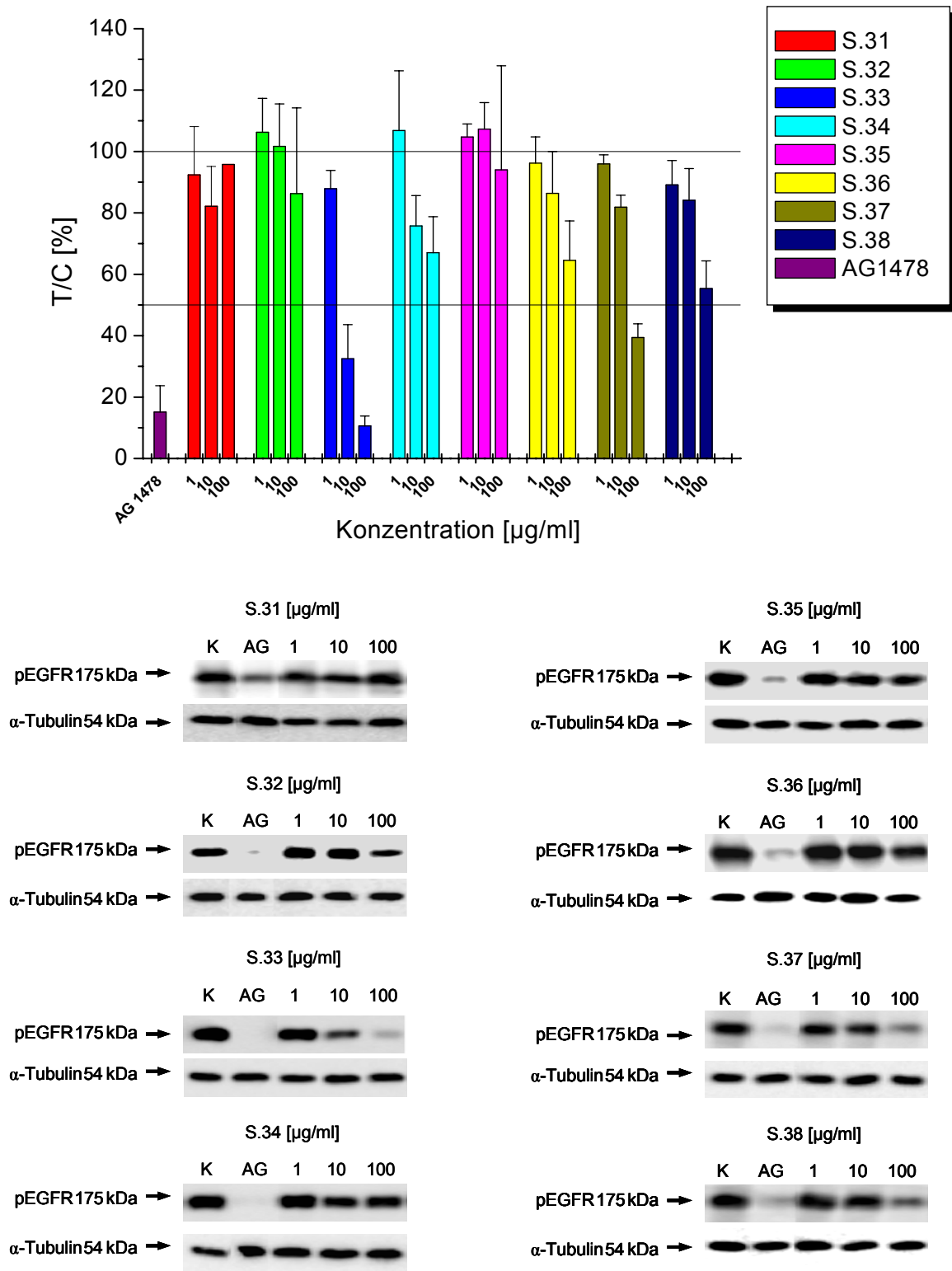


Abb. 4.11: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten A431-Zellen durch Fraktionen des Extraktes AE06; 45 min Inkubation, serumfrei; 100 U/ml Katalase; MW ± SD von 2-7 unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.7: Zusammensetzung [mg/g] der Fraktionen des Extraktes AE06; -: nicht nachweisbar [Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg].

Substanz	S.31	S.32	S.33	S.34	S.35	S.36	S.37	S.38
Epicatechin	-	-	-	105,0	23,9	8,3	6,8	-
Catechin	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Cumaroylchinasäure	-	56,6	25,0	-	-	-	-	-
Neochlorogensäure	-	-	-	-	-	5,5	-	-
Chlorogensäure	8,5	-	371	41,7	-	-	-	-
Kryptochlorogensäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaffeesäure	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Cumarsäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	-	-	95,6	16,4	-	-	-	-
Phloridzin	-	-	35,8	14,6	0,6	1,0	-	-
Phloretin	-	-	-	-	-	-	-	-
Procyanidin B1	-	-	-	-	-	10,0	4,3	-
Procyanidin B2	-	-	-	0,8	14,6	20,1	25,8	-
Procyanidin B3	-	-	-	153,7	10,1	16,4	59,4	-
Procyanidin B4	-	-	-	-	29,8	10,1	6,9	-
Quercetin-3-arabinosid	-	-	-	6,5	-	-	-	-
Quercetin-3-glucosid	-	-	-	4,8	-	-	-	-
Quercetin-3-galactosid	-	-	-	1,0	-	-	-	-
Quercetin-3-rhamnosid	-	-	-	2,9	-	-	-	-
Quercetin-3-rutinosid	-	-	-	4,8	-	-	-	-
Quercetin-3-xylosid	-	-	-	-	-	-	-	-
Quercetin	-	-	-	2,5	0,6	6,8	2,0	-
Oligomere Procyanidine (photometrisch)	247,2	208,1	357,6	664,8	661,8	760,1	935,0	1020,0
Summe	255,7	264,7	885,0	865,0	686,9	781,7	943,7	1020,0

Bei Wiederholungsversuchen zur Verifizierung der Hemmwirkung von Fraktion S.33, die charakterisiert war durch einen hohen Gehalt an Chlorogensäure, Phloretin-2'-O-xyloglucosid und oligomeren Procyanidinen, stellte sich jedoch heraus, dass die aktivitätsbestimmende/n Substanz/en nicht lagerstabil ist/sind. Nach 4 bzw. 6 Monaten konnte nur noch eine marginale Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.12). Aufgrund der Analysendaten von Fraktion S.33 (siehe Tabelle 4.7) müssten die instabilen Substanzen aus dem Procyanidinanteil stammen, da Chlorogensäure und Phloretin-2'-O-xyloglucosid soweit lagerstabil sein sollten und eine Rechromatographie der betroffenen Fraktion dies auch bestätigte [Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg, persönliche Mitteilung]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass vor allem Procyanidine eine herausragende Wirkqualität auf den EGFR besitzen [Fridrich et al.; 2007 b]. Zudem zeigten die Versuche mit den rekonstituierten Extrakten des AE04 wie essentiell die Anwesenheit von Procyanidinen für die Wirkqualität des

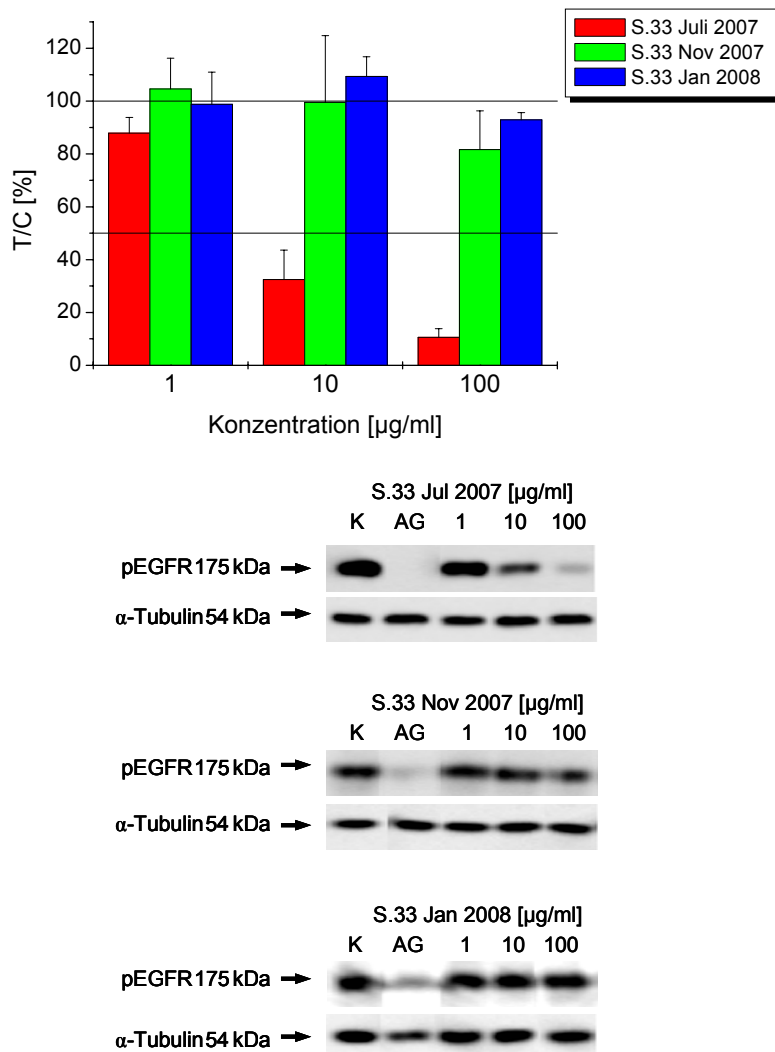


Abb. 4.12: Zeitlicher Aktivitätsverlust der Fraktion S.33 des AE06 bei der Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten A431-Zellen; 45 min Inkubation, serumfrei, Zusatz von 100 U/ml Katalase; MW ± SD von 2-3 unabhängigen Experimenten.

Apfelextraktes ist. Somit könnten niedrig oligomere Procyanidine zur gezeigten Hemmwirkung von S.33 auf den EGFR beitragen. Der zeitliche Aktivitätsverlust könnte auf eine Polymerisierung während der Lagerzeit zurückgeführt werden, da höheroligomere Procyanidine nicht mehr in der Lage sind die EGFR-Aktivität auf zellulärer Ebene zu modulieren [Fridrich et al., 2007 b]. Der Beitrag der anderen identifizierten Polyphenole der Fraktion S.33 ist als marginal einzuordnen, da Chlorogensäure, 4-Cumaroylchinasäure und Phloridzin die PTK-Aktivität des isolierten EGFR höchstens marginal beeinflussen [Kern et al., 2005].

Eine daraufhin erfolgte komplett neue Fraktionierung (N) führte nicht zu einer Reproduzierung der alten Aktivitäten (siehe Abb. 4.13). Die Wirkqualitäten der neuen Fraktionen haben sich insgesamt in die hinteren Fraktionen verschoben. So war eine

potentielle Zunahme der EGFR-hemmenden Eigenschaften von Fraktion S.34N bis S.38N zu beobachten, wohingegen die ersten drei Fraktionen praktisch wirkungslos waren. Fraktion S.38N war mit einem IC_{50} -Wert von knapp über 10 $\mu\text{g/ml}$ die potenteste der 8 Fraktionen, während die Fraktionen S.35N bis S.37N annähernd dieselben potenten Wirkqualitäten zeigten.

Die Ursache der Aktivitätsverschiebung ist in einer veränderten Zusammensetzung der Fraktionen zu sehen. Im Vergleich zur ersten Fraktionierung konnten in den ersten drei Fraktionen deutlich weniger oligomere Procyanidine identifiziert werden (siehe Tabelle 4.8). Insbesondere Fraktion 1 und 2 sind mit einem Gesamtpolyphenolgehalt von 4,4, bzw. 9,6 % gegenüber der ersten Fraktionierung (>25 % Polyphenole) extrem polyphenolarm. In Fraktion S.33N ist zwar der Gesamtpolyphenolgehalt mit 68 % deutlich erhöht, jedoch dominiert von der Zusammensetzung her die Chlorogensäure gegenüber den Procyanidinen, deren Gehalt mit knapp 16 % um über die Hälfte niedriger ist, als in Fraktion S.33 der ersten Fraktionierung. Eine biologische Wirkqualität konnte bei den neuen Fraktionen erst mit einem Anstieg des Procyanidingehaltes ab Fraktion S.34N beobachtet werden. Insbesondere die Fraktionen S.35N bis S.38N enthalten praktisch nur noch oligomere Procyanidine und mit steigender Fraktionsnummer konnte eine Zunahme der Wirkqualität der Fraktionen gemessen werden. Die Wiederholung der Fraktionierung zeigte, in Ergänzung zu den vorangegangenen Versuchen mit den rekonstituierten Extrakten, dass die Potenz der EGFR-Hemmung eines Apfelextraktes vom Gehalt an oligomeren Procyanidinen dominiert wird.

Ergebnisse und Diskussion

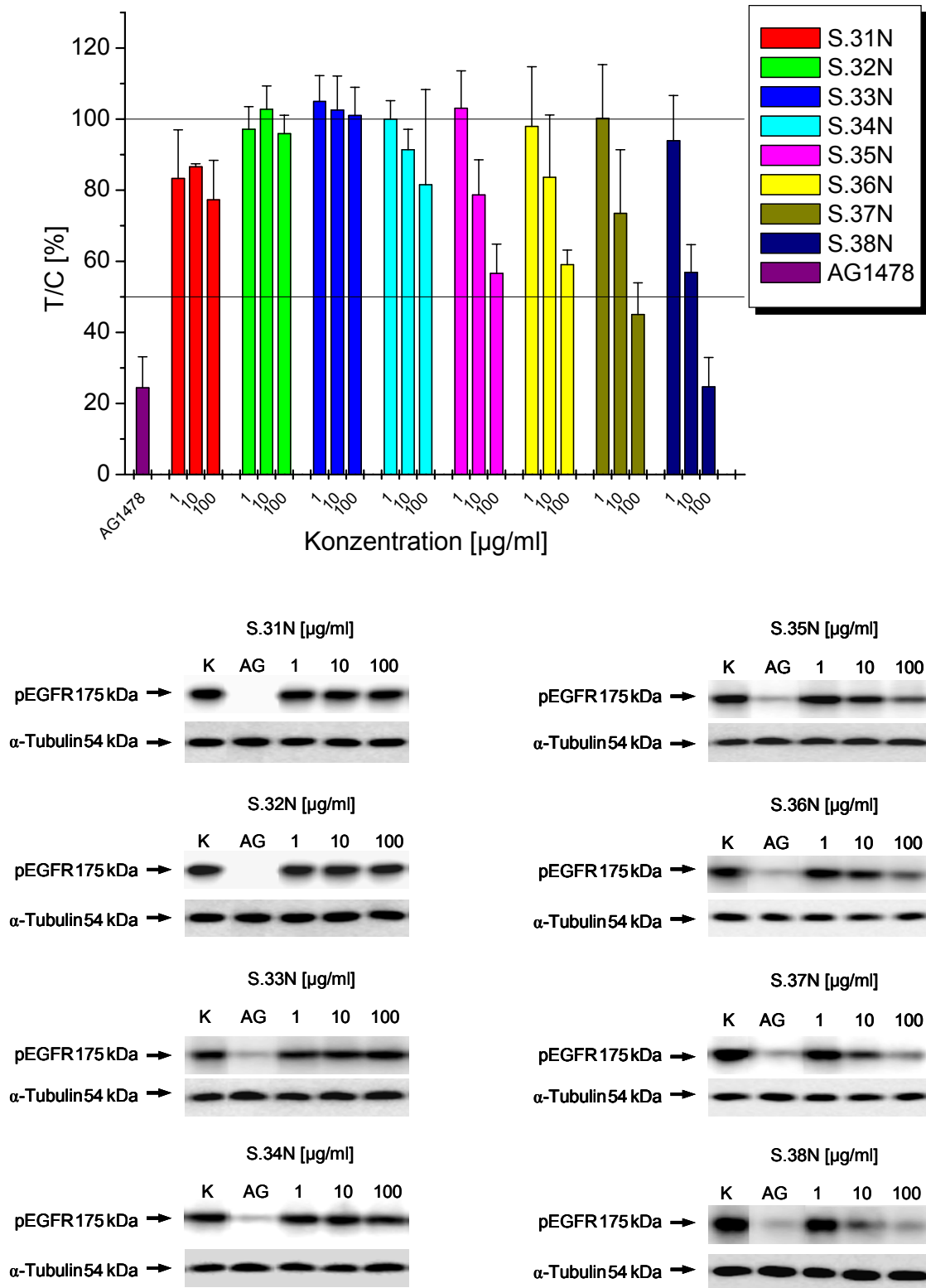


Abb. 4.13: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR (45 min) in EGF-stimulierten A431-Zellen durch neue Fraktionen des AE06; serumfreie Inkubation, Zusatz von 100 U/ml Katalase; MW ± SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.8: Zusammensetzung [mg/g] der neuen Fraktionierung (N) des Extraktes AE06; -: nicht nachweisbar [Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg]

Substanz	S.31N	S.32N	S.33N	S.34N	S.35N	S.36N	S.37N	S.38N
Epicatechin	-	-	-	153	8,0	-	-	-
Catechin	-	-	-	12,7	6,2	-	-	-
4-Cumaroylchinasäure	-	14,6	16,5	-	-	-	-	-
5-Cumaroylchinasäure	-	-	12,1	-	-	-	-	-
Neochlorogensäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlorogensäure	0,9	2,1	333,6	-	-	-	-	-
Kryptochlorogensäure	-	3,2	13,0	-	-	-	-	-
Kaffeesäure	-	-	4,7	-	-	-	-	-
p-Cumarsäure	-	-	-	-	-	-	-	-
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	-	-	88,1	-	-	-	-	-
Phloridzin	-	-	37,9	2,4	-	-	-	-
Phloretin	-	-	-	0,8	0,5	-	-	-
3-OH-Phloridzin	-	-	1,7	7,2	-	-	-	-
3-OH-Phloretin-2'-O-xyloglucosid	-	-	20,8	0,9	-	-	-	-
Procyanidin B1	-	-	-	-	24,3	-	-	-
Procyanidin B2	-	-	-	99,8	137,4	-	-	-
Procyanidin B3	-	-	-	-	-	-	-	-
Procyanidin B4	-	-	-	6,7	-	-	-	-
Quercetin-3-arabinosid	-	-	-	3,3	9,4	-	-	-
Quercetin-3-glucosid	-	-	-	1,8	0,2	-	-	-
Quercetin-3-galactosid	-	-	-	3,9	-	-	-	-
Quercetin-3-rhamnosid	-	-	-	8,5	2,0	-	-	-
Quercetin-3-rutinosid	-	-	-	-	-	-	-	-
Quercetin-3-xylosid	-	-	-	-	-	-	-	-
Quercetin	-	-	-	-	-	-	6,6	-
Oligomere Procyanidine (photometrisch)	43,0	76,2	158,0	493,0	862,0	979,0	1002,0	995,3
Summe	43,9	96,2	686,4	682,8	888,4	978,9	1008,6	995,3

4.2.2.2 Procyanidine

Procyanidine sind Oligomere, die sich aus monomeren Bausteinen von (+)-Catechin und/oder (-)-Epicatechin zusammensetzen und u.a. einen hohen Anteil am Gesamtpolyphenolgehalt von Äpfeln, insbesondere Mostäpfeln, ausmachen [Hümmer et al., 2008]. Dabei kommen hohe Konzentrationen in der Schale und weniger im Fruchtfleisch des Apfels vor [Guyot et al., 2002]. Eine Analytik der Procyanidine ist schwierig und beschränkt sich meistens auf die Quantifizierung einiger Leitsubstanzen, wie z.B. den dimeren Procyanidinen B1-B4, sowie die photometrische Bestimmung des Gesamtprocyanidingehaltes und die Bestimmung des mittleren Oligomerisierungsgrades mittels Thiolyse [Hümmer et al., 2008]. Auch eine Fraktionierung nach dem Oligomerisierungsgrad bietet gute Ansatzpunkte für eine genauere Charakterisierung dieser komplexen Gruppe an Apfelinhaltsstoffen. Die Bestandteile eines Oligomerisierungsgrades unterliegen einer großen strukturellen Vielfalt und unterscheiden sich häufig nur durch kleine Substituenten (-OH, -H), der Art der Verknüpfung oder stereochemische Merkmale, was in Verbindung mit fehlenden Referenzsubstanzen eine detailliertere Analyse und Quantifizierung der Zusammensetzung der oligomeren Procyanidine nahezu unmöglich macht [Dixon et al., 2005].

Procyanidine sind als potente Inhibitoren des EGFR beschrieben, wobei bisher nur folgende isolierte Reinsubstanzen untersucht wurden: Procyanidindimere B1-4, das Trimer PC1 und das Tetramer PA2 [Fridrich et al., 2007b].

Für die Untersuchungen zur Hemmwirkung der Autophosphorylierung des isolierten EGFR mittels ELISA stand die Procyanidinfraktion aus einem Mostapfelextrakt (*Malus domestica*, Sorte Antoinette) zur Verfügung, die 78,4 % oligomere Procyanidine, mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad von 4 enthält. Die Procyanidine setzten sich zu 95 % aus (-)-Epicatechin und 5 % (+)-Catechin zusammen [Gossé et al., 2005]. Der Extrakt zeigte mit einem IC₅₀-Wert von 15,5 ± 0,9 µg/ml eine potente Hemmwirkung am isolierten Rezeptor (siehe Abb. 4.14).

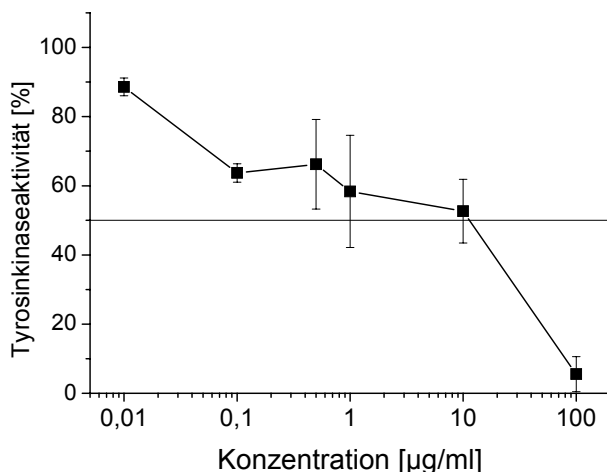


Abb. 4.14: Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR durch die Procyanidinfraktion eines Mostapfelextraktes im ELISA; MW \pm SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung

Der Procyanidinextrakt aus dem Apfel, besaß demnach eine marginal schlechtere Hemmwirkung auf den EGFR, wie dies bisher für verschiedene komplette Apfelsaftextrakte gezeigt werden konnte [Fridrich et al., 2007 a]. Die bisherigen Untersuchungen mit Procyanidinen als Reinsubstanzen zeigten, dass mit steigendem Oligomerisierungsgrad von Procyanidinen die Wirkqualität am isolierten EGFR steigt. So besitzen laut Kern et al. [2005] die Monomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin bis 300 μ M keine Hemmwirkung auf den isolierten EGFR, während die dimeren Procyanidine B1 und B2 mit IC_{50} -Werten von $49,9 \pm 10,2$ bzw. $37,9 \pm 2,8$ μ g/ml eine Steigerung der Wirkqualität aufwiesen. Fridrich et al. [2007 b] führten die Untersuchungen mit dem Procyanidintrimer (PC1) und Procyanidintetramer (PA2) fort, die aus Traubenkernextrakten isoliert wurden und konnten eine weitere Steigerung der Hemmwirkung in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades am isolierten EGFR nachweisen.

Um diese Korrelation zwischen Wirkqualität und Oligomerisierungsgrad mit dem kompletten Spektrum der Procyanidine aus dem Apfel weitergehend zu untersuchen, wurden die Procyanidine des Apfelsaftextraktes AE04 in fünf Fraktionen mit steigendem Oligomerisierungsgrad aufgetrennt und ebenfalls mittels ELISA am isolierten EGFR untersucht, da für Versuche auf zellulärer Ebene, mittels Western Blot nicht genügend Substanz zur Verfügung stand. Die Fraktionierung erfolgte mittels Normalphasen-HPLC mit anschließender Charakterisierung der Fraktionen und Bestimmung des mittleren Oligomerisierungsgrades des Procyanidinanteils [Zessner et al., 2008].

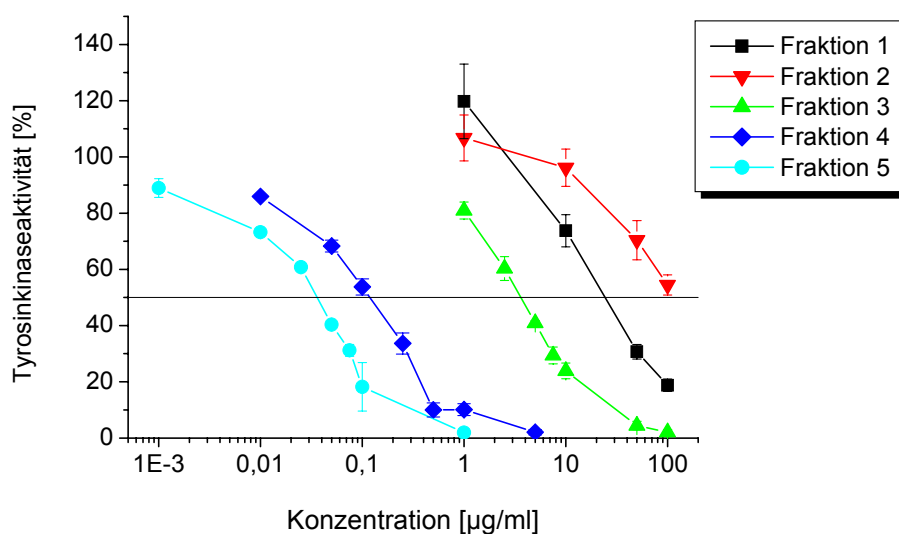


Abb. 4.15: Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch die procyanidinhaltigen Fraktionen 1-5 des AE04; MW \pm SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Dreifachbestimmung

Tabelle 4.9: Hemmwirkung der procyanidinhaltigen Fraktionen des AE04, dargestellt als IC₅₀-Werte

Fraktion	IC ₅₀ -Werte [µg/ml]
1	39,5 \pm 18,0
2	> 100
3	4,0 \pm 1,2
4	0,15 \pm 0,03
5	0,04 \pm 0,01

Fraktion 1 war noch frei von Procyanidinen und enthielt nur geringe Mengen an Chlorogensäure, p-Cumarsäure und 4-Cumaroylchinasäure. Die Fraktion zeigte mit einem IC₅₀-Wert von 39,5 \pm 18,0 µg/ml eine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR (siehe Abb. 4.15, Tabelle 4.9). Aufgrund der bisherigen Publikationen hätte die Fraktion eigentlich einen deutlich höheren IC₅₀-Wert besitzen müssen, da laut Kern et al. [2005], Chlorogensäure und 4-Cumaroylchinasäure jeweils einen IC₅₀-Wert größer 300 µM besitzen, so dass die Hemmwirkung entweder durch synergistische Effekte oder durch noch unbekannte Bestandteile der Extraktfraktion verursacht worden sein muss.

Die marginale Hemmwirkung der Fraktion 2 (IC₅₀-Wert >100 µg/ml) war wahrscheinlich auf den niedrigen Procyanidingehalt von nur 70 mg/g mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad von 3,1, zurückzuführen, ansonsten war die

Zusammensetzung der Fraktion mit knapp 70 % von Chlorogensäure dominiert, die laut Kern et al. [2005] bis 300 µM keine Wirkung auf den EGFR zeigt.

In Fraktion 3 waren 27 % Procyanidine mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad von 3,4 und knapp 50 % Phloretin-2'-O-xyloglucosid enthalten. Daher war für die potente Hemmwirkung auf den EGFR nicht nur die enthaltenen Procyanidine, sondern auch das Phloretin-2'-O-xyloglucosid, das ebenfalls als hochpotenter Inhibitor des EGFR im zellfreien System identifiziert worden war (siehe Abs. 4.2.2.3), verantwortlich. In Fraktion 4 dominierten die oligomeren Procyanidine mit einem Anteil von 92 % am Gesamtpolyphenolgehalt. Der mittlere Oligomerisierungsgrad lag mit 4,6 bereits deutlich höher als in den vorherigen Fraktionen und die Fraktion besaß eine potentere Wirkqualität, als die bisher untersuchten Apfelextrakte.

Fraktion 5 bestand schließlich zu 100 % aus oligomeren Procyanidinen mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad von 7,9 was zu einer weiteren Steigerung der Hemmwirkung führte.

Hiermit konnten die bisherigen Beobachtungen von Fridrich et al. [2007 b], dass mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad im zellfreien System die Hemmwirkung auf die PTK des isolierten EGFR potent zunimmt, auch mit fraktionierten Procyanidinen aus dem Apfel bestätigt werden.

4.2.2.3 Phloretinderivate und 3-OH-Pyron

Phloretinderivate und deren Glykoside gehören zur Gruppe der Dihydrochalkone und sind in Apfelextrakten neben den Phenolcarbonsäuren und den Flavonolen (Quercetinderivate) in größeren Mengen enthalten [Kahle et al., 2005 a]. Phloretin und sein Glykosid Phloridzin (siehe Abb. 4.16) sind bereits in der Vergangenheit auf eine Hemmung der PTK-Aktivität untersucht worden [Kern et. al., 2005]. Phloridzin hemmt erst in hohen Konzentrationen den EGFR, wohingegen das Aglykon Phloretin eine potentere Wirkung auf den Rezeptor zeigt (siehe Tabelle 4.10). Phloretin findet sich in Apfelextrakten nur in Spuren und dürfte erst im Gastrointestinaltrakt durch enzymatische Abspaltung des glykosischen Rests aus Phloridzin entstehen. In Apfeltresterextrakten ist Phloretin dagegen in deutlich höheren Konzentrationen zu finden, was auf die zuvor erfolgte technologische Bearbeitung bei der Pektinproduktion zurückzuführen ist. Hierbei wird der Apfeltrester mit Hilfe von Salzsäure und erhöhter Temperatur aufgeschlossen, was bei Polyphenolglykosiden zu einer säurekatalysierten Abspaltung des Zuckerrestes führen kann.

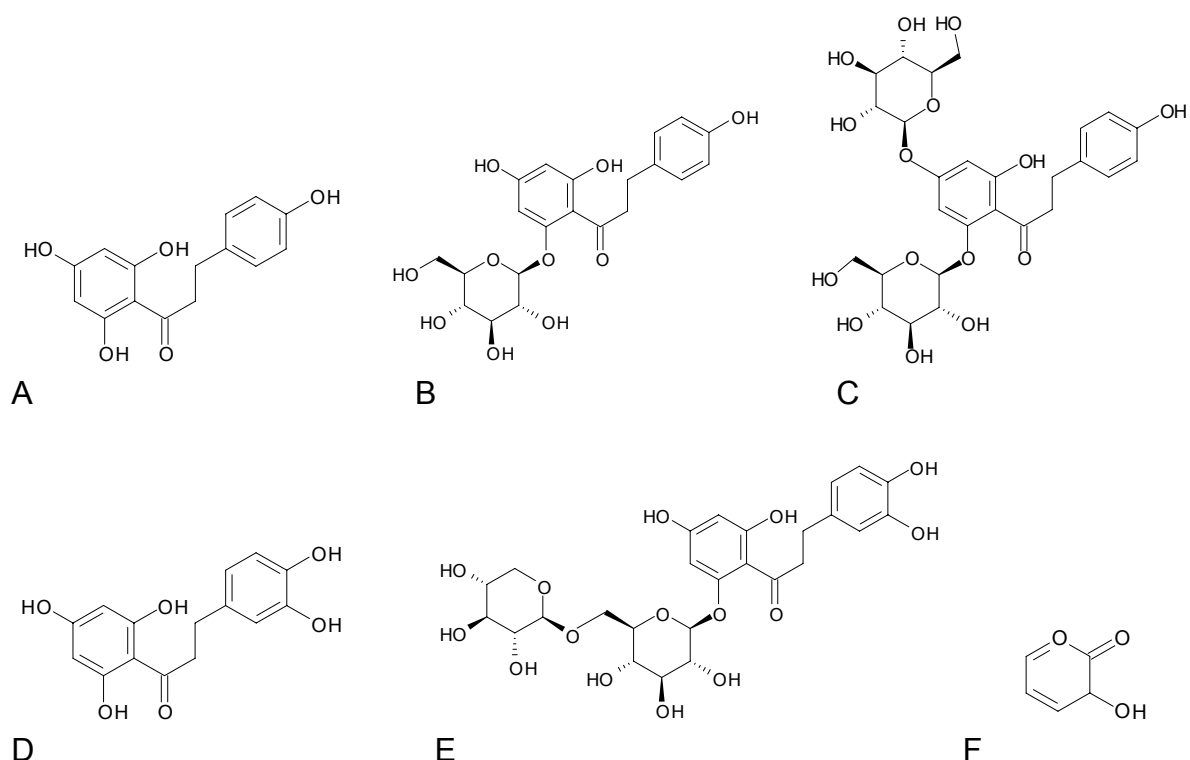


Abb. 4.16: Übersicht zu den Strukturen der Phloretinderivate und -glykoside und 3-OH-Pyron: A: Phloretin; B: Phloridzin; C: Phloretin-2'-4'-di-(β -D-glucosid); D: 3-OH-Phloretin; E: 3-OH-Phloretin-2'-O-xyloglucosid; F: 3-OH-Pyron.

Die Glykoside und Derivate des Phloretins (siehe Abb. 4.16) wurden zunächst im zellfreien System auf eine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR untersucht, um festzustellen welche Verbindung überhaupt eine Hemmwirkung besitzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Verifizierung der Ergebnisse im zellulären System. Mit Ausnahme des bereits von Kern et al. [2005] untersuchten Phloridzin, zeigten alle untersuchten Verbindungen des Phloretins eine potente Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR (siehe Abb. 4.17, Tabelle 4.10). Dabei zeigte sich, dass die Wirkqualität auf die Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR der einzelnen Verbindungen stark vom glykosidischen Rest und einer weiteren Hydroxylierung an Position 3 des B-Ringes des Flavanongerüsts beeinflusst wird. Besonders potent auf eine Steigerung der Wirkqualität des Phloretins wirkt sich die Konjugation an Position 2' mit den Zuckerbausteinen Glucose und Xylose (-xyloglucosid) aus. Mit einem IC₅₀-Wert von 0,4 µM besitzt das Phloretin-2'-O-xyloglucosid die bisher stärkste nachgewiesene Hemmwirkung auf den EGFR aus der Reihe der untersuchten Verbindungen des Phloretins. Eine zusätzliche Hydroxylierung von Phloretin-2'-O-xyloglucosid an Position 3 bewirkt dagegen eine Abschwächung der Wirkqualität, verglichen zum nichthydroxylierten Phloretin-2'-O-xyloglucosid, obwohl am Aglykon diese Hydroxylierung eine Steigerung der Wirkqualität bewirkt. Eine Glykosylierung an zwei unterschiedlichen Positionen des Phloretins (Phloretin-2'-4'-di-(β-D-glucosid)) bewirkt eine Steigerung der Wirkqualität, verglichen zum Aglykon, um etwa Faktor 1,6.

Die Substanz 3-OH-Pyron (siehe Abb. 4.16), die natürlicherweise nicht im Apfel vorkommt, aber in den Apfelsaftextrakten nachweisbar war [BMBF-Zwischenbericht 2007, Prof. Dr. Schreier, Universität Würzburg], entstand sehr wahrscheinlich während der Pasteurisierung der Säfte, aus der zum Schutz vor unerwünschter Oxidation zugesetzten Ascorbinsäure, durch nichtenzymatische Bräunungsreaktionen, da 3-OH-Pyron als ein Abbauprodukt der Ascorbinsäure beschrieben wird [Tatum et al., 1969]. 3-OH-Pyron zeigte bis 100 µM keinen Effekt auf die PTK des isolierten EGFR (siehe Abb. 4.17). Dies stimmt mit den bisherigen Beobachtungen von Kern et al. [2007] überein, da diesen phenolischen, monoaromatischen Verbindungen, wie den Abbauprodukten der Anthocyanidine (Syringa-, Vanillin-, Protocatechu- und 4-OH-Benzoesäure) bisher keine EGFR-hemmenden Eigenschaften nachgewiesen werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion

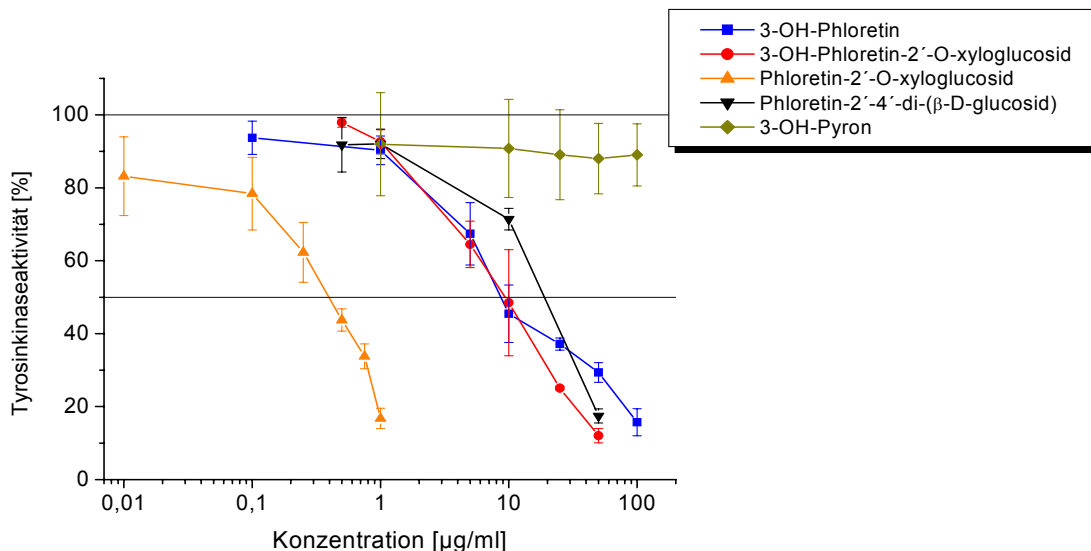


Abb. 4.17: Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch Phloretinderivate und 3-OH-Pyron; MW \pm SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Dreifachbestimmung.

Tabelle 4.10: IC₅₀-Werte der am EGFR getesteten Phloretinderivate und 3-OH-Pyron; *Kern et. al., 2005; § Dissertation Melanie Kern; # Dissertation Diana Fridrich; -: keine Wirkung bis 100 µM; n.b.: nicht bestimmt

Substanz	IC ₅₀ -Werte [µM]	
	ELISA	Western Blot Analyse
Phloretin	43,4 \pm 5,1 *	_§
3-OH-Phloretin	8,9 \pm 0,4	>100
Phloridzin	267 \pm 50 *	n.b.
3-OH-Phloridzin	4,9 \pm 1,5 #	-
3-OH-Phloretin-2'-O-xyloglucosid	12,1 \pm 1,7	-
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	0,4 \pm 0,1	-
Phloretin-2'-4'-di-(β-D-glucosid)	27,2 \pm 2,5	-
3-OH-Pyron	> 100	n.b.

Bis auf Phloridzin zeigten alle anderen Glykoside und auch das Aglykon Phloretin selbst, sowie das Derivat 3-OH-Phloretin und seine Glykoside eine potente Hemmwirkung auf den isolierten EGFR. Es stellte sich jetzt die Frage, wie sich die am isolierten Rezeptor beobachtete Hemmwirkung der Substanzen am zellulären Rezeptor verhält. Wie in Tab. 4.10 und Abb. 4.18 zu erkennen ist, zeigte keine der untersuchten Verbindungen eine potente Hemmwirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFR in A431-Zellen. Es war lediglich beim 3-OH-Phloretin eine marginale Tendenz zur Hemmung zu sehen. Alle anderen untersuchten Verbindungen zeigten, ebenso wie Phloretin-2'-O-xyloglucosid, was exemplarisch in Abb. 4.18 dargestellt ist, keine Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR.

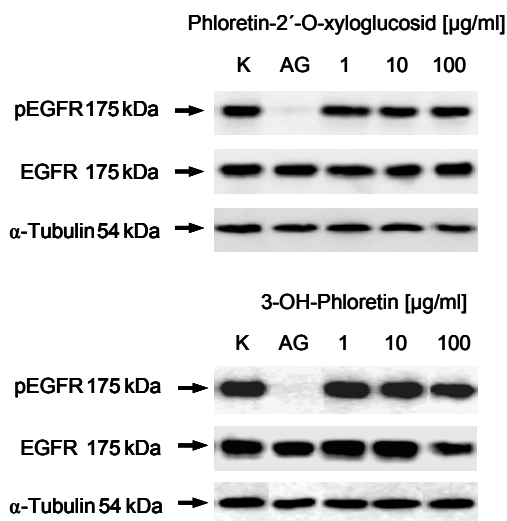
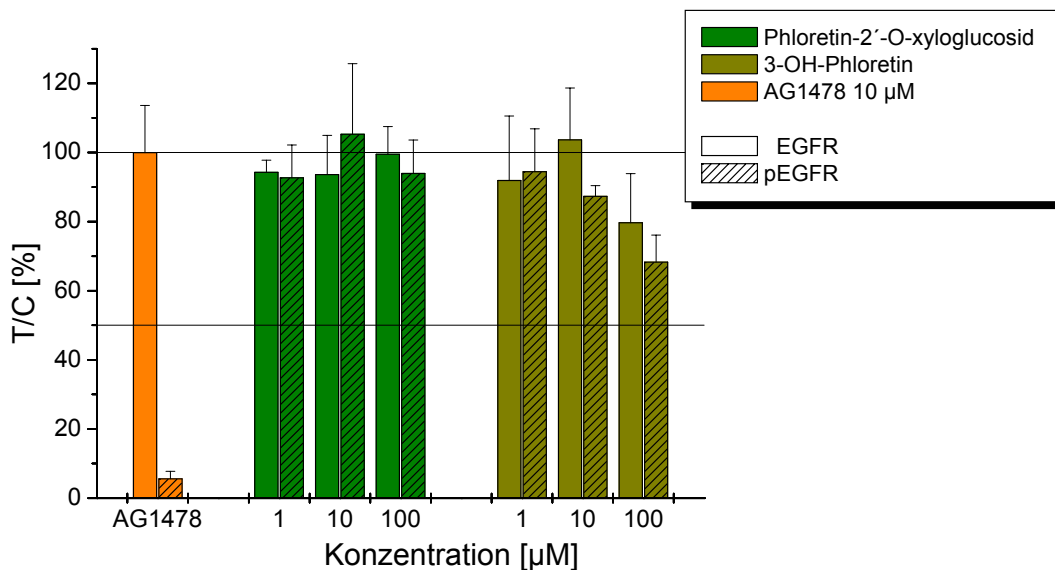


Abb. 4.18: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR (45 min) in EGF-stimulierten A431-Zellen durch Phloretin-2'-O-xyloglucosid und 3-OH-Phloretin; serumfreie Inkubation, Zusatz von 100 U/ml Katalase; MW ± SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Einzel betrachtet, leisten die Verbindungen des Phloretins somit keinen Beitrag zur Hemmwirkung von Apfelextrakten auf den zellulären EGFR. Denkbar wäre jedoch ein synergistischer Effekt in Verbindung mit anderen Extraktbestandteilen. Vermutlich liegt das Problem bei der Aufnahme in die Zelle, da die untersuchten Substanzen am isolierten Rezeptor größtenteils eine hervorragende Wirkqualität zeigen, aber es ihnen nicht gelingt die Zellmembran zu überwinden und die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität zu inhibieren. Befinden sich im Extrakt jedoch beispielsweise Substanzen, die die zelluläre Aufnahme von Phloretinderivaten ermöglichen, dann wäre es denkbar, dass diese Gruppe von Apfelbestandteilen auch einen Beitrag zur Hemmwirkung der Extrakte an der intakten Zelle liefern könnte.

4.2.3 Apfeltresterextrakte

Die bisher untersuchten Extrakte und Extrakt-Fractionen stammten alle direkt aus dem Apfel und wurden ohne technologische Zwischenschritte, wie dies bei der Pektinfertigung aus Apfeltrester passiert, aus frisch gepressten Apfelsäften gewonnen. Es stellte sich die Frage, wie es sich mit Extrakten verhält, die aus den Pressrückständen der Apfelsaftproduktion stammen, also dem was bei den bisherigen Apfelsaftextrakten als „Abfall“ übrig bleibt. Diese Frage ist auch in so fern interessant, als dass bei der Apfelsaftproduktion jährlich tonnenweise Nasstrester anfallen und dieser erstmal nicht weiter einsetzbar ist und zumeist nur als Tierfutter verwendet wird [Binnig, 2001].

Im Rahmen der Pektinproduktion aus Apfeltrestern fällt als interessantes Nebenprodukt ein polyphenolreicher Apfeltresterextrakt an. Aus dem Trester wird das in den Zellwänden enthaltene Pektin und (ungewollt) auch die Polyphenole herausgelöst, die dem Rohpektin eine bräunliche Farbe verleihen. Das Entfärben des Rohpektins geschieht mittels Adsorberharzen, an denen die Polyphenole gebunden werden. Nach der Elution und anschließender Trocknung fällt ein sehr polyphenolreicher Apfeltresterextrakt an [Carle et al., 2001; Carle und Schieber, 2006].

4.2.3.1 Einfluss von Apfeltresterextrakten auf die Aktivität des isolierten EGFR

Die Polyphenole, die bei der Pektinproduktion anfallen, liegen erstmal als wässrige Lösung vor. Es sollte daher zunächst der Einfluss von drei verschiedenen Trocknungsverfahren, Sprühtrocknung (Extrakt HF1), Bandtrocknung (Extrakt HF2) und Gefriertrocknung (Extrakt HF3) auf die biologische Aktivität untersucht werden.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass alle drei Rohextrakte sich in ihrer potenten Hemmwirkung mit einem IC_{50} -Wert von knapp unter 1 $\mu\text{g/ml}$ auf die PTK des EGFR praktisch nicht unterscheiden (siehe Abb. 4.19, Tab. 4.11) und das Trocknungsverfahren keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Extraktes nimmt. Für weitere Aufarbeitungsschritte des Rohextraktes wurde die Gefriertrocknung ausgewählt, da hierbei der Rohextrakt als gut lösliches, voluminöses Pulver anfällt und im Gegensatz zur Bandtrocknung thermische Zersetzungsprodukte von vornherein ausgeschlossen werden können.

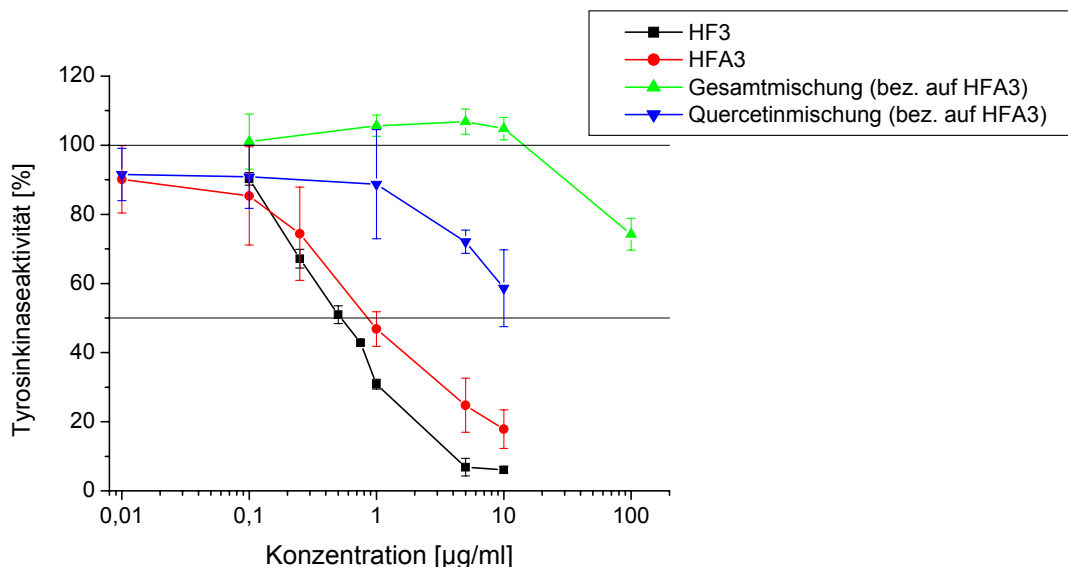


Abb. 4.19: Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR im ELISA durch die Apfeltrester-Extrakte HF3 und HFA3, sowie rekonstruierte Mischungen von HFA3; MW \pm SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4.11: IC₅₀-Werte der am isolierten EGFR getesteten Apfeltresterextrakte.

Extrakt	IC ₅₀ -Wert [µg/ml]
HF1	0,7 \pm 0,1
HF2	0,7 \pm 0,1
HF3	0,6 \pm 0,1
HFA1	0,7 \pm 0,1
HFA2	4,2 \pm 1,0
HFA3	0,9 \pm 0,1

Bei der weiteren Aufreinigung des Rohextraktes wurden drei Ansätze verfolgt. Zunächst entweder eine adsorptive Säulenaufreinigung mittels Amberlite® XAD 16 HP (Extrakt HFA1) oder eine Extraktion bei pH 1 mittels Ethylacetat (Extrakt HFA3) und zuletzt die Kombination beider Methoden (erst Säulenaufreinigung, dann Extraktion; Extrakt HFA2). Die Aufreinigungen konnten zwar teilweise den Gesamtpolyphenolgehalt um bis zu 20 % erhöhen, jedoch war keine substantielle Verbesserung der Hemmwirkung auf den Rezeptor zu beobachten, sondern eher eine Verschlechterung, wie bei Extrakt HFA2. Scheinbar führte die Kombination beider Aufreinigungsverfahren zu einem Verlust nicht identifizierter, jedoch aktivitätsbestimmender Inhaltsstoffe.

Um zu sehen, welchen Beitrag die bisher identifizierten Inhaltsstoffe zur Hemmung der PTK-Aktivität leisten können, wurden zwei rekonstituierte Mischungen der im Extrakt HFA3 identifizierten Polyphenole in äquimolaren Konzentrationen angefertigt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.12: Gehalte [mg/g] an monomeren Polyphenolen des Rohextraktes und der aufgereinigten Extrakte aus der Pektinproduktion; *kursiv* geschriebene Verbindungen sind nicht in der rekonstituierten Gesamtmischung enthalten; -: nicht nachweisbar [Rechkemmer, Universität Hohenheim, 2006].

Verbindung [mg/g]	Rohextrakt HF3	HFA1	HFA3	HFA2
Chlorogensäure	4,6	5,7	11,5	12,8
<i>p-Cumaroylchinasäure</i>	1,3	1,6	3,3	3,5
p-Cumarsäure	1,3	1,6	3,5	3,9
Ferulasäure	1,8	2,1	4,9	5,4
Sinapinsäure	0,8	0,9	1,9	2,1
Quercetin-3-rutinosid	3,1	3,8	-	-
Quercetin-3-galactosid	8,4	8,5	17,8	18,5
Quercetin-3-glucosid	4,1	4,7	9,9	10,3
Quercetin-3-rhamnosid	4,4	4,9	9,5	9,9
Quercetin	8,4	6,0	18,6	13,2
<i>Phloretin-2'-O-xyloglycosid</i>	12,5	16,3	16,4	19,8
Phloridzin	98,8	127,2	289,7	308,7
Phloretin	3,0	2,6	6,3	6,0

Eine Gesamtmischung enthielt alle identifizierten, bzw. verfügbaren (siehe Tabelle 4.12, *kursiv* gedruckte Verbindungen sind nicht enthalten) Polyphenole und eine Quercetinmischung, die alle identifizierten Quercetinglykoside und Quercetin enthielt. Die Quercetinmischung zeigte bei einer Konzentration von 10 µg/ml eine Hemmwirkung auf die PTK des EGFR, die Extrapolation der Kurve würde einen geschätzten IC₅₀-Wert von ~20-30 µg/ml ergeben (siehe Abb. 4.19). Die Gesamtmischung dagegen besaß eine geringere Wirkqualität und erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml wird die Aktivität des isolierten EGFR um ~30 % gehemmt. Im Vergleich der zwei Mischungen fiel auf, dass durch Anwesenheit der weiteren Polyphenole die Wirkqualität der PTK-Hemmung des Quercetinanteils in der Gesamtmischung wieder abgeschwächt wurde.

Eine Erklärung, wie es zu diesem Effekt kam, ist nicht ersichtlich. Im Vergleich zum nativen Extrakt HFA3 zeigten beide rekonstituierten Mischungen nur eine marginale Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFR.

Insbesondere die Gesamtmischung bestätigte die bisherigen Beobachtungen von Kern et al. [2005], die mit zwei rekonstituierten Apfelsaftextrakten ebenfalls nur eine marginale Hemmung des isolierten EGFR beobachten konnten. Wie bereits bei den Versuchen mit den rekonstituierten Extrakten des Extraktes AE04 beobachtet werden konnte, ist die Wirkungslosigkeit auf das Nichtvorhandensein von

Bestandteilen zurückzuführen, die für die Wirkqualität des Extraktes essentiell sind. Da von den Apfeltresterextrakten keine Daten zu oligomeren Procyanidinen vorlagen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass vorhandene, aber nicht identifizierte Procyanidine für die Wirkqualität des nativen Extraktes mitverantwortlich sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Rohextrakte, als auch die aufgereinigten Extrakte aus der Apfelpektin-Produktion potente Inhibitoren der PTK-Aktivität des isolierten EGFR im ELISA sind und mit den bisher untersuchten Apfelsaftextrakten in ihrer Wirkqualität vergleichbar sind.

4.2.3.2 Untersuchung von Fermentationsüberständen des Apfeltresterextraktes 4 aus einem verdauungsmimetischen Ansatz

Bei der Untersuchung von Fermentationsüberständen aus einem verdauungsmimetischen Ansatz ging es um die Fragestellung, wie sich die biologische Aktivität der im Extrakt enthaltenen Apfelpolyphenole nach Durchlauf des Gastrointestinaltraktes verändert. Da sich der Dickdarm, dem hauptsächlich Target einer möglichen chemopräventiven Wirkung der Polyphenole, am Ende des Gastrointestinaltraktes befindet, können durch Resorption, Zerfall, bzw. mikrobakteriellen Abbau, große Teile der in Apfelextrakten enthaltenen Polyphenole bis zum Erreichen des Dickdarmes verloren gehen [Kahle et al., 2007; Barth et al., 2005; Gossé et al., 2005].

Der verdauungsmimetische Ansatz diente der Simulation des Gastrointestinaltraktes, die den Mund, Magen, Dünndarm und Dickdarm umfasste (siehe Abb. 4.20). Dabei wurde versucht die physikalischen und chemischen Bedingungen des jeweiligen Abschnittes vom Verdauungstrakt möglichst realitätsnah zu simulieren.

Nach dem Lösen des zu fermentierenden Materials in PBS erfolgte zunächst die Simulation des Mundes. Hierzu wurde der Ansatz, nach Zugabe von α -Amylase für 5 min im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Für die Magensimulation wurde der Ansatz angesäuert (pH 2) und nach Zugabe von Pepsin für 2 h im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Die Resorptionsvorgänge des Dünndarms wurden mittels Dialyse simuliert. Nach Zugabe von intestinalem Extrakt, bestehend aus einer Hydrogencarbonat-gepufferten Lösung von Ochsen-galle und Pankreatin,

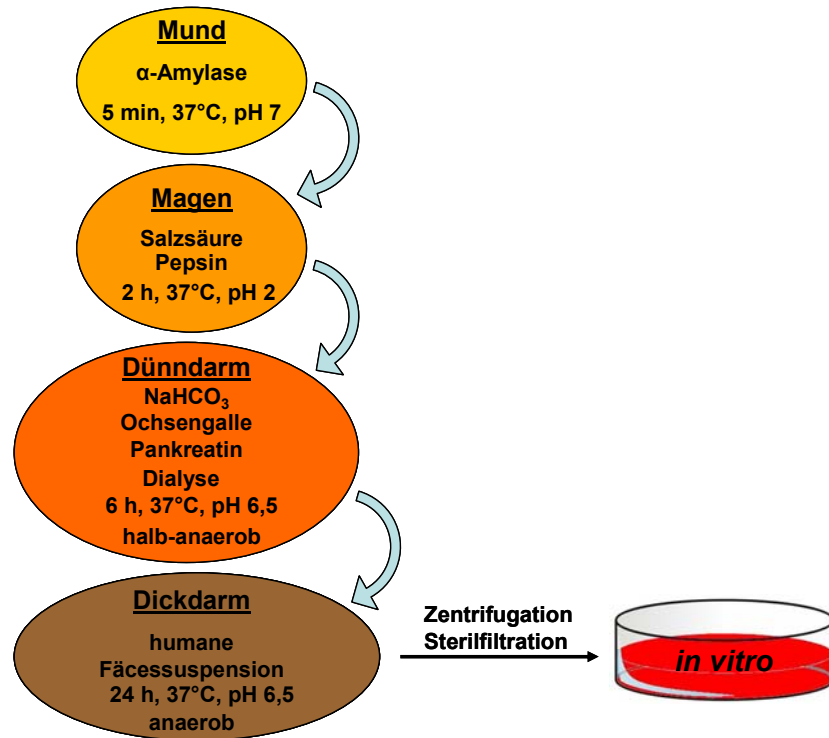


Abb. 4.20: Schematische Darstellung des verdauungsmimetischen Ansatzes zur Simulation des Gastrointestinaltraktes

wurde der Fermentationsansatz in Dialyseschläuche überführt und im Dialysepuffer in semianaerober Atmosphäre für 6 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Die Simulation des Dickdarmes und seiner mikrobakteriellen Flora geschah durch Inkubation mit humaner Fäcessuspension in anaerober Atmosphäre für 24 h im Schüttelwasserbad bei 37°C. Im Anschluss hieran wurde der verdauungsmimetische Ansatz mittels Zentrifugation und Sterilfiltration für einen Einsatz in der Zellkultur aufbereitet. Als Marker für die biologische Aktivität wurde die Hemmung der Autophosphorylierung des zellulären EGFR gewählt.

Um Abschätzen zu können, in wie weit die Veränderung und Degradation der Extraktinhaltsstoffe die biologische Aktivität senkt, wurde der Apfeltresterextrakt 4 einer Simulation des Gastrointestinaltraktes unterzogen und dann, sowohl unfermentiert als nativer Extrakt, als auch in Form des so genannten Fermentationsüberstandes am zellulären EGFR getestet. Extrakt 4 wurde aus dem Rohextrakt der Pektinproduktion durch adsorptive Säulenaufreinigung und Ethylacetat-Extraktion bei pH 7 erzeugt. Er ist, neben seinem hohen Gesamtpolyphenolgehalt, insbesondere durch einen hohen Gehalt an Phloridzin charakterisiert (siehe Tabelle 4.14). Der unfermentierte Extrakt hemmte die

Ergebnisse und Diskussion

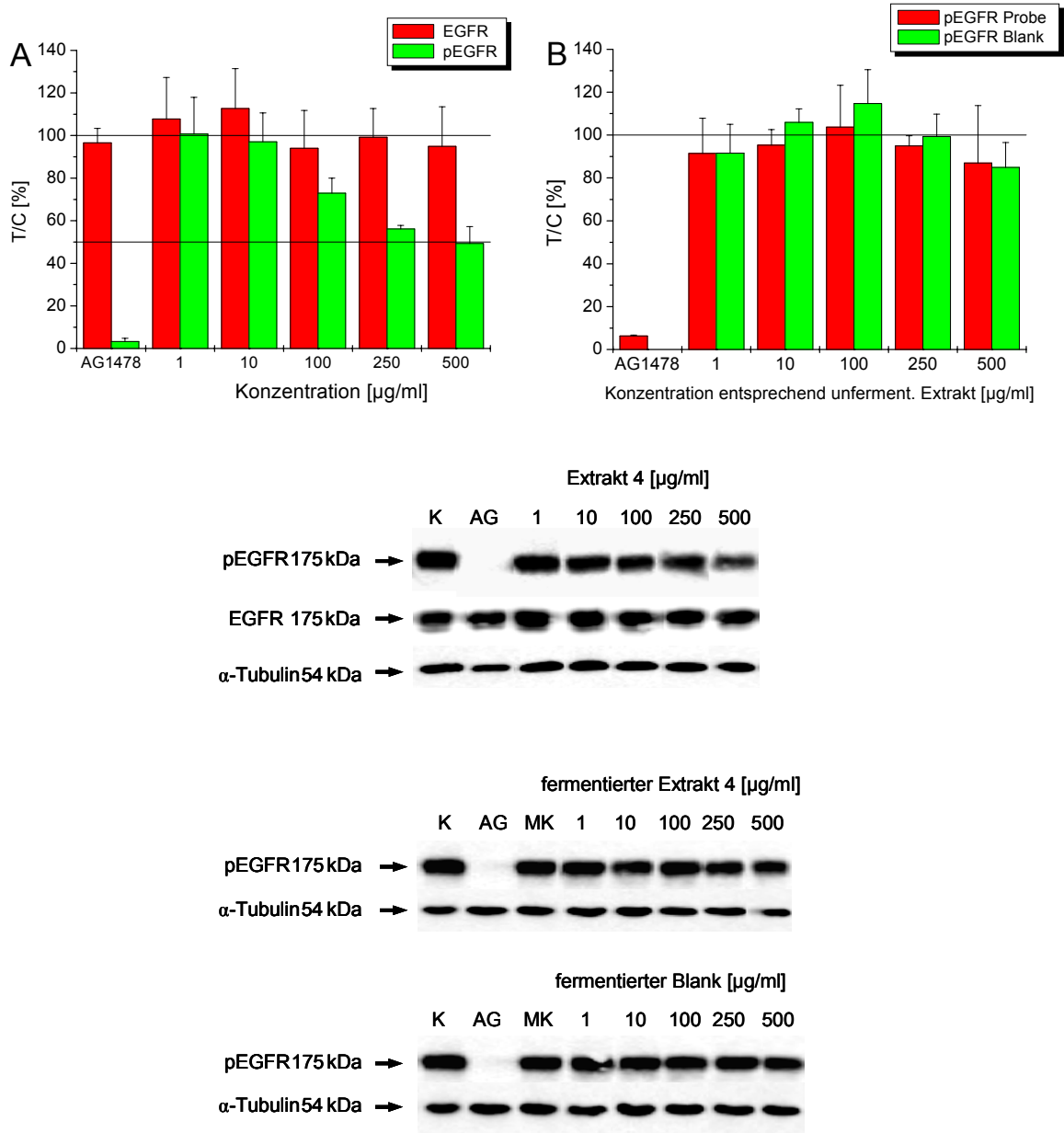


Abb. 4.21: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR (45 min) in EGF-stimulierten A431-Zellen durch (A) den Apfeltrester-Extrakt 4 und (B) des dazugehörigen Fermentationsüberstand; serumfreie Inkubation, Zusatz von 100 U/ml Katalase; K: Lösungsmittelkontrolle (1% DMSO); MK: Mediumskontrolle; AG: AG1478; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Autophosphorylierung des zellulären EGFR in der Vulvakarzinomzelllinie A431 konzentrationsabhängig ab 100 µg/ml. Die Hemmwirkung erreichte in der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml eine Hemmung der Rezeptoraktivität um etwa 50 %. Damit liegt die Hemmwirkung des Extraktes 4 in einem vergleichbaren Bereich mit den Extrakten der Mostapfelsorte Bohnapfel.

Die humane Vulvakarzinomzelllinie A431 wurde für 45 min serumfrei mit dem Fermentationsüberstand von Extrakt 4 und dem „Blank“ inkubiert. Dieser entsprach

dem extraktfreien Fermentationsüberstand. Dieser war nötig, da über die humanen Fäces biologisch aktive Substanzen in den Fermentationsüberstand eingebracht werden können. Um dies bei den durchgeführten Versuchen voneinander abgrenzen zu können, war die Mitführung des „Blank“ in selben Konzentrationen wie das Fermentat nötig. Die Inkubationskonzentrationen wurden so gewählt, dass es den Konzentrationen des unfermentierten Extraktes entsprach. Verglichen mit dem unfermentierten Extrakt (Abb. 4.21) bewirkte die verdauungsmimetische Behandlung des Extraktes einen substantiellen Verlust der biologischen Aktivität am EGFR. Da Fermentationsüberstände bereits in wässriger Form anfallen, war DMSO als Lösungsmittel nicht nötig. Sowohl die fermentierte Probe, als auch der „Blank“ wurden auf eine mitgeführte Mediumskontrolle (100 % Rezeptoraktivität) bezogen. Die mitgeführte Positivkontrolle (10 μ M Tyrphostin AG1478) dagegen war in DMSO gelöst, weshalb diese auf eine eigens mitgeführte Lösungsmittelkontrolle bezogen wurde. In keiner der getesteten Konzentrationen war ein signifikanter Unterschied zwischen fermentiertem Extrakt und „Blank“ zu beobachten. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Charakterisierung des Fermentationsüberstandes, da nur noch ein marginaler Rest des ursprünglich vorhandenen Gesamtpolyphenolgehaltes wieder gefunden wurde [Fromm, Universität Hohenheim, persönliche Mitteilung].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es bei dem gewählten verdauungsmimetischen Ansatz zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität kam, verursacht durch eine nahezu vollständige Degradation der im Extrakt vorhandenen Polyphenole.

4.2.4 Diskussion zur Modulation der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors durch Apfelpolyphenole

Polyphenole des Apfels sind bereits mehrfach in der Literatur als potente Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors beschrieben worden [Fridrich et al., 2007 a, b; Kern et al., 2005]. Bisher wurden aber nur Mischextrakte, die aus verschiedenen Apfelsorten hergestellt wurden und wenige Einzelsubstanzen auf eine potentielle Hemmwirkung des zellulären EGFR untersucht. Bei der Frage, in wie weit die Apfelsorte und Art der Extrakterstellung einen Einfluss auf die Aktivität des EGFR haben, erfolgte zunächst ein Screening von 24 verschiedenen sortenreinen Apfelsaftextrakten mittels ELISA an der isolierten Rezeptor-Präparation. Dabei wirkten alle untersuchten Mostapfelextrakte mit einem IC_{50} -Wert um 1-2 $\mu\text{g/ml}$ als sehr potente Hemmstoffe der PTK-Aktivität des EGFR. Die ebenfalls untersuchten Tafelapfel-Extrakte (Topaz) zeigten mit einem IC_{50} -Wert zwischen 3 bis 7 $\mu\text{g/ml}$ eine marginal schwächere Wirkung am isolierten EGFR, im Vergleich zu den Mostapfelextrakten (siehe Abb. 4.7), stellten aber für sich betrachtet ebenfalls potente Inhibitoren dar, da die Hemmwirkungen bisher untersuchter Mischextrakte (AE02, AE04, AE05) im selben Wirkungsbereich lagen (IC_{50} -Wert zwischen 0,3 – 10 $\mu\text{g/ml}$) wie die untersuchten sortenreinen Apfelsaftextrakte [Kern et al., 2005; Dissertation Melanie Kern; Dissertation Diana Fridrich]. Interessant sind die Ergebnisse zur Herstellungsart. Während bei den Mostapfelextrakten die Art des Ausgangssaftes (klar/trüb) keinen Einfluss zu haben schien und auch die Art der verwendeten Säule (SP70/XAD16) nur einen marginalen Einfluss auf die biologische Aktivität der Extrakte hatte, bewirkte die Verwendung von trübem Saft bei den Tafelapfelextrakten eine Steigerung der Hemmwirkung um 40-50 %, das Säulenmaterial hatte dabei keinen Einfluss. Diese Beobachtung wäre mit den Analysedaten in Verbindung mit dem Testsystem erklärbar. Die Mostapfelextrakte besaßen alle einen Gesamtpolyphenolgehalt von etwa 350 bis 450 $\mu\text{g/ml}$, die Tafelapfelextrakte dagegen eine deutlich niedrigeren von etwa 90 bis 130 $\mu\text{g/ml}$. Da im zellfreien ELISA alle Inhaltsstoffe des komplexen Extraktes in der Lage sind mit dem Rezeptor zu interagieren, bedarf es in diesem System letztendlich nur einer gewissen Mindestmenge an Polyphenolen für eine potente Hemmwirkung. Diese Mindestmenge war mit den Mostapfelextrakten deutlich überschritten, daher konnte zwischen den einzelnen Extrakten auch praktisch kein Unterschied in der

Wirkqualität gemessen werden. Diese Mindestmenge befand sich aber wahrscheinlich im Bereich der Polyphenolgehalte der Topazextrakte. Die Extrakte aus trübem Saft besaßen einen Gesamtpolyphenolgehalt von etwa 116 bis 130 µg/ml, die aus dem klaren Saft dagegen nur etwa 90 bis 110 µg/ml. Dies würde erklären, wieso bei den Tafelapfelextrakten die Art des Ausgangssaftes einen Einfluss auf die biologische Aktivität hatte, aber dies bei den Mostäpfeln nicht beobachten werden konnte, obwohl auch hier die Extrakte aus trübem Saft einen höheren Gesamtpolyphenolgehalt aufwiesen, aber dies keinen Einfluss mehr auf die biologische Aktivität der Extrakte hatte.

Diese Beobachtung einer „Sättigung“ der Hemmwirkung deckt sich mit den Ergebnissen aus den Versuchen der Apfeltrestereextrakte am isolierten EGFR (siehe Tabelle 4.11). Die Rohextrakte HF1-3 lagen bereits mit IC_{50} -Werten von etwa 0,7 µg/ml in einem Konzentrationsbereich, der von einem Apfelextrakt noch nicht unterschritten wurde. Die bisher stärkste Hemmwirkung wurde bisher beim AE04 gemessen (IC_{50} -Wert: $0,3 \pm 0,04$ µg/ml). Auch in dieser Versuchsreihe ließ sich die Hemmwirkung der Apfeltrestereextrakte durch weitere Aufreinigungsschritte und einer Erhöhung des Gesamtpolyphenolgehalts nicht weiter verstärken. Es konnte sogar teilweise eine marginale Abschwächung der Hemmwirkung beobachtet werden.

Bei den „hochpolyphenolhaltigen“ Extrakten, wie aus Mostäpfeln oder den Apfeltrestern, waren die Unterschiede und mögliche Veränderungen der Extrakte zueinander eher quantitativen Charakters, d.h. die wirksamen Inhaltsstoffe waren in allen Extrakten bereits vorhanden. Deren quantitative Zunahme bewirkte aber nicht automatisch einen Anstieg der Hemmwirkung am isolierten EGFR, da die Rezeptoraktivität bereits in geringen Konzentrationen durch dieses Polyphenolspektrum gehemmt wurde. Bei Einzelverbindungen ist der ELISA aber eine sinnvolle und aussagekräftige Screeningmethode, um abzuklären, ob eine Verbindung strukturell überhaupt in der Lage sein könnte, die Autophosphorylierung des EGFR zu hemmen, bevor aufwendige Versuche auf zellulärer Ebene mittels Western Blot Analyse durchgeführt werden. Es muss daher kritisch angemerkt werden, dass der zellfreie ELISA als Testsystem bei komplexen Extrakten mit hohem Polyphenolgehalt und ähnlicher qualitativer Zusammensetzung, nur eingeschränkt einsetzbar ist, um Unterschiede in der biologischen Aktivität zu bestimmen.

Nachdem Most- und Tafelapfelextrakte im ELISA gleichfalls eine potente Inhibierung des EGFR zeigten, wurden die Bohnapfel- und Topazextrakte am zellulären Rezeptor getestet. Bei Versuchen an intakten Zellen ist besonders die zelluläre Aufnahme als limitierender Faktor zu sehen, da bei einer Inkubationsdauer von 45 min Faktoren wie Metabolisierung oder Zerfall von eher untergeordneter Bedeutung zu sehen sind. So konnten Schäfer et al. [2006 a] bei Stabilitätsuntersuchungen unter Zellkulturbedingungen mit der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (in DMEM) eine konzentrationsabhängige Abnahme für die Hauptkomponenten von Apfelsaftextrakten zeigen. Innerhalb der ersten Stunde wurde nur für die Aglyka Quercetin und Phloretin eine Konzentrationsabnahme von ~30 % gemessen, die restlichen Verbindungen (Phloridzin, Quercetinrutinosid, Epicatechin, Kaffeesäure und Chlorogensäure) zeigten sich innerhalb der ersten Stunde stabil.

Die Versuche zur Hemmung des zellulären EGFR zeigten einen deutlicheren Unterschied zwischen Most- und Tafelapfel in der biologischen Aktivität, als zuvor im ELISA (siehe Abb. 4.8). Für die Bohnapfelextrakte konnte insgesamt eine potente Hemmwirkung auf den EGFR gezeigt werden. Im Vergleich der vier getesteten Bohnapfelextrakte scheint das SP70 Säulenmaterial eine geringfügig stärkere Adsorptionswirkung für Polyphenole zu besitzen, was sich neben einem höheren Polyphenolgehalt auch in einer potenteren Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR äußerte. Ein Unterschied in der Wirkqualität zwischen trübem und klarem Bohnapfelextrakt war nicht zu erkennen. Allgemein lässt sich sagen, dass alle vier Bohnapfelextrakte ähnliche Hemmeffekte aufwiesen und ab einer Konzentration von 500 µg/ml der Phosphorylierungsstatus des EGFR in der Vulvakarzinomzelllinie A431 um 50 % reduziert wurde. Im Gegensatz dazu vermittelten die vier Extrakte des Topaz nur eine marginale Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR.

Im Vergleich zu den bisher untersuchten Apfelmischextrakten zeigten die Bohnapfelextrakte eine schwächer ausgeprägte Hemmwirkung. Der Extrakt AE04 hemmte in A431-Zellen die Autophosphorylierung bereits bei 100 µg/ml um etwa 50 %. Eine ebensolche Wirkqualität besaß auch der AE02 in HT29-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 90 ± 12 µg/ml [Fridrich, et al., 2007 a]. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass durch die Mischung mehrerer Apfelsorten ein Polyphenolprofil erzeugt werden kann, das eine potentere Wirkqualität für die Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR aufweist. Allerdings wäre es auch möglich, dass die unterschiedlichen Wirkqualitäten von Mischextrakten und sortenreinen

Bohnapfel-Extrakten durch Jahrgangsunterschiede verursacht wurden, da die Schwankungsbreite im Polyphenolgehalt derselben Sorte bis zu 300 % betragen kann [Prof. Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim, persönliche Mitteilung].

Bei der Frage nach relevanten Inhaltsstoffen, die für die Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR verantwortlich sind, erwiesen sich die bisherigen untersuchten Extrakte als zu komplex für die Beantwortung dieser Frage. Daher wurde der Apfelsaftextrakt AE06 in 8 Fraktionen aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen enthielten alle, neben Einzelverbindungen, oligomere Procyanidine (siehe Tabelle 4.7). Der Procyanidingehalt nahm dabei mit steigender Fraktionsnummer kontinuierlich zu. Der mittlere Oligomerisierungsgrad war über alle Fraktionen nahezu konstant [Wolfgang Hümmer, Dissertation]. Eine Interpretation und Zuordnung der Hemmwirkung durch die einzelnen Bestandteile der Extraktfraktionen war nur bei S.33 und S.38 möglich, da hier über die enthaltenen Verbindungen genügend Literaturdaten vorliegen. Im Folgenden wird neben dem Gehalt im Extrakt auch die Molarität (in Klammern) der Einzelverbindungen, wie sie in 100 µg/ml Inkubationskonzentration der Extraktfraktion vorliegt, angegeben.

Die hochpotente Fraktion S.33 enthielt als monomere Verbindungen 25,0 mg/g (7,4 µM) 4-Cumaroylchinasäure, 371 mg/g (104 µM) Chlorogensäure, 35,8 mg/g (8,2 µM) Phloridzin und 95,6 mg/g (16,4 µM) Phloretin-2'-O-xyloglucosid, sowie 357 mg/g oligomere Procyanidine. Da 4-Cumaroylchinasäure, Chlorogensäure und Phloridzin (ELISA IC₅₀-Wert: 267 µM) in den enthaltenen Konzentrationen selbst am isolierten Rezeptor wirkungslos sind, konnten sie bei Fraktion S.33 keinen Beitrag zu Hemmwirkung leisten [Kern et al., 2005]. Dagegen zeigte Phloretin-2'-O-xyloglucosid im ELISA eine hochpotente Hemmwirkung auf den isolierten EGFR (IC₅₀-Wert: 0,4 µM). Diese Wirkqualität war aber auf den isolierten Rezeptor beschränkt, da die Verbindung am zellulären EGFR bis 100 µM keine Wirkung zeigte und daher wahrscheinlich nicht in der Lage war in ausreichender Konzentration in die Zelle zu gelangen. Daher konnte die Wirkung dieser Fraktion nur noch von den enthaltenen oligomeren Procyanidinen oder einer noch nicht identifizierten Substanz verursacht worden sein. Da die Summe der identifizierten Komponenten bei Fraktion S.33 88,5 % beträgt, wäre es möglich, dass noch weitere, unbekannte Bestandteile der Fraktion S.33 einen Beitrag zur Hemmwirkung leisten könnten [persönliche Mitteilung von Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg].

Bei den Procyanidinen ist besonders der Oligomerisierungsgrad von großem Einfluss auf die biologische Aktivität. Wie Versuche am isolierten Rezeptor mit Fraktionen unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades an Procyanidinen ergaben, steigt die Hemmwirkung mit steigendem Oligomerisierungsgrad. Diese Beobachtungen sind aber nicht auf den zellulären Rezeptor übertragbar, wie Fridrich et al. [2007 b] anhand von isolierten Procyanidinen zeigen konnten. Während das Trimer eine hochpotente Hemmwirkung am zellulären Rezeptor besitzt (IC_{50} -Wert: $35 \pm 15 \mu M$), ist das Tetramer wirkungslos an der Zelle. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Hemmwirkung oligomerer Procyanidine auf die EGFR-Aktivität in intakten Zellen durch das Molekulargewicht limitiert zu sein scheint. Somit war es nur einem Teil der in Apfelextrakten enthaltenen Procyanidine möglich, ihre Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR in der Zelle zu entfalten. Da über die Zusammensetzung der oligomeren Procyanidine, die in jeder Fraktion enthalten waren, nur bekannt ist, dass der mittlere Oligomerisierungsgrad über alle Fraktionen nahezu konstant ist, keine weiteren Informationen vorliegen, kann an dieser Stelle über ihren Beitrag zur Hemmwirkung von Fraktion S.33 nur spekuliert werden. Wie Nachmessungen zeigten, war zudem die aktive Komponente von Fraktion S.33 sehr instabil und bereits nach 4 Monaten zeigte die Fraktion keine Wirkung mehr. Es ist wahrscheinlich, dass der Zerfall auch im Ausgangsmaterial stattgefunden haben muss, da nach einer Wiederholung der Fraktionierung weder in Fraktion S.33N, noch in einer anderen benachbarten Fraktion diese hochpotente Wirkung wieder zu finden war.

Fraktion S.34 hemmte bei $100 \mu g/ml$ die Autophosphorylierung des EGFR um etwa 35 %. Die Fraktion enthielt neben den bereits erwähnten Verbindungen, die keine EGFR-inhibierenden Eigenschaften aufweisen und auf die hier nicht näher eingegangen wird, mit $153,7 \text{ mg/g}$ ($26,6 \mu M$) eine große Menge an Procyanidin B3, $16,4 \text{ mg/g}$ ($2,8 \mu M$) Phloretin-2'-O-xyloglucosid sowie 665 mg/g oligomere Procyanidine. Da Fridrich et. al. [2007 b] Procyanidin B3 bereits im zellfreien Testsystem als potenten Hemmstoff identifizierten (IC_{50} -Wert: $\sim 10 \mu M$), sowie das Trimer im zellulären Testsystem potente Hemmeigenschaften aufweist, wäre es ebenfalls möglich, dass das Dimer auch eine Wirkung auf den zellulären EGFR besitzt und daher einen Beitrag zur Wirkqualität der Fraktion S.34 leisten konnte.

Die Fraktion S.35, S.36 und S.37 enthielten neben dimeren Procyanidinen nur noch oligomere Procyanidine in steigenden Konzentrationen, was darauf schließen lässt, dass ein zunehmender Einfluss auf die Hemmwirkung von den Procyanidinen ausgeht. Insbesondere Fraktion S.35 und S.36 waren in ihrer Zusammensetzung ähnlich, jedoch wies S.36 eine potentere Hemmwirkung gegenüber S.35 auf. S.37 besitzt nach Fraktion S.33 die potenteste Wirkung aller untersuchten Fraktionen und bestand nur aus dimeren (Σ 96,4 mg/g) und 935 mg/g oligomeren Procyanidinen. Fraktion S.38 dagegen bestand nur aus oligomeren Procyanidinen und wies eine marginal schwächere Wirkqualität auf, als Fraktion S.37. Dies könnte darauf schließen lassen, dass die dimeren Procyanidine in Fraktion S.37 einen Beitrag zur Hemmwirkung der Fraktion leisten.

Fraktion S.38 bestand nur aus oligomeren Procyanidinen. Die Hemmwirkung von ~55 % bei 100 $\mu\text{g/ml}$ bestätigte die Auffassung, dass oligomere Procyanidine nicht nur am isolierten Rezeptor sondern auch am zellulären Rezeptor eine potente Hemmwirkung besitzen. In dieser Fraktion müssten sich aufgrund bisheriger Beobachtungen von Fridrich et al. [2007 b] vorwiegend Procyanidine mit einem Oligomerisierungsgrad kleiner 4 befinden, damit eine Aktivitätsmodulation am zellulären Rezeptor messbar wäre. Der IC_{50} -Wert von 35 μM für das Procyanidintrimer entspricht einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ [Fridrich et. al., 2007 b]. Somit müsste die Fraktion S.38, für die gemessene Hemmung von ~55 %, theoretisch knapp ein Drittel Procyanidintrimer enthalten haben, wenn alle anderen Bestandteile von S.38 wirkungslos wären. Folglich müsste die Fraktion S.38 noch weitere höheroligomere und somit wirkungslose Procyanidine enthalten haben, da nach Fridrich et al. [2007 b] das Tetramer am zellulären Rezeptor bereits wirkungslos war.

Wegen des massiven Aktivitätsverlustes von Fraktion S.33 erfolgte eine komplette Wiederholung der Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE06, um herauszufinden, ob dieser Aktivitätsverlust in der Fraktion oder bereits im Ausgangsmaterial stattgefunden hat. Die neue Fraktionierung (N) führte dabei zu einer veränderten Zusammensetzung (siehe Tabelle 4.8) und folglich auch zu einer veränderten Wirkqualität der einzelnen Fraktionen (siehe Abbildung. 4.13). In Verbindung mit den Analysendaten bestätigte sich die Auffassung über die essentielle Rolle der Procyanidine für die Hemmwirkung. Die Wirkqualität von Fraktion S.33 konnte

allerdings nicht wieder gefunden werden, wodurch anzunehmen ist, dass die aktivitätsbestimmende Komponente bereits im Ausgangsmaterial verloren ging.

Eine Hemmwirkung konnte nur ab Fraktion S.35N gemessen werden, wobei sich die Wirkung mit der Elutionszeit verstärkte und Fraktion S.38N eine hochpotente Hemmung des zellulären EGFR mit einem IC_{50} -Wert von knapp über 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigte. Die letzten drei Fraktionen (S.36N, S.37N und S.38N) bestanden diesmal nur aus oligomeren Procyanidinen. Lediglich Fraktion S.35 enthielt, neben den oligomeren Procyanidinen, an biologisch aktiven Komponenten noch die dimeren Procyanidine B2 und B3. Bei der neuen Fraktionierung korrelierten Elutionszeit und Steigerung der biologischen Aktivität noch intensiver, als bei der ersten Fraktionierung. Die hochpotente Fraktion S.38N müsste theoretisch fast vollständig aus Procyanidintrimer bestanden haben, da die Fraktion in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eine Hemmung der Rezeptoraktivität um 43 % bewirkte, das Procyanidintrimer besitzt in einer Konzentration von 10 μM (= 8,7 $\mu\text{g/ml}$) laut Friedrich et al. [2007 b] ebenfalls eine Hemmwirkung von ≥ 40 %. Somit müsste die Fraktion S.38N aufgrund ihrer Wirkqualität theoretisch zu knapp 90 % aus Procyanidintrimer bestanden haben.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Funktion der Procyanidine als Aktivitätspromotor in den Apfelsaftextrakten konnten zusätzlich noch durch Versuche mit rekonstituierten Extrakten bestätigt werden. Für die Untersuchungen standen zwei rekonstituierte Extrakte und deren native Vorlage, der Apfelsaftextrakt AE04 zur Verfügung. Die künstlichen Extrakte enthielten beide dieselben Einzelverbindungen, aber nur einer enthielt oligomere Procyanidine, der andere war im Gehalt an Procyanidinen mit Glucose substituiert. Der procyanidinfreie Extrakt zeigte sowohl auf den isolierten, als auch auf den zellulären EGFR keine Wirkung, wie dies bereits von anderen, ebenfalls procyanidinfreien, rekonstituierten Extrakten in der Vergangenheit berichtet wurde [Kern et al., 2005]. Der procyanidinhaltige rekonstituierte Extrakt dagegen zeigte im ELISA eine potente Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR (siehe Abb. 4.9), die mit einem IC_{50} -Wert von 1,4 $\mu\text{g/ml}$ sehr nah an der Wirkqualität des nativen Extraktes (IC_{50} -Wert: 0,4 $\mu\text{g/ml}$) lag. Die Hemmwirkung des procyanidinhaltigen, rekonstituierten Extraktes war jedoch nicht auf den isolierten EGFR beschränkt, sondern zeigte sogar eine Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des zellulären EGFR (siehe Abb. 4.10), die zwar etwa eine Zehnerpotenz schwächer war, als die des nativen Extraktes AE04, aber mit der Wirkqualität der Bohnapfel-XAD-

Extrakte verglichen werden kann. Somit konnte zum ersten Mal mit einem rekonstituierten Extrakt am zellulären EGFR eine potente Hemmung auf die Autophosphorylierung des EGFR nachgewiesen werden. Zudem war die Wirkqualität des rekonstituierten Extraktes eindeutig den zugesetzten Procyanidinen zuzuschreiben, da der analoge, aber procyanidinfreie Extrakt keine Wirkung zeigte.

Zusammenfassend kann aus den Fraktionierungen des Apfelsaftextraktes AE06 das Resümee gezogen werden, dass die Procyanidine einen wesentlichen Beitrag zur Hemmwirkung der Fraktionen leisten und die enthaltenen monomeren Bestandteile höchstens modulierend auf die Wirkqualität der untersuchten Fraktionen wirken, da bisher nur Quercetin und Procyanidinen eine Hemmung der zellulären Rezeptoraktivität nachgewiesen werden konnte [Diana Fridrich, Dissertation].

Dies konnte auch anhand der Phloretinderivate und deren Glykoside gezeigt werden, die zwar größtenteils hochpotente Inhibitoren am isolierten Rezeptor darstellen, jedoch im zellulären Testsystem keine oder bestenfalls marginale Wirkung aufwiesen. Denkbar wären höchstens additive oder synergistische Effekte zwischen den oligomeren Procyanidinen und monomeren Verbindungen. Jedoch finden sich für eine Procyanidin-vermittelte Steigerung der zellulären Aufnahme, die dann zu einer höheren intrazellulären Konzentration von hochpotenten Verbindungen, wie dem Phloretin-2'-O-xyloglucosid führen könnte, bisher noch keine Hinweise. Es konnte allerdings von Faria et al. [2006] gezeigt werden, dass die apikale Aufnahme von MPP^+ (1-Methyl-4-Phenylpyridinium) in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 organische Kationen Transporter (OCT) durch oligomere Procyanidine gesteigert wird. Analoge Beobachtungen konnten für auch für polyphenolhaltige Lebensmittel wie Rotwein und Grünen Tee gemacht werden [Monteiro et al., 2005 a, b]. Es fanden sich jedoch keine Hinweise in der Literatur, die Polyphenole als Substrate von OCTs beschreiben.

Es stellte sich jedoch die Frage, was es den oligomeren Procyanidinen ermöglicht, diese potente Hemmwirkung auf den EGFR auszuüben, da es als nicht sehr wahrscheinlich angesehen werden kann, dass das Trimer problemlos in größeren Mengen in die Zelle aufgenommen wird. Appeldoorn et al. [2009] konnten in Ratten eine Aufnahme von dimeren Procyanidinen im Dünndarm nachweisen. Versuche mit Monolayern von Caco-2-Zellen (Kolonadenom-Zelllinie) zeigten bei der Durchlässigkeit der Monolayer eine Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad der Procyanidine. Erst als durch eine Reduktion der Ca^{2+} -Ionenkonzentration, die für die

Integrität der „tight-junctions“ verantwortlich ist, konnte auch für höheroligomere Procyanidine eine verstärkte Aufnahme beobachtet werden [Déprez et al., 2001]. Allerdings deuten diese Ergebnisse nur auf eine Aufnahme ins Gewebe über den parazellulären Weg und sind noch kein Beweis für eine Aufnahme von Procyanidinen durch die Plasmamembran in eine einzelne Zelle.

Das Problem einer fehlenden oder nur marginalen zellulären Aufnahme wurde auch an den Phloretinderivaten sehr deutlich. Am isolierten Rezeptor, der von allen Seiten frei zugänglich ist, konnten die Phloretinderivate die eigentlich intrazellulär liegende Kinasedomäne inhibieren. Sobald der Rezeptor in den intakten Zellen in die Zellmembran integriert ist und die Kinasedomäne nicht mehr frei zugänglich ist, waren die Phloretinderivate nicht mehr in der Lage, die Rezeptoraktivität zu inhibieren. Daher wäre für die Procyanidine ein Wirkmechanismus denkbar, bei dem der Rezeptor von der extrazellulären Domäne ausgehend, also der Ligandenbindungsstelle, inhibiert wird. Untersuchungen von Liang et al. [1997] belegten mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat aus grünem Tee an A431-Zellen, dass die Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR durch eine Blockierung der Ligandenbindungsstelle möglich ist. Da (-)-Epigallocatechingallat und Procyanidine aufgrund der zugrunde liegenden Catechinstruktur eine gewisse strukturelle Verwandtschaft besitzen, erscheint eine Interaktion über die extrazelluläre Domäne durch oligomere Procyanidine als nicht ausgeschlossen.

Die bisherigen Versuche und Erkenntnisse zur Wirkung von Apfelextrakten erfolgten immer mit dem kompletten Extrakt, wie er beim Eintritt in den Körper bei der Essensaufnahme vorliegt. Der Wirkort für eine mögliche chemopräventive Wirkung ist der Dickdarm, da Tumore des Dünndarmes gegenüber Kolorektaltumoren statistisch nur eine untergeordnete Rolle spielen [Statistik Robert-Koch-Institut, 2003]. Jedoch kommen nicht alle mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole auch in unveränderter Menge im Dickdarm an. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit deuten auf eine geringe systemische Verfügbarkeit hin, so dass der Darm als der Hauptwirkungsort angesehen werden muss. Die Ergebnisse von Studien zur Bioverfügbarkeit sind sehr von den Rahmenbedingungen abhängig, also ob eine Human- oder Tierstudie durchgeführt und wie die Applikationsform (Saft, Extrakt, Reinsubstanz) gewählt wurde. Dementsprechend fallen auch die Ergebnisse dieser Studien unterschiedlich aus [Manach et al., 2005]. Allerdings zeichnet sich insgesamt ab, dass monomere Polyphenole einer stärkeren Degradation unterliegen, als

oligomere Procyanidine, wobei hier die intestinale Mikroflora eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Hierbei findet zunächst ein mikrobieller Abbau der Oligomere statt, bevor die monomeren Bausteine weiter zu Phenolcarbonsäuren abgebaut werden [Gonthier et al., 2003; Rios et al., 2003; Déprez et al., 2000]. Diese Beobachtungen konnten von Kahle et al. [2005 b] bei Studien mit Ileostoma-Patienten bestätigt werden. Dabei war eine fast vollständige Degradation der monomeren polyphenolischen Bestandteile zu verzeichnen, wobei oligomere Procyanidine in die monomeren Bausteine zerlegt wurden, so dass eine auffallend hohe Konzentration an (-)-Epicatechin in der Ileostoma-Flüssigkeit zu finden war. In einer späteren Studie charakterisierte Kahle et al. [2007] einen hohen Anteil (47 %) der zuvor durch einen Liter trüben Apfelsaft verabreichten Polyphenole in der Ileostoma-Flüssigkeit wieder. Bei den oligomeren Procyanidinen waren es sogar über 90 % die wieder gefunden wurden, wobei es auch hier in Abhängigkeit von der Zeit zu einer Verringerung des Oligomerisierungsgrades kam. Es kann damit nicht pauschal gesagt werden, wie viel der aufgenommenen polyphenolischen Verbindungen den Dickdarm erreichten, jedoch belegen *in vivo* Studien, dass zumindest Procyanidine in scheinbar ausreichender Menge den Dickdarm erreichen, um eine protektive Wirkung gegenüber tumorinitiierenden und/oder -promovierenden Vorgängen zu haben [Barth et al., 2007; Barth et al., 2005; Gossé et al., 2005].

Um herauszufinden, wie sich die biologische Aktivität der Apfelextrakte durch Resorption, Zerfall und mikrobakteriellen Abbau verändert, wurde der Apfeltrestereextrakt 4 einer Simulation des Gastrointestinaltraktes unterzogen. Dabei durchlief der Extrakt von Mund, Magen, Dünndarm und Dickdarm alle Stationen einer Gastrointestinalpassage (siehe Abb. 4.20). Dieser verdauungsmimetische Ansatz führte jedoch zu einem fast vollständigen Verlust der ursprünglich enthaltenen Polyphenole, was folglich auch zu einem vollständigen Verlust der Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des zellulären EGFR führte (siehe Abb. 4.21). Wie bereits gezeigt werden konnte, bewirken die monoaromatischen Abbauprodukte der Polyphenole, meist einfache Phenolcarbonsäuren, keine Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung [Kern et al., 2007 b].

Veeriah et al. [2007] fermentierten unter vergleichbaren Bedingungen verschiedene Apfelsaftextrakte und mussten ebenfalls eine durchschnittliche Degradation von 99,9 % der ursprünglich enthaltenen Polyphenole beobachten, gleichzeitig stieg jedoch der Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren und es wurden Metabolite von oligomeren

Procyanidinen gefunden. Bei der Untersuchung der wachstumshemmenden Eigenschaften nach 48 h war ein potenter Wirkungsabfall (~Faktor 10) durch die Fermentation zu beobachten. Jedoch zeigte der Fermentationsüberstand durchaus noch wachstumshemmende Eigenschaften, die jedoch mehr den Metaboliten der oligomeren Procyanidine, als den kurzkettigen Fettsäuren zugeschrieben wurde. Somit schienen die Fermentationsüberstände von Veeriah et al. [2007] über Apoptoseinduktion oder Zellzyklusarrest eine Wachstumshemmung zu verursachen. Bei der Übertragung der Ergebnisse von den Versuchen mit den Fermentationsüberstände auf die reale Situation im Körper ist jedoch ein kritischer Blick angesagt, da vor dem Einsatz in den Testsystemen der Zellkultur eine umfangreiche Aufreinigung und Sterilfiltration des Fermentationsüberstandes stattfand, um die enthaltenen Bakterien der zugesetzten Fäces wieder abzutrennen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass hierbei ebenfalls relevante Bestandteile mit entfernt wurden. Zudem repräsentiert der Fermentationsüberstand die Situation, wie sie am Darmausgang, also nach 24 h Dickdarmpassage vorliegt. Interessant ist jedoch mehr die Frage, was im Dickdarm während der Verweilzeit des Speisebreis für Konzentrationen an Polyphenolen vorliegen, da hier das Zielorgan für chemopräventive und tumorproliferationshemmende Eigenschaften liegt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Apfelsaft- und Apfeltresterextrakte potente Inhibitoren des zellulären EGFR repräsentieren. Als relevante Inhaltstoffe für die Wirkqualität von Apfelextrakten konnten dabei durch verschiedene Versuche mit Extrakten, rekonstituierten Extrakten, Fraktionen und Einzelverbindungen die Gruppe der Procyanidine identifiziert werden. Die oligomeren Procyanidine zeichnen sich, im Vergleich zu monomeren Verbindungen zudem durch eine höhere Stabilität im Gastrointestinaltrakt aus, so dass noch relevante Konzentrationen im Dickdarm vorliegen können, um eine mögliche chemopräventive Wirkung zu entfalten [Kahle et al., 2007; Gossé et al., 2005]. Allerdings finden sich Procyanidine praktisch nur in naturtrüben Apfelsäften, wohingegen in geklärten Apfelsäften es zu einem hohen Verlust an Procyanidinen kommt [$>50\%$, persönliche Mitteilung Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim]. Der Restgehalt an Procyanidinen ist im klaren Apfelsaft, nach bisherigem Kenntnisstand, zu niedrig als dass davon eine chemopräventive Wirkung ausgehen könnte.

4.3 Zelluläre Wirkung von Apfeltresterextrakten

Im Rahmen der Pektinherstellung aus Apfeltrestern fällt ein polyphenolreicher Rohextrakt an, der auf drei verschiedene Arten getrocknet wurde (Sprühtrocknung, Extrakt HF1; Bandrocknung, Extrakt HF2; Gefriertrocknung, Extrakt HF3). Es zeigte sich jedoch, dass die drei Extrakte sich in ihrer Hemmwirkung auf die PTK des EGFR und das Zellwachstum nicht unterscheiden und das Trocknungsverfahren keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Extraktes nimmt. Für weitere Aufarbeitungsschritte des Rohextraktes wurde die Gefriertrocknung ausgewählt. Hierzu wurde der lyophilisierte Apfeltrester-Rohextrakt HF3 vom Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim weiter aufgereinigt und konzentriert (siehe Tabelle 4.13). Es wurde zum einen die Lösungsmittelextraktion durch die Verwendung von Solventien unterschiedlicher Polarität, wie Ethylacetat und n-Butanol verwendet, zum anderen die adsorptive Aufreinigung mittels Styrol-Divinylbenzol-Copolymers Amberlite® XAD-16 HP und anschließender Extraktion mittels Ethylacetat bei verschiedenen pH-Werten. Nach eingehender Charakterisierung der so erhaltenen Extrakte wurden diese in lyophilisierter Form an das Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, der Universität Karlsruhe zur Bewertung der *in vitro*-Aktivität weitergeleitet. Tabelle 4.13 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen Aufreinigungsschritte der untersuchten Extrakte und Tabelle 4.14 die analytische Zusammensetzung des jeweiligen Extraktes.

Tabelle 4.13: Zusammenstellung der Codierungsnummer, des Herstellungsjahres und der verschiedenen Aufreinigungsschritte von den verwendeten Extrakten, EtAc: Ethylacetat [Matthias Fromm, Universität Hohenheim]

Nr.	Herstellungsjahr/Batch	Lösung	1.Aufreinigung	2.Aufreinigung	3.Aufreinigung
HF1	2006/A	-	-	-	-
HFA3	2006/A	wässrig pH 1,5	pH 1,5 EtAc	-	-
1	2008/B	wässrig pH 1,5	pH 1,5 EtAc	-	-
2	2008/B	30% Aceton	Säule XAD16	EtAc pH 1,5	-
3	2008/B	30% Aceton	Säule XAD16	EtAc pH 1,5	-
4	2008/B	wässrig pH 1,5	Säule XAD16	EtAc pH 7	EtAc pH 1,5
5	2008/B	wässrig pH 1,5	Säule XAD16	EtAc pH 7	EtAc pH 1,5
6	2008/B	wässrig pH 1,5	Säule XAD16	EtAc pH 1,5	-
7	2008/B	wässrig pH 1,5	n-Butanol	-	-
1a	2009/C	wässrig pH 1,5	pH 1,5 EtAc	-	-

Tabelle 4.14: Zusammensetzung der Apfelfrester-Extrakte in [mg/g]. Extrakt HFA3 wurde direkt nach der Herstellung und nach etwa zweieinhalb Jahren Lagerung analysiert, -nicht bestimmt, n.d.: nicht detektierbar [Matthias Fromm, Universität Hohenheim].

Substanz	HF1	HFA3 (2006)	HFA3 (2009)	Extrakt 1a	Extrakt 1	Extrakt 2	Extrakt 3	Extrakt 4	Extrakt 5	Extrakt 6	Extrakt 7
Protocatechusäure	-	-	1,17 ± 0,0	1,11 ± 0,12	2,33 ± 0,15	1,78	2,05	n.d.	3,58 ± 0,13	2,02 ± 0,11	0,58 ± 0,01
3-Cumaroylchinasäure	-	-	0,36 ± 0,0	0,27 ± 0,03	2,82 ± 0,16	2,59	2,77	n.d.	1,95 ± 0,02	2,63 ± 0,13	0,29 ± 0,05
Chlorogensäure	4,62 ± 0,04	11,5 ± 0,05	9,39 ± 0,14	10,04 ± 0,02	11,58 ± 0,89	9,59	10,61	n.d.	25,92 ± 0,08	13,87 ± 0,37	4,42 ± 0,62
Kaffeensäure	-	-	1,20 ± 0,02	1,39 ± 0,01	0,85 ± 0,14	0,57	0,72	n.d.	3,32 ± 0,10	1,02 ± 0,04	0,57 ± 0,02
4-Cumaroylchinasäure	-	-	2,22 ± 0,05	2,34 ± 0,0	4,71 ± 0,07	5,02	5,34	n.d.	7,97 ± 0,16	5,21 ± 0,23	1,14 ± 0,21
5-Cumaroylchinasäure	1,29 ± 0,01	3,33 ± 0,02	3,20 ± 0,06	3,04 ± 0,03	5,76 ± 0,04	5,32	6,31	n.d.	9,12 ± 0,46	6,17 ± 0,27	1,64 ± 0,32
p-Cumarsäure	1,25 ± 0,01	3,49 ± 0,00	3,11 ± 0,09	3,19 ± 0,03	4,65 ± 0,26	4,25	4,49	1,11 ± 0,01	7,78 ± 0,43	4,96 ± 0,14	1,63 ± 0,07
Ferulasäure	1,77 ± 0,00	4,86 ± 0,01	4,66 ± 0,12	4,88 ± 0,05	6,05 ± 0,38	5,57	5,78	1,34 ± 0,03	11,41 ± 1,06	6,29 ± 0,09	2,48 ± 0,08
Sinapinsäure	0,78 ± 0,00	1,92 ± 0,01	1,77 ± 0,03	1,85 ± 0,16	3,56 ± 0,05	3,6	3,86	n.d.	4,48 ± 0,23	3,85 ± 0,11	0,92 ± 0,11
Quercetin-rutinosid	3,10 ± 0,11	n.b.	1,25 ± 0,01	1,73 ± 0,00	2,97 ± 0,07	3,27	3,46	n.d.	2,63 ± 0,10	3,328 ± 0,17	2,87 ± 0,02
Quercetin-galactosid	8,39 ± 0,05	17,84 ± 0,22	10,54 ± 0,29	13,98 ± 0,04	14,36 ± 1,52	12,58	9,31	12,89 ± 0,22	20,28 ± 1,66	14,99 ± 0,29	8,18 ± 0,4
Quercetin-glucosid	4,11 ± 0,00	9,86 ± 0,15	6,54 ± 0,18	9,38 ± 0,11	3,80 ± 1,02	2,07	0,96	6,07 ± 0,19	8,86 ± 0,67	3,51 ± 0,05	3,73 ± 0,11
Quercetin-rhamnosid	4,44 ± 0,04	9,50 ± 0,18	6,23 ± 0,15	6,64 ± 0,09	9,78 ± 0,61	9,28	8,06	11,98 ± 0,20	2,74 ± 0,25	10,39 ± 0,27	4,19 ± 0,19
Quercetin	8,44 ± 0,06	18,61 ± 0,39	24,25 ± 0,61	15,08 ± 0,17	12,59 ± 0,24	19,36	22,52	17,78 ± 0,29	n.d.	14,82 ± 1,12	9,56 ± 0,37
Isohamnetin-hexosid, berechnet als Glucosid	-	-	0,12 ± 0,04	3,51 ± 0,16	6,50 ± 0,28	7,38	7,55	2,32 ± 0,04	1,80 ± 0,15	7,13 ± 0,48	0,93 ± 0,02
3-OH-Phloridzin	-	-	6,73 ± 0,12	11,55 ± 0,12	7,62 ± 0,70	5,68	4,85	7,91 ± 0,19	1,55 ± 0,04	7,74 ± 0,13	4,08 ± 0,30
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	12,53 ± 0,04	16,44 ± 0,12	27,49 ± 0,67	43,57 ± 0,51	40,49 ± 1,44	34,48	28,78	16,94 ± 1,41	89,20 ± 1,42	48,47 ± 1,43	31,01 ± 1,00
Phloridzin	98,84 ± 0,26	289,66 ± 2,82	208,43 ± 2,57	216,70 ± 0,82	283,64 ± 23,74	248,93	217,51	453,4 ± 43	29,92 ± 5,72	296,75 ± 6,41	121,42 ± 4,91
Phloretin	3,01 ± 0,04	6,27 ± 0,27	33,57 ± 1,35	3,14 ± 0,22	6,63 ± 0,10	7,45	13,68	10,29 ± 1,3	n.d.	5,26 ± 0,18	3,41 ± 0,42
Summe	152,57	393,3	352,3	353,4	430,7	388,8	358,6	542,0	225,7	458,4	203,0

4.3.1 Bildung von Wasserstoffperoxid unter Zellkulturbedingungen

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Polyphenole mit noch unbekanntem Bestandteilen des Zellkulturmediums H_2O_2 generieren. Dieses, im Zellkulturmedium erzeugte H_2O_2 kann dabei zu artifiziellen Ergebnissen führen, bzw. einen schnelleren Zerfall von weiteren aktiven Bestandteilen der polyphenolhaltigen Extrakte bewirken [Fridrich et al., 2007 a; Kern et al., 2007]. So konnten Fridrich et al. [2007 a] an HT29 Zellen zeigen, dass es in hohen Konzentrationen von Apfelsaftextrakten ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$) zu einem Wiederanstieg des Phosphorylierungsstatus des EGFR kam, der durch H_2O_2 bedingte Inhibierung der intrazellulären Phosphatasen zu erklären wäre [DeYulia und Cárcamo, 2005]. Bei gleichzeitiger Inkubation mit 100 U/ml Katalase war dieser Wiederanstieg nicht mehr zu beobachten. Katalase verhindert eine Akkumulation von H_2O_2 im Zellkulturmedium, durch enzymatisch katalysierte Disproportionierung von H_2O_2 in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) [Bausenwein et al., 2009; Lapidot et al., 2002]. Es erfolgt aber keine Modulation des intrazellulären Redoxstatus durch den Zusatz von Katalase, da diese nicht aufgenommen und folglich nur extrazellulär gebildetes H_2O_2 unterdrückt wird. Daher erfolgten alle Zellinkubationen mit Polyphenolen im Rahmen dieser Arbeit in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Bisher wurde nur nach Inkubation mit Apfelsaftextrakten die H_2O_2 -Konzentrationen im Medium gemessen [Fridrich et al., 2007 a; Dissertation Diana Fridrich]. Deshalb erfolgte die Messung für die Apfeltresterextrakte exemplarisch mit dem Extrakt 4. Dabei wurden die Inkubationsbedingungen so gewählt, dass sie der Zellbehandlung der Western Blot Analyse (45 min, serumfreie Inkubation; 3h serumhaltige Inkubation) bzw. des Comet Assays, des DCF-Assays und der Gesamtglutathionbestimmung (24 h, serumhaltige Inkubation) entsprachen.

Die Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration unter Zellkulturbedingungen erfolgte mittels „Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit“. In Gegenwart von Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) reagiert das Amplex Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin) mit H_2O_2 zu dem rot fluoreszierenden Oxidationsprodukt Resorufin, dessen Fluoreszenzemission von 585 nm gemessen werden kann.

Ein Anstieg der H_2O_2 -Konzentration gegenüber der Kontrolle war nur bei der 45 min Inkubation zu beobachten (siehe Abb. 4.22). Die mitgeführte Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) lag mit knapp $0,4 \mu\text{M}$ ebenso im Bereich der publizierten Lösungsmittelkontrolle, wie die leichte Abnahme der H_2O_2 -Konzentration im Konzentrationsbereich von $0,1$ bis $10 \mu\text{g/ml}$ [Fridrich et al., 2007 a]. Der Anstieg der

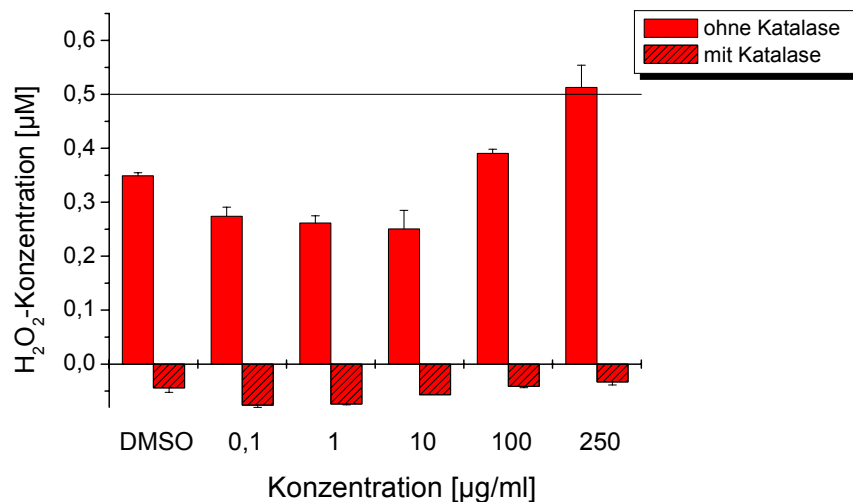


Abb. 4.22: H₂O₂-Akkumulation durch Extrakt 4 im Zellkulturmedium (DMEM, 4500 mg/l Glukose) nach 45 min serumfreier Substanzinkubation mit und ohne Katalase (100 U/ml) durch Extrakt 4; „Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit“ (Invitrogen). MW ± SD von n=2 in einer Doppelbestimmung.

H₂O₂-Konzentration ab 100 µg/ml verlief aber weniger potent, als beim Apfelsaftextrakt. In einer Konzentration von 250 µg/ml entwickelte der Tresterextrakt mit etwa 0,5 µM H₂O₂ nur knapp 50 % des Apfelsaftextraktes (1,1 µM). Durch den Zusatz von 100 U/ml Katalase wurde das H₂O₂ vollständig disproportioniert und es konnte kein H₂O₂ mehr im Zellkulturmedium detektiert werden. Nach längeren serumhaltigen Inkubationszeiten (3h, 24h) wurde kein H₂O₂ über dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle akkumuliert (Daten nicht gezeigt).

Der Apfeltresterextrakt 4 zeigte im Vergleich zu den untersuchten Apfelsaftextrakten (AE02, AE05) eine substanziell niedrigere Neigung zur Generierung von H₂O₂ mit Bestandteilen des Zellkulturmediums. Auch im Vergleich zu einem „Extrakt eines Maischeerzeugnisses“, der aus einer enzymatischen Tresterverflüssigung stammte, zeigte der Extrakt 4 eine schwächere H₂O₂ Generierung [Fridrich et al., 2007 a]. Durch die Erzeugung der Tresterextrakte scheinen für die H₂O₂-Akkumulation relevante Inhaltsstoffe zerstört oder entfernt zu werden, die bei der Herstellung der Apfelsaftextrakte erhalten bleiben.

Trotz der geringen H₂O₂-Akkumulation wurde auf einen Einsatz von Katalase nicht verzichtet, da laut Literatur bereits geringe H₂O₂-Konzentrationen zelluläre Effekte verursachen können [Fridrich et al., 2007 a; Remacle et al., 1995].

4.3.2 Modulation des endogenen Redoxstatus

Beim Dichlorofluorescein-Assay (DCF-Assay) handelt es sich um einen photometrisch kinetischen Assay, der aufgrund eines relativen Fluoreszenzanstieges durch Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorofluorescein-Diacetat, die Bestimmung des Gehalts an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle ermöglicht. Das Testsystem ist eine Screening-Methode, die eine Aussage über das Ausmaß oxidativer Zellschädigung und deren Modulation durch Antioxidantien zulässt. HT29-Zellen wurden als Monolayer in 96-well Platten ausgestreut und in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) mit den entsprechenden Apfeltresterextrakten für 3 h inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde zu Beginn der Inkubation und nach 3 h bei einer Wellenlänge von $\lambda = 530$ nm gemessen, aus der Differenz ließ sich der relative Anstieg der Fluoreszenz bestimmen. Als Positivkontrolle wurde Menadion mitgeführt, das über Redox-Cycling intrazellulär ROS generiert.

Die Untersuchung auf eine direkte Modulation des endogenen Redoxstatus in HT29 Zellen lieferte im DCF-Assay keinen Hinweis auf eine prooxidative Wirkung, die das Niveau der Lösungsmittelkontrolle (100 %) übersteigt (siehe Abb. 4.23).

Beide Extrakte unterschieden sich nur marginal in ihrer Wirkqualität und senkten den endogenen ROS-Status ab 10 $\mu\text{g/ml}$ um etwa 40 %. Die maximale Wirkqualität lag

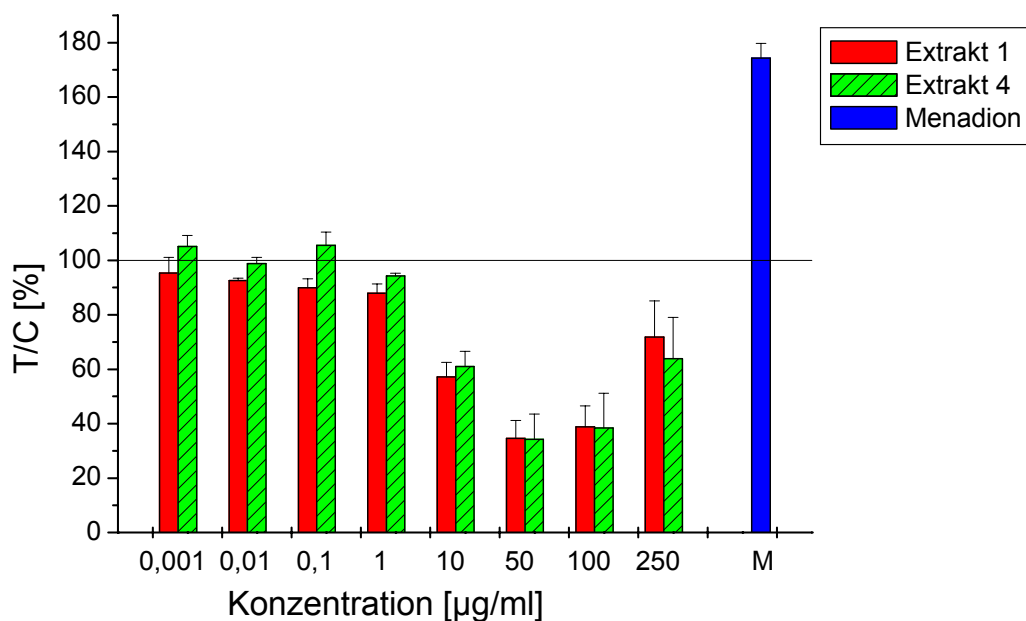


Abb. 4.23: Modulation des endogenen Redoxstatus von HT29 im Dichlorofluorescein-Assay nach 3 h Inkubation in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen; M: 20 μM Menadion.

zwischen 50 und 100 µg/ml. In diesem Konzentrationsbereich war eine Verminderung des endogenen ROS Status um 60 % zu beobachten. Da die Extrakte selbst ab einer gewissen Konzentration für die Zellen einen Stressfaktor darstellen, folgte der gemessene Effekt einem U-förmigen Kurvenverlauf, so dass der endogene ROS-Status ab 50 µg/ml wieder zunahm, aber bei der höchsten getesteten Konzentration von 250 µg/ml immer noch etwa 30 % unter dem Status un behandelter Zellen blieb. Da sich bei den untersuchten Extrakten kein Hinweis auf eine prooxidative Wirkung fand, wurden im Folgenden mit einem modifizierten Inkubationsprotokoll die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte untersucht.

4.3.3 Modulation des zellulären Menadion-induzierten ROS-Status

Hierbei erfolgte zunächst eine 24 h Vorinkubation mit den Extrakten in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Im Anschluss wurde eine halbstündige Inkubation mit dem Farbstoff Dichlorofluorescein-Diacetat durchgeführt, der dann die einstündige Inkubation mit Menadion (20 µM) folgte. Menadion generiert als Chinon über Redoxcycling intrazelluläre ROS. Die Fluoreszenz wurde zu Beginn der Menadioninkubation und nach einer Stunde gemessen. Aus der Differenz beider Messungen ließ sich der Fluoreszenzanstieg, verursacht durch die Oxidation des Dichlorofluorescein-Diacetat in Dichlorofluorescein, bestimmen. Die Auswertung erfolgte als relative Fluoreszenzintensität in Prozent, bezogen auf die mit Menadion behandelten Zellen. Zunächst galt es die Frage zu klären, wie sich die Polarität des Extraktionsmittels zur Extrakterstellung die antioxidative Wirkqualität des Extraktes beeinflussen kann. Dazu wurden von der Universität Hohenheim zwei analoge Extrakte mit unterschiedlichen Lösungsmitteln generiert. Die Extraktion erfolgte jeweils aus einer angesäuerten Wasserphase mit Ethylacetat (Extrakt 1), bzw. mit n-Butanol (Extrakt 7). Wie in Abb. 4.24 ersichtlich ist, besitzt der Extrakt 7 eine deutlich geringere antioxidative Kapazität, im Vergleich zum Extrakt 1. Dieser bewirkte bereits ab 0,1 ng/ml eine Abnahme der ROS vermittelten Fluoreszenz, wohingegen der Butanol-Extrakt erst in Konzentrationen von ≥ 100 mg/ml eine antioxidative Wirkung zeigte.

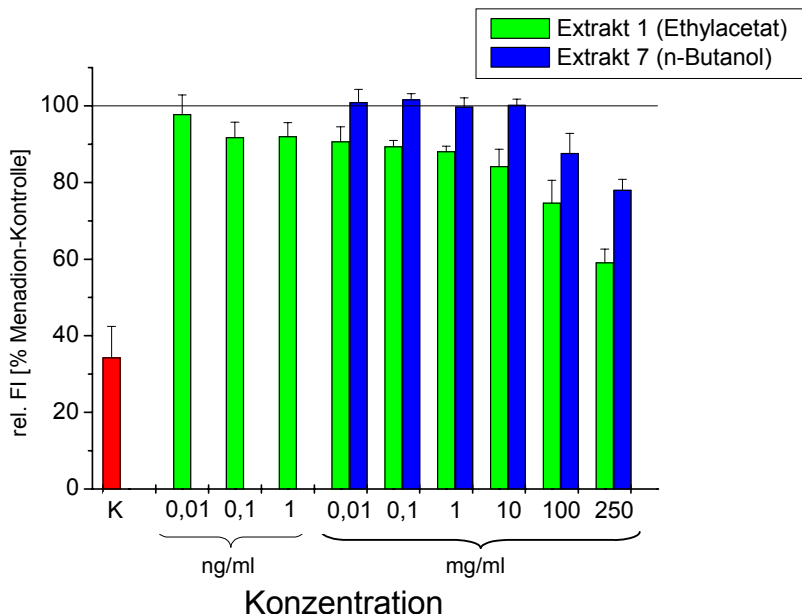


Abb. 4.24: Untersuchung von Extrakt 1 und 7 auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 μ M Menadion. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. K: 1 % DMSO; FI: Fluoreszenzintensität.

Nach analogem Inkubationsprotokoll erfolgte auch die Untersuchung zum antioxidativem Potential der weiteren Extrakte. Diese wurden immer durch eine adsorptive Aufreinigung (XAD16-Säule) und einer nachfolgenden Ethylacetat-Extraktion hergestellt. Variiert wurden das Ausgangslösungsmittel vor der adsorptiven Aufreinigung und der pH-Wert der anschließenden Ethylacetat-Extraktion.

Bei den Extrakten 2, 3 und 6 wurde das Ausgangslösungsmittel variiert. Der Ausgangsextrakt aus der Pektinproduktion wurde entweder in 30% Aceton/Wasser (Extrakt 2, 3) oder in angesäuertem Wasser gelöst (Extrakt 6), bevor diese mit Hilfe des Adsorberharzes XAD-16 aufgereinigt wurden. Die abschließende Ethylacetat-Extraktion fand im Sauren statt. Wie in Abb. 4.25 zu erkennen ist, unterschieden sich die drei Extrakte in ihrer antioxidativen Kapazität nur marginal und besaßen auch keine potenteren antioxidativen Eigenschaften, als der Ethylacetat-Extrakt (Extrakt 1, siehe Abb. 4.24).

Somit konnten im DCF-Assay keine besseren antioxidativen Eigenschaften durch die Verwendung von 30%igem Aceton, bzw. der adsorptiven Aufreinigung erzielt werden.

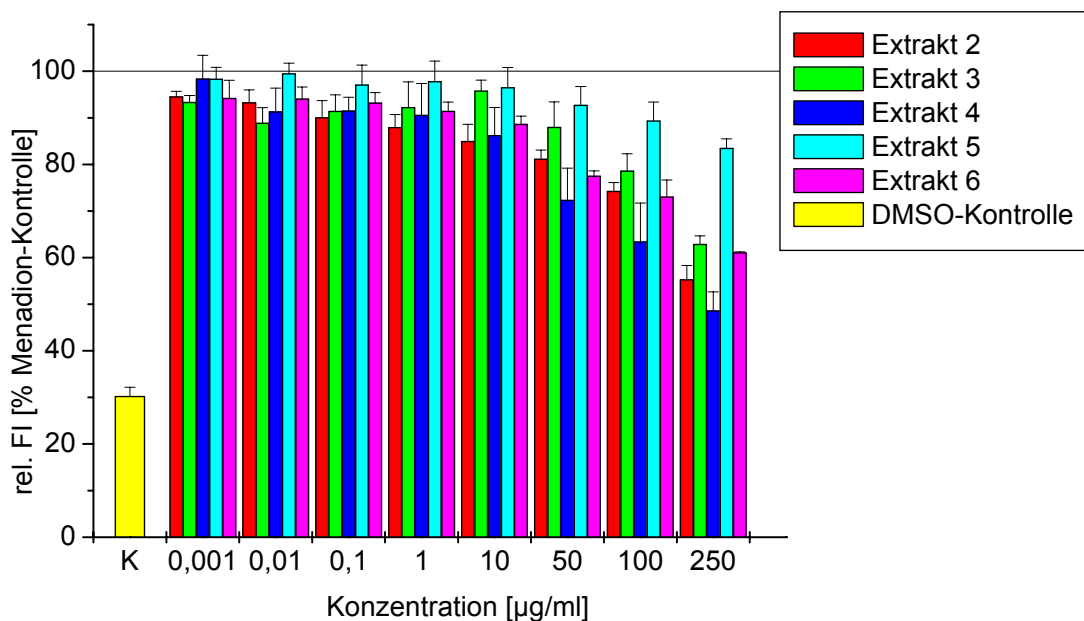


Abb. 4.25: Untersuchung von Extrakt 2, 3, 4, 5, und 6 auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. K: 1 % DMSO; FI: Fluoreszenzintensität.

Der Extrakt 4 zeigte besonders im Bereich ab 50 µg/ml die potenteste antioxidative Kapazität der getesteten Extrakte. Bei diesem Extrakt wurde der Ausgangsextrakt der Pektinproduktion wässrig gelöst und nach der adsorptiven Aufreinigung mittels einer neutralen Ethylacetat-Extraktion und anschließender saurer Ethylacetat-Extraktion in eine neutrale Komponente (Extrakt 4) und eine saure Komponente (Extrakt 5) getrennt.

Im Gegensatz zur neutralen Komponente (Extrakt 4) zeigte Extrakt 5 von allen getesteten Extrakten auf Ethylacetatbasis die geringste antioxidative Kapazität. Die Analysenergebnisse der Universität Hohenheim zeigten, dass durch die saure Nachextraktion des Extraktes 4 der Gehalt an Polyphenolen stark abnahm, was wahrscheinlich zum Verlust der antioxidativen Kapazität des Extraktes 5 beitrug (siehe Tabelle 4.14).

4.3.4 Untersuchungen zur DNA-protectiven Wirkung von Apfeltresterextrakten

Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) ermöglicht den Nachweis der DNA-strangbrechenden Wirkung von Testsubstanzen. Durch eine zusätzliche Behandlung der Probe mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (Fpg) werden zusätzlich Fpg-sensitive Stellen als Hinweis auf mögliche oxidative DNA-Schäden detektiert. Es kann aber auch durch ein entsprechend gewähltes Inkubationsprotokoll mit einer seriellen Inkubation, analog dem DCF-Assay, eine DNA-protective Wirkung von Testsubstanzen ermittelt werden. Hierbei wurde der Einfluss der Extrakte auf die DNA-schädigende Wirkung des Redoxcyclers Menadion in HT29-Zellen (Kolonkarzinomzelllinie) untersucht. Nach einer 24 h Vorinkubation mit den Extrakten in Gegenwart von 100 U/ml Katalase erfolgte eine einstündige Nachinkubation mit 20 μ M Menadion. Menadion diente ebenfalls als Positivkontrolle, auf die die Messergebnisse bezogen wurden. Jede getestete Konzentration wurde sowohl mit und ohne Fpg durchgeführt.

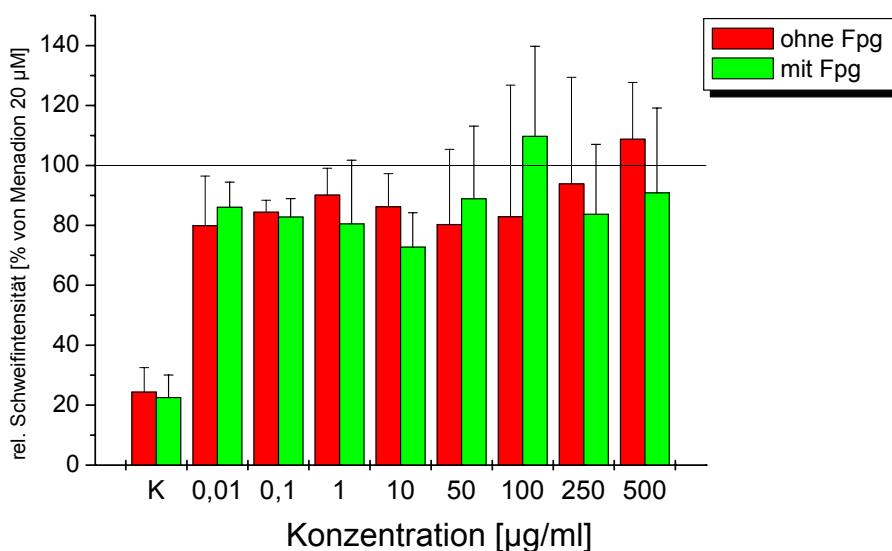


Abb. 4.26: DNA-protective Wirkung von Extrakt HF1 im Comet Assay. 24 h Inkubation von HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 μ M Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; K: 1 % DMSO.

Erste Versuche mit dem Rohextrakt HF1 zeigten dabei eine geringe Schutzwirkung in Konzentrationen $\leq 50 \mu\text{g/ml}$. In Konzentrationen $>50 \mu\text{g/ml}$ war keine ausgeprägte Schutzwirkung mehr erkennbar und es konnte sogar eine marginale Zunahme DNA-schädigender Effekte gemessen werden (siehe Abb. 4.26). Hingegen wurde durch die Ethylacetataufreinigung ein Extrakt generiert mit substantiell verbesserter Schutzwirkung gegenüber Menadion bedingten DNA-Schäden. Der Ethylacetat-Extrakt HFA3 von 2006 zeigte eine protektive Wirkung gegenüber Menadion-induzierten DNA-Schäden ab einer Extraktkonzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ (siehe Abb. 4.27). Die maximale Wirkqualität des Extraktes lag, sowohl gegenüber der DNA-strangbrechenden Wirkung von Menadion, als auch gegenüber Menadion-induzierten Fpg-sensitiven Stellen, zwischen $0,1$ und $10 \mu\text{g/ml}$. In höheren Konzentrationen schwächte sich der protektive Effekt wieder ab, blieb aber auch in der höchsten getesteten Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ immer noch unter der DNA-schädigenden Wirkung von Menadion. Dieser protektive Effekt konnte mit einem im Jahr 2008, aus einem neuen Batch (B), erzeugten Ethylacetat-Extrakt (Extrakt 1) nicht verifiziert werden. Wie in Abb. 4.28 dargestellt ist, vermindert der Extrakt 1 nicht mehr die Menadion vermittelten DNA-Schäden. Dies betrifft sowohl die DNA-strangbrechende Wirkung von Menadion, als auch die Menadion-induzierten Fpg-sensitiven Stellen.

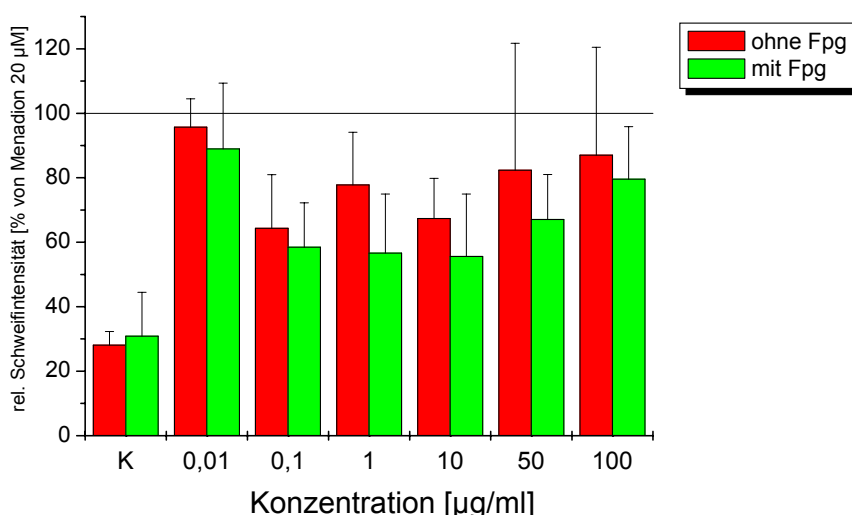


Abb. 4.27: DNA-protektive Wirkung von Extrakt HFA3 im Comet Assay (2006). 24 h Inkubation von HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit $20 \mu\text{M}$ Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; K: 1 % DMSO.

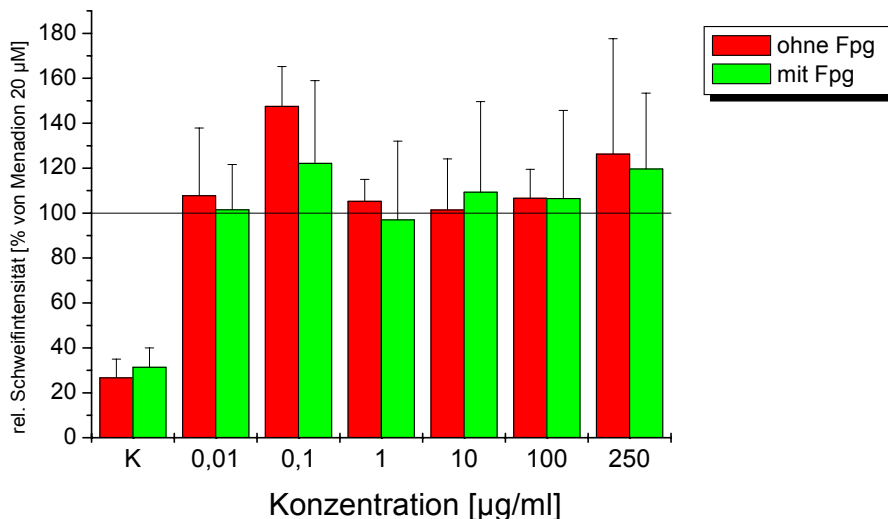


Abb. 4.28: Untersuchung von Extrakt 1 auf eine DNA-protective Wirkung im Comet Assay. 24 h Inkubation an HT29 Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; K: 1% DMSO.

Da die DNA-schädigende Wirkung des Extraktes mit anschließender Menadionbehandlung teilweise potenter war als die von Menadion alleine, könnte es möglich gewesen sein, dass der Extrakt selbst Inhaltsstoffe enthielt, die DNA-Strangbrüche generieren.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Vorversuche von 2006 erfolgte eine Wiederholung (2008) der Testreihe mit dem alten Extrakt HFA3 von 2006. Da es lagerungsbedingt zu einem Verlust an Polyphenolen kam, wurde die Konzentration 50 µg/ml weggelassen und der Konzentrationsbereich auf 250 µg/ml erweitert. Wie in Abb. 4.29 deutlich wird, besaß der alte Extrakt HFA3 noch seine protektiven Eigenschaften gegenüber den Menadion-vermittelten DNA-Schäden. Der gemessene Effekt war gegenüber den Versuchen von vor 2 Jahren jedoch etwas abgeschwächt. So lag die maximale Wirkqualität bei der Protektion vor Strangbrüchen, mit einem Bereich von 1 und 100 µg/ml, eine Zehnerpotenz höher, als noch vor 2 Jahren. Die protektiven Eigenschaften gegenüber Menadion-induzierten Fpg-sensitiven Stellen zeigten einen unerwarteten Verlauf. In den zwei niedrigsten Konzentrationen von 0,01 und 0,1 µg/ml war eine potente Protektion zu sehen, die bei 1 µg/ml annähernd verloren ging. Zwischen 1 und 250 µg/ml konnte dann in einen U-kurvenförmiger Verlauf, nochmals ein im Vergleich schwächerer protektiver Wirkungsbereich bei 10 und 100 µg/ml beobachtet werden.

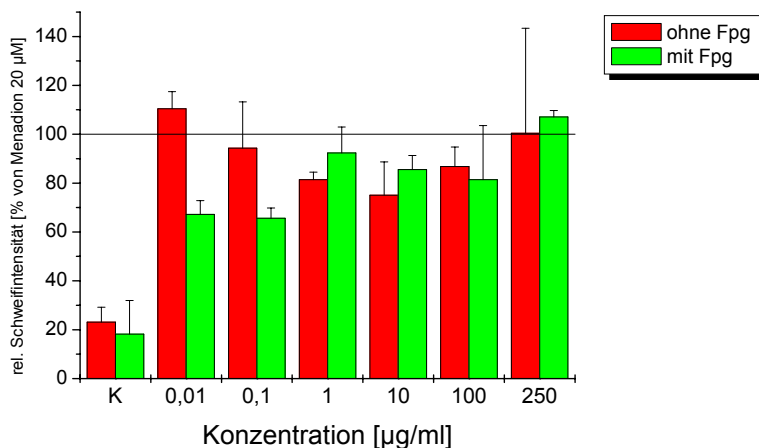


Abb. 4.29: Nachuntersuchung (2008/09) von HFA3 (2006) auf eine DNA-protektive Wirkung im Comet Assay. 24 h Inkubation an HT29 Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte +/- SD aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Diese Verschiebung der Aktivität könnte mit einem Abbau von Polyphenolen, durch die 2 Jahre Lagerung bei Raumtemperatur, begründet werden. Möglich wäre zudem die Bildung neuer Verbindungen, bzw. eine Verschiebung des Polyphenolspektrums, wie ein höherer Gehalt an Aglyka, die die unerwartete Zunahme der Protektion vor Fpg-sensitiven Stellen unterhalb 1 µg/ml begründen könnten.

Mit einem, 2009 aus einer frischen Probenpackung (Batch C), neu generierten Ethylacetat-Extrakt 1a konnte dagegen wieder eine protektive Wirkung, wie sie vom Extrakt HFA3 aus dem Jahr 2006 bekannt war, nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.30). Dieser Extrakt 1a zeigte wieder eine protektive Wirkung gegenüber Menadion-induzierten DNA-Schäden ab einer Extraktkonzentration von 0,1 µg/ml. Die maximale Wirkqualität gegenüber der DNA-strangbrechenden Wirkung von Menadion lag bei 0,1 µg/ml. Hiervon ausgehend schwächte sich der protektive Effekt wieder mit zunehmender Konzentration ab, blieb aber bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml immer noch unter der DNA-schädigenden Wirkung von Menadion.

Die protektiven Eigenschaften gegenüber Fpg-sensitiven Stellen zeigten zwischen 0,1 und 100 µg/ml einen U-kurvenförmigen Verlauf mit einer maximalen Wirkqualität zwischen 0,1 und 10 µg/ml. In der höchsten getesteten Konzentration von 100 µg/ml nahm die protektive Wirkung des untersuchten Extraktes wieder ab, blieb aber auch noch unter der DNA-schädigenden Wirkung von Menadion. Extrakt 1a zeigte damit eine annähernd vergleichbare DNA-protektive Wirkung, sowohl gegenüber der DNA-strangbrechenden Wirkung von Menadion, als auch gegenüber Menadion-induzierter Fpg-sensitiver Stellen, wie der Extrakt HFA3 im Jahr 2006.

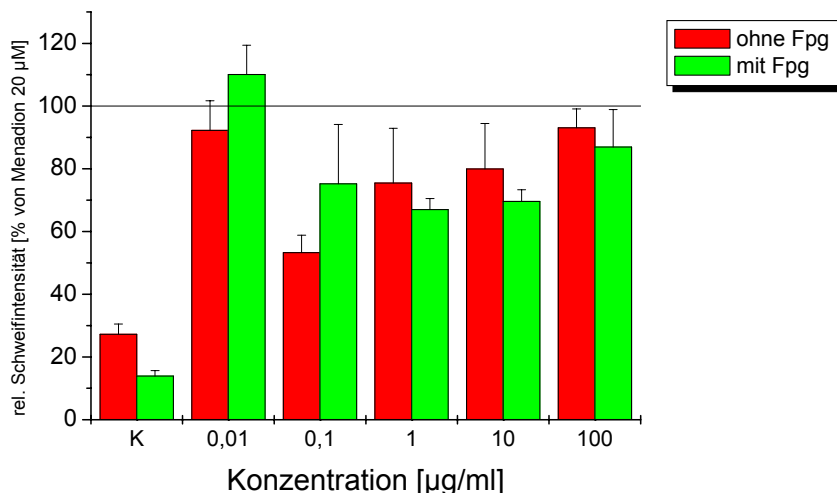


Abb. 4.30: Untersuchung von Extrakt 1a auf eine DNA-protective Wirkung im Comet Assay. 24 h Inkubation an HT29 Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte +/- SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; K: 1 % DMSO.

Des Weiteren wurden die zusätzlich adsorptiv aufgereinigten Extrakte 2 und 4 im Comet Assay getestet. Extrakt 2 zeigte insgesamt einen inhomogenen Wirkungsverlauf im getesteten Konzentrationsbereich (siehe Abb. 4.31). Dabei war weder eine ausgeprägte DNA-protective Wirkung, noch eine DNA-schädigende Wirkung in Verbindung mit Menadion erkennbar.

Im Gegensatz dazu zeigte der Extrakt 4 eine konzentrationsabhängige protective Wirkung gegenüber Menadion-vermittelter DNA-Schäden (siehe Abb. 4.32). Dieser Extrakt wurde nach einer adsorptiven Aufreinigung im Neutralen mit Ethylacetat extrahiert. Es zeigte sich ein maximaler Effekt für die Vorinkubation mit 1 µg/ml Extrakt. In Konzentrationen ≥ 10 µg/ml war die protective Wirkung aufgehoben und die Rate an DNA-Schäden nahm sogar tendenziell zu, im Vergleich zur DNA-schädigenden Wirkung von Menadion alleine. Die durch Menadion verursachten oxidativen DNA-Schäden wurden in einer 24 h Vorinkubation mit dem Extrakt 4 im Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 100 µg/ml potent vermindert. Auch im Bezug auf die oxidative DNA-Schädigung zeigte sich ein U-förmiger Kurvenverlauf mit einem potentiellen Wirkmaximum bei 1 µg/ml Extrakt 4. In der Konzentration von 250 µg/ml ist das DNA-protective Potential von Extrakt 4 vollständig aufgehoben. Die zusätzliche adsorptive Aufreinigung, sowie die neutrale Ethylacetat-Extraktion bei Extrakt 4 bewirkten eine Verbesserung des Wirkprofils, gegenüber dem Extrakt 1, obwohl beide Extrakte aus demselben Rohextrakt (Batch B) hergestellt worden waren.

Ergebnisse und Diskussion

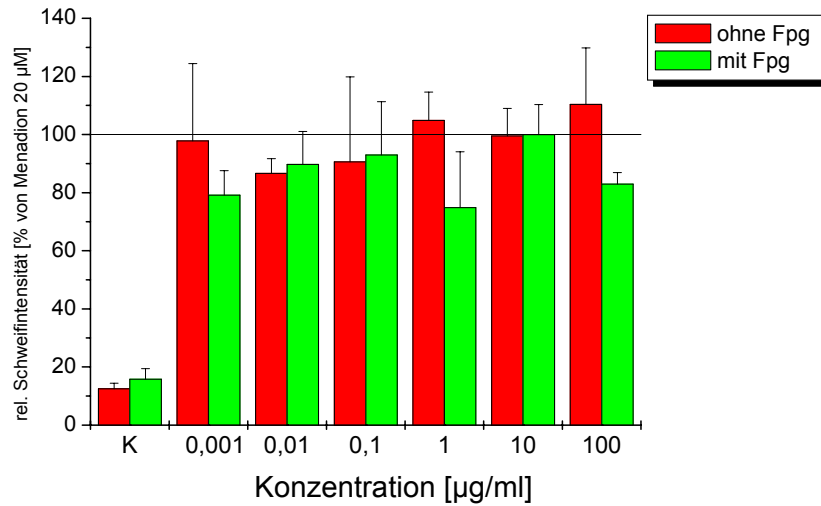


Abb. 4.31: DNA-protective Wirkung von Extrakt 2 im Comet Assay. 24 h Inkubation von HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; K: 1 % DMSO.

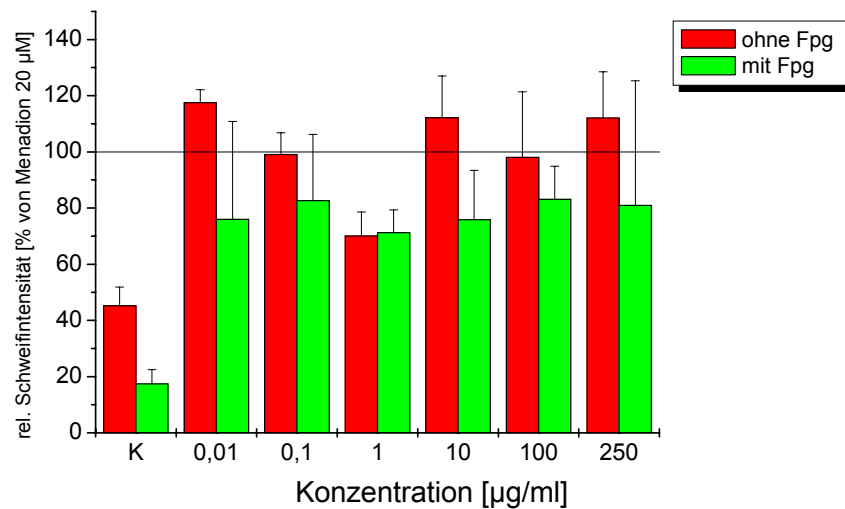


Abb. 4.32: Untersuchung von Extrakt 4 auf DNA-protective Wirkung im Comet Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen; K: 1 % DMSO.

4.3.5 DNA-schädigende Wirkung

Da die DNA-schädigende Wirkung von Menadion in Kombination mit Extrakt 1 teilweise potenter war, als die von Menadion alleine, erschien es denkbar, dass der Extrakt selbst Inhaltsstoffe enthielt, die DNA-Strangbrüche generieren. Dazu wurde Extrakt 1 und sein älteres Pendant HFA3 auf eine direkte Generierung von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen im Konzentrationsbereich von 1 bis 250 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Dies erfolgte in einer 3 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Extrakt 1 und HFA3 bewirkten bis einschließlich 100 $\mu\text{g/ml}$ nur eine marginale Zunahme an DNA-Strangbrüchen (siehe Abb. 4.33). Erst in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ kam es bei beiden Extrakten zu einer Verdopplung der DNA-Strangbruchrate, bezogen auf die mitgeführte Lösungsmittelkontrolle. Bei beiden Extrakten kam es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Fpg-sensitiven Stellen. Extrakt HFA3 verursachte ab 100 $\mu\text{g/ml}$ mehr als 5 % Schweifintensität, Extrakt 1 bewirkte erst bei 250 $\mu\text{g/ml}$ eine Schweifintensität von über 5 %.

Die konzentrationsabhängige Zunahme von DNA-Strangbrüchen, als auch von Fpg-sensitiven Stellen in Konzentrationen ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ dürfte eine mögliche Erklärung für den U-förmigen Kurvenverlauf von Extrakt HFA3 sein, aber nicht für die fehlenden antioxidativen Eigenschaften des Extraktes 1 in niedrigen Konzentrationen.

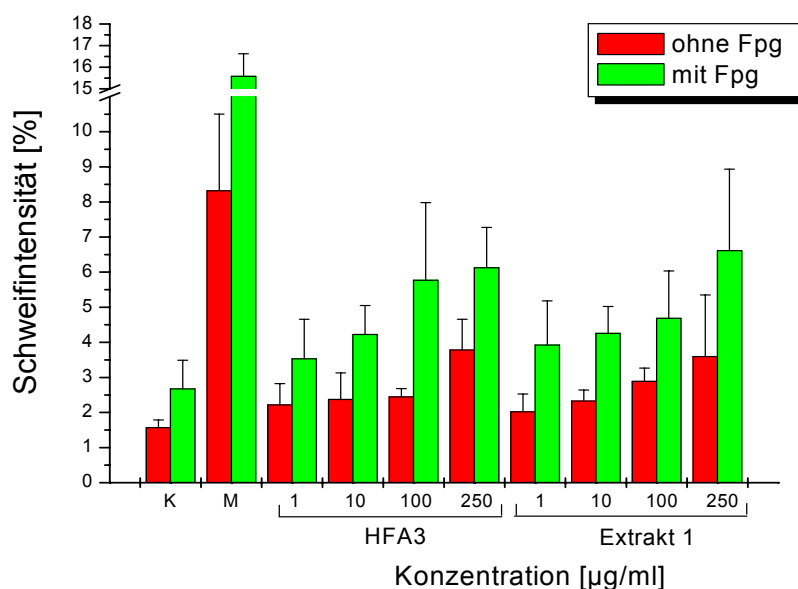


Abb. 4.33: Untersuchung von Extrakt HFA3 und 1 auf eine DNA-schädigende Wirkung im Comet Assay. 3 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. M: Menadion 20 μM ; K: 1 % DMSO

Analog wurde Extrakt 4 auf eine DNA-schädigende Wirkung hin untersucht (siehe Abb. 4.34). Bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml war keine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Strangbruchrate zu beobachten und erst in einer Konzentration von 250 µg/ml kam es zu einem Anstieg der DNA-Strangbruchrate auf ~3,5 % Schweifintensität. Bei den Fpg-sensitiven Stellen war ein konzentrationsabhängiger Anstieg zu erkennen, jedoch war die absolute Zunahme schwächer ausgeprägt, als bei den beiden zuvor getesteten Extrakten und erreichte in der höchsten getesteten Konzentration 4,3 % Schweifintensität.

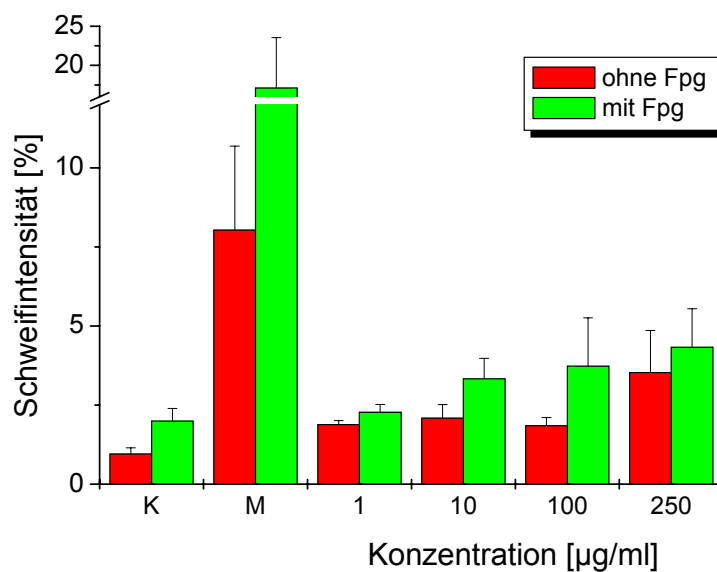


Abb. 4.34: Untersuchung von Extrakt 4 auf eine DNA-schädigende Wirkung im Comet Assay. 3 h Inkubation an HT29 Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte +/- SD aus mind. 3 unabhängigen Versuchen. M: Menadion 20 µM; K: 1 % DMSO.

Insgesamt betrachtet unterschieden sich Extrakt 1 und HFA3 nicht in ihren DNA-schädigenden Eigenschaften, Extrakt 4 zeigte in Vergleich ein marginal geringeres DNA-schädigendes Potential. Wegen der vergleichbaren Wirkung aller drei Extrakte war ein direkter Zusammenhang, zwischen den DNA-schädigenden Eigenschaften nach 3 h Inkubation und den unterschiedlichen Ergebnissen bei den Versuchen zur DNA-Protektion gegenüber Menadion-induzierten ROS nach 24 h, nicht ersichtlich.

4.3.6 Translokation von Nrf2

Ein Spektrum von Phase II detoxifizierenden oder antioxidativ-wirkenden Enzymen bildet ein zelluläres Abwehrsystem gegen oxidative bzw. elektrophile Angriffe an der DNA (Chen und Kong, 2004). Eine Reihe von Genprodukten, die in ihrer Expression durch das antioxidativ-responsive Element (ARE) reguliert werden, spielen für die Prävention genotoxischer Schäden eine wichtige Rolle. Ein Schlüsselregulator für die Transkription ARE-abhängiger Gene ist der nukleäre Transkriptionsfaktor „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor“ 2 (Nrf-2) (Lee und Surh, 2005; Kang et al., 2005; Lee und Johnson, 2004; Wasserman und Fahl, 1997). Daher könnten Substanzen, die zu einer Erhöhung des Nrf-2-Gehaltes im Zellkern führen, in der antioxidativen Wirkung der Extrakte eine wichtige Rolle übernehmen. Insbesondere, da zahlreiche Publikationen darauf hindeuten, dass Polyphenole in der Lage sind, den Nrf2-ARE-Signalweg zu aktivieren [Tanigawa et al., 2007; Na et al., 2007; Balogun et al., 2003]. Zu den ARE-abhängigen Genen zählen beispielsweise einige Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen, γ -Glutamylcysteinylase oder die Hämoxigenase-1. Auf diesem Wege kann beispielsweise der intrazelluläre Glutathionspiegel maßgeblich beeinflusst werden, was auch in weiteren Versuchen noch näher betrachtet wurde.

Die Beeinflussung des Nrf-2-Gehaltes in Zytosol und Zellkern durch Translokation wurden in HT29-Zellen mittels Western Blot Analyse bestimmt. Dazu wurden die HT29-Zellen für 3 h mit dem entsprechenden Extrakt in Gegenwart von 100 U/ml Katalase inkubiert und nach der Lyse, in eine zytosolische Fraktion sowie in eine Kernfraktion mittels Zentrifugation getrennt. Der Proteingehalt der beiden Fraktionen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und eine konstante Proteinmenge mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Nach dem Blotten wurden die Proteine durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert. Lamin B wurde als Kontrollbande für die saubere Trennung von Zytosol und Kern mitgeführt. Lamin B ist ein multifunktionales Protein, welches in der inneren Kernmembran vorliegt. Bei der Aufarbeitung der beiden Fraktionen sollte es daher hauptsächlich in der Kernfraktion vorzufinden sein, wodurch es als Kontrolle einer erfolgreichen Trennung von Kern und Zytosol herangezogen konnte. α -Tubulin wurde als Beladungskontrolle für die Proteinmenge im Gel eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Translokation von Nrf2 in den Zellkern wurden 20 μ M Menadion eingesetzt.

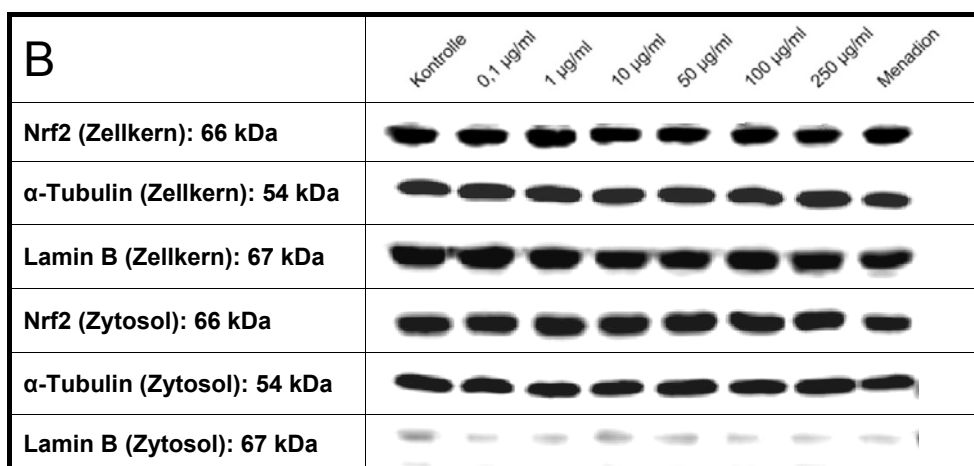
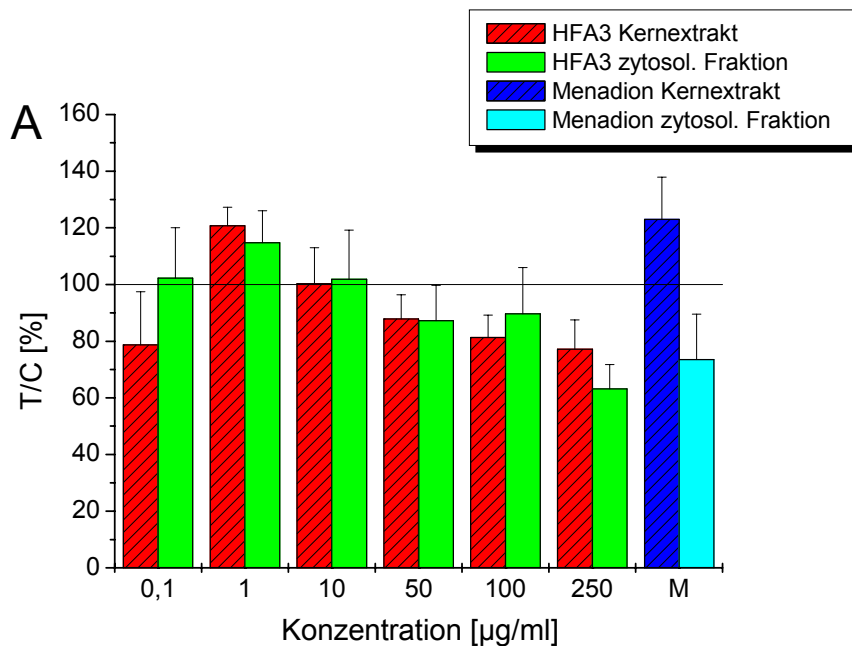


Abb. 4.35: (A) Western Blot Analyse zur Modulation des Nrf2-Gehaltes in HT29-Zellen durch HFA3 (3 h Inkubation, serumfrei, 100 U/ml Katalase). Lösungsmittel-Kontrolle: 1 % DMSO; M: Positivkontrolle, 20 µM Menadion. MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, Positivkontrolle N = 2. (B) Darstellung repräsentativer Blotmembranen. Es wurde α-Tubulin als Beladungskontrolle, sowie Lamin B als Kern-Kontrollbande mitgeführt [Diplomarbeit Elena Maser].

Menadion kann durch Redox-Cycling ROS generieren, die wiederum als Nrf2-Aktivatoren fungieren können [Egglar et al., 2008; Nguyen et al., 2003]. In der eingesetzten Konzentration von 20 µM Menadion konnte eine durch Translokation bedingte Zunahme des nukleären sowie eine Abnahme des zytosolischen Gehaltes an Nrf2 beobachtet werden (siehe Abb. 4.35).

Die Apfeltresterextrakte 1, 4 und HFA3 wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 250 µg/ml auf ihren Einfluss auf die Translokation von Nrf2 in den Zellkern untersucht.

Wie in Abb. 4.35 dargestellt, bewirkte 1 µg/ml des Extraktes HFA3 eine Erhöhung des Nrf2-Gehaltes sowohl im Zellkern als auch im Zytosol auf $120 \pm 7 \%$, bzw. $115 \pm$

11 %. Möglicherweise handelte es sich um eine erhöhte *de novo*-Synthese von Nrf2, welche mit einer Nrf2-Translokation einherging. Das in der *de novo*-Synthese gebildete Nrf2 würde demnach zu der Erhöhung des zytosolischen Nrf2-Gehaltes führen. Eine damit verbundene Nrf2-Translokation geht folglich mit einer Zunahme des nukleären Nrf2-Spiegels einher. Der Nrf2-Gehalt nahm dann mit steigender Konzentration in beiden Fraktionen wieder kontinuierlich ab. In der höchsten untersuchten HFA3-Konzentration von 250 µg/ml war der nukleäre Nrf2-Gehalt auf 79 ± 7 % vermindert. Analog sank der zytosolische Nrf2-Gehalt auf 66 ± 8 %. Dieser Effekt spricht für eine Hemmung von *de novo*-Synthese und Translokation, wodurch die Abnahme des zellulären Gesamtproteingehaltes an Nrf2 erklärt werden könnte. Wäre nur die Translokation gehemmt gewesen, dann hätte der zytosolische Nrf2-Gehalt nicht ebenfalls niedriger werden dürfen.

Extrakt 1 bewirkte in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 10 µg/ml eine konzentrationsabhängige Translokation von Nrf2 in den Zellkern (siehe Abb. 4.36), da der Nrf2-Gehalt im Kern zunahm und gleichzeitig im Zytosol abnahm. Durch die Inkubation mit 50 µg/ml Extrakt 1 wurde das Maximum der Nrf2-Translokation in den Zellkern (127 ± 13 %) erreicht, wobei aber gleichzeitig der zytosolische Nrf2-Gehalt wieder auf das Ausgangsniveau der niedrigsten getesteten Extraktkonzentration anstieg, was mit einer einsetzenden *de novo*-Synthese oder einer Verminderung der Nrf2-Ubiquitinierung erklärt werden könnte. Höhere Konzentrationen bewirkten lediglich eine leichte Reduktion des nukleären Gehaltes an Nrf2 auf knapp 120 %, während der zytosolische Gehalt konstant bei 80 % blieb. Somit induzierte der Ethylacetat Extrakt 1 gegenüber dem alten analog hergestellten Extrakt HFA3 eine deutlich potentere Translokation von Nrf2 in den Zellkern.

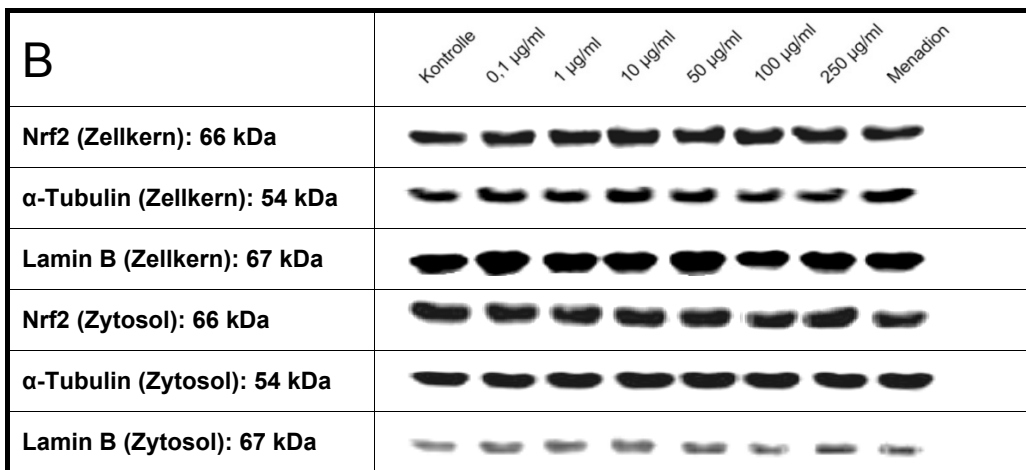
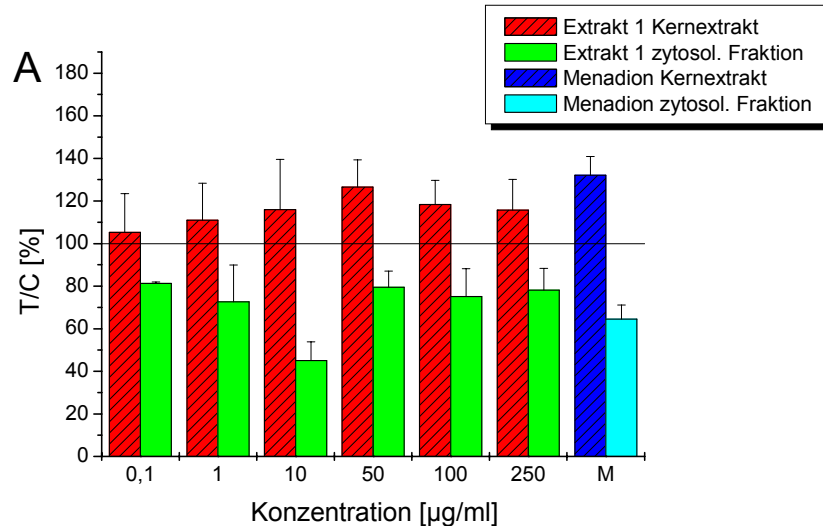


Abb. 4.36: (A) Western Blot Analyse zur Modulation des Nrf2-Gehaltes in HT29-Zellen durch Extrakt 1 (3 h Inkubation, serumfrei, 100 U/ml Katalase). Lösungsmittel-Kontrolle: 1 % DMSO; M: Positivkontrolle, 20 µM Menadion. MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, Positivkontrolle N = 2. (B) Darstellung repräsentativer Blotmembranen. Es wurde α-Tubulin als Beladungskontrolle, sowie Lamin B als Kern-Kontrollbande mitgeführt [Diplomarbeit Elena Maser].

Des Weiteren wurde noch Extrakt 4 untersucht, da er im DCF-Assay von den bisher untersuchten Apfeltrestereextrakten die potenteste antioxidative Wirkqualität aufwies und somit einen potentiellen Aktivator für die Nrf2-Translokation darstellen würde. Nach Zellinkubation mit Extrakt 4 konnte im Konzentrationsbereich von 0,1 - 50 µg/ml eine Erhöhung des Nrf2-Gehaltes der Kernfraktion beobachtet werden (siehe Abb. 4.37). Bei einer Konzentration von 50 µg/ml wurde schließlich das Maximum des Nrf2-Gehaltes im Zellkern mit 125 ± 20 % erreicht. Der Nrf2-Gehalt des Zytosols blieb mit knapp 100 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle bis 10 µg/ml relativ unverändert. Erst ab 50 µg/ml kam es zu einer Verminderung des zytosolischen Nrf2-Gehaltes auf 78 ± 3 %. Dies deutete auf eine Translokation des Nrf2-Proteins in den Zellkern hin.

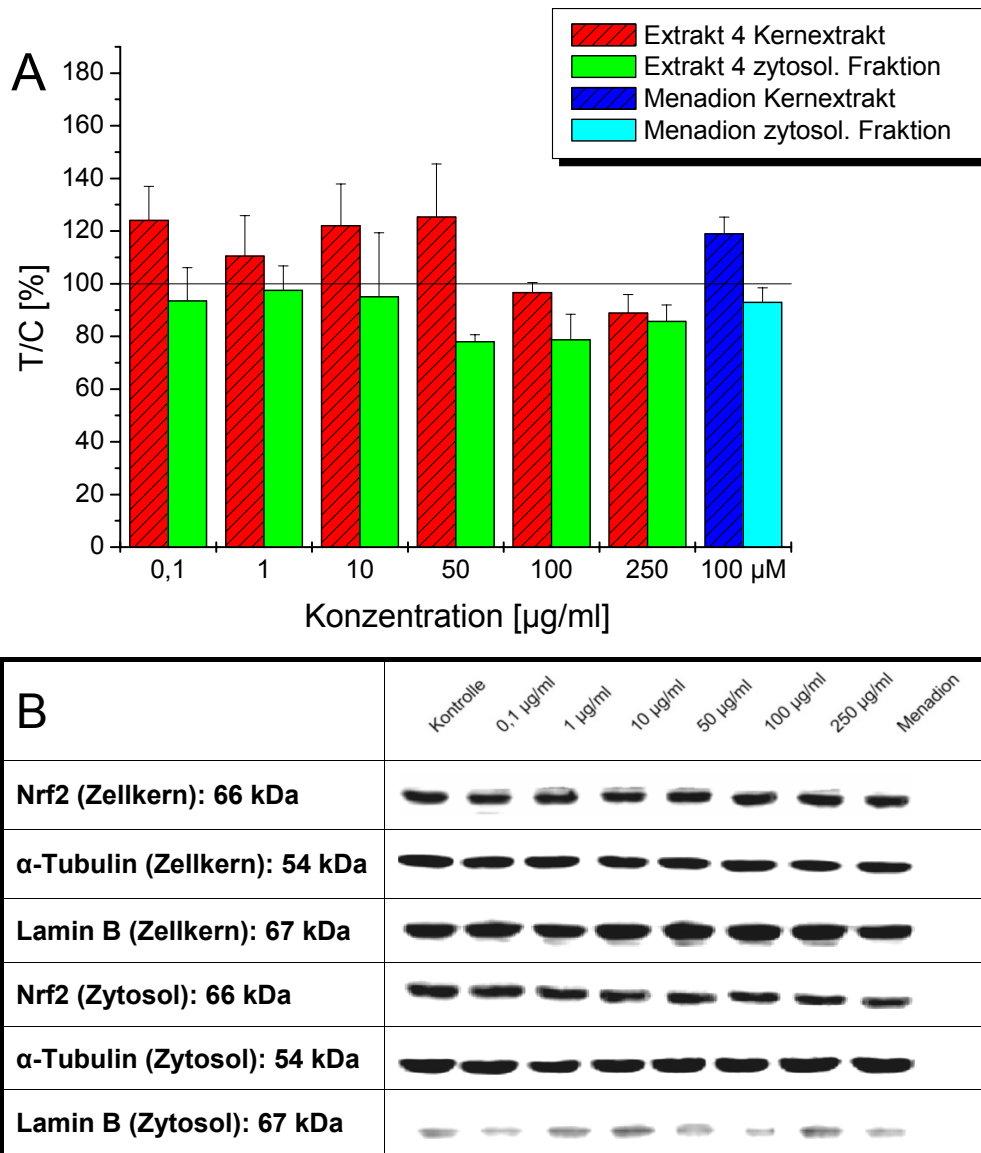


Abb. 4.37: (A) Western Blot Analyse zur Modulation des Nrf2-Gehaltes in HT29-Zellen durch Extrakt 4 (3 h Inkubation, serumfrei, 100 U/ml Katalase). Lösungsmittel-Kontrolle: 1 % DMSO; M: Positivkontrolle, 20 μM Menadion. MW \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Darstellung repräsentativer Blotmembranen. Es wurde α -Tubulin als Beladungskontrolle, sowie Lamin B als Kern-Kontrollbande mitgeführt [Diplomarbeit Elena Maser].

Ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ war eine Abnahme des nukleären Gehaltes an Nrf2 auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Der zytosolische Gehalt war weiterhin verringert, stieg aber bis zur Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ wieder marginal an, so dass zytosolischer und nukleärer Nrf2-Gehalt mit knapp 90 % auf demselben Niveau lagen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Hemmung der Nrf2-Translokation zurückzuführen.

Es zeigte sich, dass alle drei Extrakte eine Translokation von Nrf2 in den Zellkern bewirkten. Extrakt HFA3 bewirkte die schwächste Modulation der Nrf2-Translokation aller getesteten Extrakte. Da der Extrakt von allen getesteten Extrakten der älteste war und bereits beim Comet Assay gesehen werden konnte, dass die Zeit von zweieinhalb Jahren sich negativ auf die antioxidativen Eigenschaften, wie DNA-Protektion, auswirkt, wäre dies eine Erklärung für die schwache Wirkung. Zudem belegen Analysenwerte auch die Veränderung des Polyphenolprofils. Im Gegensatz dazu bewirkte Extrakt 1, das zeitlich neuere Analogon zu HFA3, über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1 - 250 µg/ml eine gesteigerte Translokation des Nrf2-Proteins in den Zellkern. Extrakt 4 induzierte lediglich in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 50 µg/ml eine erhöhte Nrf2-Translokation. In Konzentrationen ≥ 100 µg/ml waren keine Effekte zu erkennen, die auf eine Translokation schließen ließen.

4.3.7 Induktion der γ -Glutamylcysteinylgase (γ -GCL)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Apfeltresterextrakte in bestimmten Konzentrationen den Nrf2-Gehalt im Zellkern erhöhen, erfolgte zur weiteren Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften die Bestimmung der γ -GCL-Transkripte, mittels quantitativer Real Time PCR. Die γ -GCL ist für den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der *de novo*-Synthese des zellulären Antioxidans Glutathion nötig [Dickinson et al., 2004]. Die Induktion des Enzyms γ -GCL wird auf der transkriptionellen Ebene u. a. durch das Antioxidative Responsive Element (ARE) reguliert, welches sich in der Promotorregion des γ -GCL-Genes befindet. Das ARE wird seinerseits von Nrf2 aktiviert [Lu, 2009; Masella et al., 2005]. Somit sollte bei einer erhöhten Nrf2-Translokation auch eine verstärkte Transkriptionsrate der γ -GCL zu messen sein.

Als Positivkontrolle wurde 200 µM *tert.*-Butylhydrochinon (*t*BHQ) mitgeführt. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Antioxidans mit phenolähnlicher Chinonstruktur. Wie alle Chinone, kann auch *t*BHQ mittels Redox-Cycling intrazelluläre ROS generieren, die als bekannte Aktivatoren für Nrf2-Proteine und deren Translokation in den Zellkern diskutiert werden [Yu et al., 1997; Pinkus et al., 1996]. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass *t*BHQ in der Lage ist, die

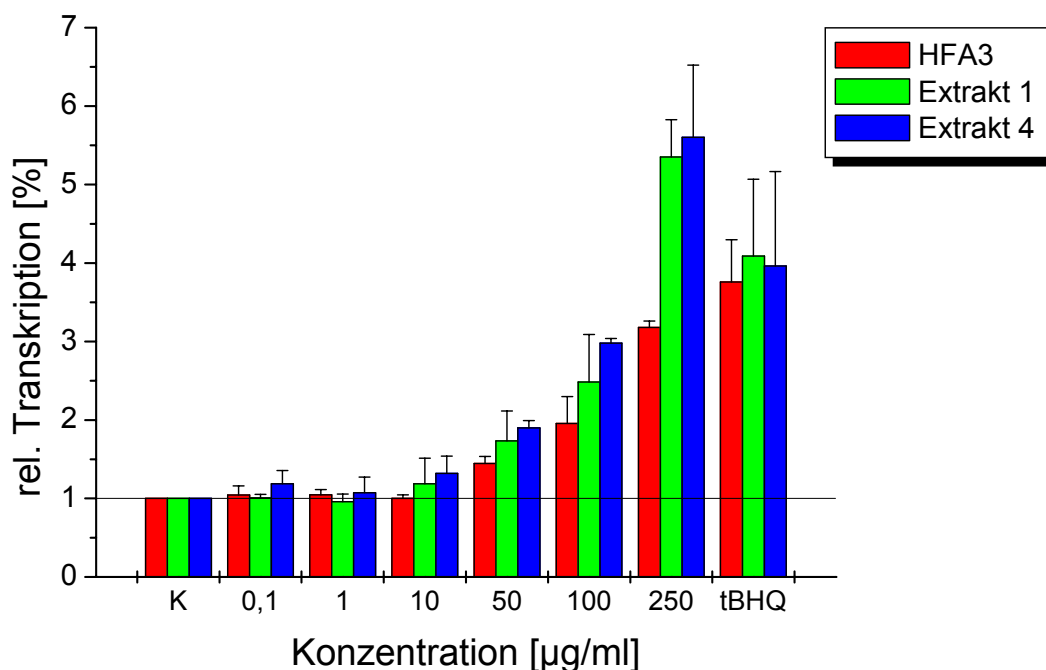


Abb. 4.38: Modulation der rel. Transkription der γ -GCL nach serumhaltiger 24 h Inkubation in HT29-Zellen mit den Apfeltresterextrakten 1, 4 und HFA3 in Gegenwart von 100 U/ml von Katalase. Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping“ Gen. MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Versuchen, K: 1% DMSO, tBHQ: *tert.*-Butylhydroperoxid [Diplomarbeit Elena Maser].

Genexpression von ARE-abhängigen Phase II-Enzymen zu aktivieren sowie in Folge davon, den Proteingehalt an γ -GCL in der Zelle zu erhöhen [Lavoie et al., 2009; Zhang und Hannink, 2003; Yu et al., 1997].

Die serumhaltige 24 h Inkubation erfolgte an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Die getesteten Extrakte (1, 4, HFA3) modulierten im Konzentrationsbereich von 0,1 - 10 μ g/ml die relative γ -GCL-Transkription im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (siehe Abb. 4.38). Ab einer Konzentration von 50 μ g/ml konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der relativen γ -GCL-Transkriptmenge beobachtet werden. Extrakt 1 und 4 unterschieden sich dabei in ihrer Wirkung nur marginal voneinander. In der höchsten eingesetzten Konzentration von 250 μ g/ml bewirkten die beiden Extrakte eine Erhöhung der relativen Transkriptmenge um den Faktor 5.

Im Vergleich zu Extrakt 1 und 4, zeigte Extrakt HFA3 einen schwächeren Einfluss auf die γ -GCL-Transkription. In der höchsten eingesetzten Konzentration von Extrakt HFA3 (250 μ g/ml) war eine Zunahme der relativen Transkriptmenge um den Faktor 3 zu beobachten.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass die drei getesteten Extrakte nach 24 h Inkubation eine konzentrationsabhängige Erhöhung der γ -GCL-Transkripte bewirkten. Es kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob das aktive γ -GCL-Protein vermehrt in der Zelle exprimiert wird, da es davon abhängt, wie die Umsetzung der Transkripte in die Proteinantwort erfolgt. Eine Western Blot Analyse könnte diesbezüglich zur Verifizierung herangezogen werden. Unter der Annahme, dass die induzierte γ -GCL-Transkription auch zu einer verstärkten Bildung der γ -GCL führt, müsste in der Zelle folglich auch ein erhöhter Glutathionspiegel zu messen sein.

4.3.8 Modulation des Gesamtglutathiongehaltes

Nachdem die substanzielle Erhöhung der γ -GCL-Transkripte durch Apfeltresterextrakte gezeigt werden konnte, sollte unter der Annahme, dass die Transkripte in eine entsprechende Proteinantwort umgesetzt wurden, der Gehalt an γ -GCL in der Zelle zunehmen.

Die Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes (tGSH) erfolgte nach der Methode von Tietze [1969]. Dabei wurde im Reaktionsansatz das gesamte GSSG mittels Glutathionreduktase, unter Anwesenheit von NADPH, zu GSH reduziert und im Anschluss daran die Summe aus reduziertem und oxidiertem Glutathion als tGSH photometrisch ($\lambda = 412 \text{ nm}$) bestimmt. Buthioninsulfoximin (BSO) wurde in einer Konzentration von 1 mM als Positivkontrolle mitgeführt. Diese Verbindung konkurriert mit L-Glutamat um die Substratbindungsstelle des Enzyms (kompetitive Hemmung) und damit eine GSH-Depletion zu induzieren [Hashimoto, 2008; Marengo, 2008; Griffith, 1982]. Laut Hall [1999], bewirkt 1 mM BSO eine intrazelluläre Reduktion des GSH-Gehaltes um etwa 90%. Dieser Wert konnte weitgehend durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit reproduziert werden.

Die Untersuchungen zur Modulation des tGSH-Gehaltes erfolgten nach 24 h Inkubation von HT29-Zellen mit Apfeltresterextrakten in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Die Extrakte 2, 4 und 6 bewirkten ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eine vergleichbare, konzentrationsabhängige Erhöhung des tGSH-Spiegels. Die Extrakte 3 und 4 bewirkten erst ab 100 $\mu\text{g/ml}$ eine Zunahme des tGSH-Gehaltes, während Extrakt 5, lediglich in der höchsten getesteten Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ einen marginalen tGSH-Anstieg bewirkte. Extrakt HFA3 bewirkte in einer Konzentration von

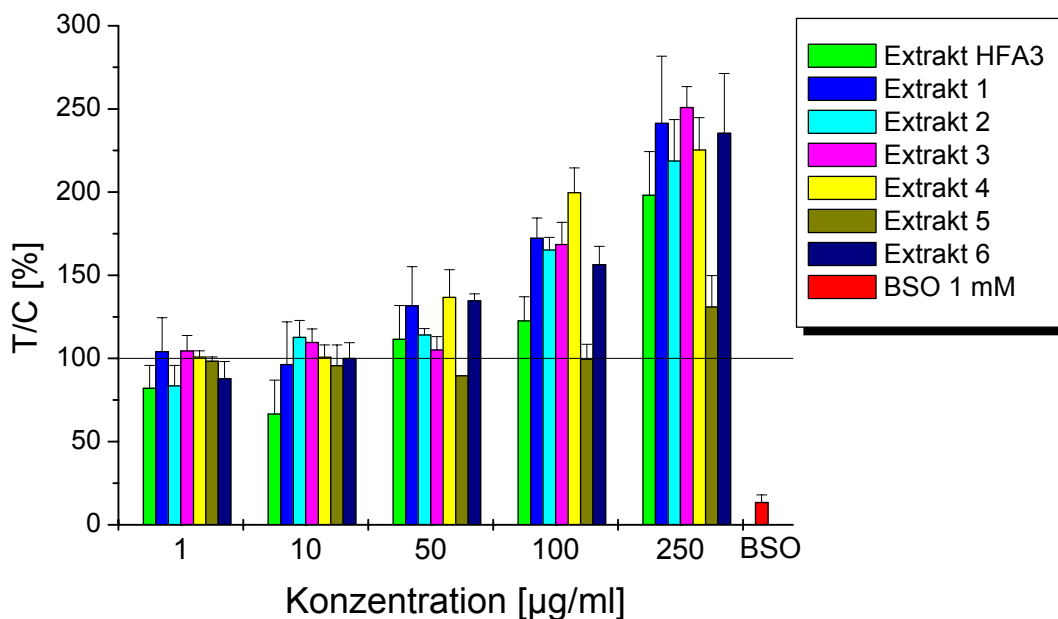


Abb. 4.39: Modulation des zellulären Gesamtglutathion-Gehaltes (tGSH) in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation, serumhaltig, 100 U/ml Katalase; MW \pm SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen [Diplomarbeit Elena Maser].

10 $\mu\text{g/ml}$ eine Depletion von etwa 30 %. Mit zunehmender Konzentration war aber auch ein Anstieg des tGSH-Gehaltes zu beobachten. Der Anstieg verlief aber schwächer, als bei den restlichen Extrakten. Dieses Ergebnis steht mit der schwächeren Induktion der γ -GCL-Transkriptmenge durch Extrakt HFA3 im Vergleich zu Extrakt 1 und 4 im Einklang. Extrakt 5 zeigte den geringsten Einfluss auf den GSH-Spiegel der Zelle. Nur in der höchsten Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ wurde ein marginaler GSH-Anstieg auf 125 % gemessen. Alle anderen Extrakte bewirkten einen Anstieg auf ≥ 200 %, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle.

Zahlreiche *in vitro* Untersuchungen haben bereits nachgewiesen, dass phenolische Substanzen in der Lage sind, über den Nrf2-ARE-Signalweg die Transkription von γ -GCL zu steigern und damit den tGSH-Spiegel zu erhöhen [Boadi et al., 2005; Moskaug et al., 2005; Carlsen et al., 2003].

Die Wirkqualität der Extrakte auf den tGSH-Status in humanen Kolonkarzinomzellen kann wie folgt zusammengefasst werden: Extrakt 1 \sim Extrakt 2 \sim Extrakt 3 \sim Extrakt 4 \sim Extrakt 6 $>$ Extrakt HFA3 \gg Extrakt 5. Über den zellulären GSH-Status konnte keine zuverlässige Aussage getroffen werden, da der GSSG-Gehalt der durchgeführten Messungen unterhalb der Nachweisgrenze lag (Daten nicht gezeigt).

4.3.9 Diskussion zur zellulären Wirkung von Apfeltresterextrakten

Im Fokus dieser Arbeit stand, neben den Arbeiten zur Aufklärung der Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR durch Apfelpolyphenole, die Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von Apfeltresterextrakten aus der Pektinproduktion. Das Besondere an diesen Extrakten war, dass im Rahmen der Pektinproduktion bereits automatisch ein polyphenolreicher Rohextrakt als Nebenprodukt anfällt und nicht erst extra ein Extrakt aus Apfelsaft oder Trestern der Apfelsaftproduktion hergestellt werden muss. Aufgrund der intensiven technologischen Bearbeitung besaß dieser Extrakt auch ein verändertes Polyphenolprofil im Vergleich zu Apfelsaftextrakten. Der Rohextrakt wurde von der Universität Hohenheim über verschiedene Verfahren weiter aufgereinigt und das Polyphenolprofil dieser verschiedenen Extrakte analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die verschiedenen Extrakte auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht werden, um einen Extrakt mit dem dazugehörigen Aufarbeitungsweg zu finden, der ein möglichst hohes antioxidatives Potential aufweist.

Die bereits erwähnten Vorversuche zu zytotoxischen und wachstumshemmenden Eigenschaften zeigten, dass keiner der untersuchten Extrakte in Konzentrationen $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ eine Zytotoxizität an der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 nach 24 h Inkubation aufwies, die einen weiteren Einsatz in den verschiedenen zellulären Testsystemen limitieren würde. Zusätzlich konnten auch Artefakte durch H_2O_2 -Bildung von Extraktinhaltsstoffen mit Bestandteilen des Zellkulturmediums ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass eine Akkumulation von entstehendem H_2O_2 durch den Zusatz von 100 U/ml Katalase wirksam unterdrückt wird.

Zunächst wurde der direkte Einfluss auf den zellulären Redoxstatus mittels DCF-Assay nach 3 h untersucht (siehe Abb. 4.23). Exemplarisch erfolgte dies mit Extrakt 1 und 4, da das Verfahren der Ethylacetat-Extraktion (Extrakt 1) auch bei allen anderen Extrakten zum Einsatz kam und Extrakt 4 den höchsten Gesamtpolyphenolgehalt aller untersuchten Extrakte besaß. Beide Extrakte zeigten einen identischen, U-kurvenförmigen Verlauf und reduzierten ab einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ den zellulären Redoxstatus mit einem Wirkoptimum bei $50 \mu\text{g/ml}$. Dieser beobachtete Kurvenverlauf deutete darauf hin, dass ab $100 \mu\text{g/ml}$ die Extrakte selbst marginale prooxidative Eigenschaften besitzen. Da die Versuche in Gegenwart

von Katalase durchgeführt wurden, konnte dieser Effekt nicht von einer artifiziellen H₂O₂-Bildung im Medium verursacht werden. Denkbar wäre die Bildung von Autoxidationsprodukten der Polyphenole. Diese Autoxidationsprodukte entstehen vermehrt unter Zellkulturbedingungen, da die Polyphenole hier unter dem höheren Sauerstoffpartialdruck schneller oxidieren können, als unter *in vivo* Bedingungen [Halliwell, 2003]. Bei dieser Autoxidation können sich vor allem chinonartige Strukturen bilden, die dann über Redoxcycling intrazellulär ROS generieren [Zhou und Sadik, 2008; Yang et al., 2004; Halliwell, 2003]. Dies wäre eine Erklärung für die ansteigende Kurve des zellulären Redoxstatus im DCF-Assay bei hohen Polyphenolkonzentrationen.

Chinoide Autoxidationsprodukte dürften wahrscheinlich auch ein Grund für die beobachteten DNA-Strangbrüche und die Entstehung Fpg-sensitiver DNA-Basen durch die Apfeltrestereextrakte unter Zellkulturbedingungen sein. Wobei vorneweg gesagt werden muss, dass das Ausmaß der DNA-Schäden bis 100 µg/ml als nicht bedenklich angesehen werden kann, da die gemessenen Schweifintensitäten unter 5 % liegen und dieser Wert auch bei einem unbehandelten, sowie visuell ungeschädigten Zellkern gemessen werden kann. Die Menge an DNA-Schäden nach 3 h Inkubation mit Extrakt 1 war vergleichbar mit der von Extrakt HFA3 induzierten DNA-Strangbruchrate. Wohingegen der stärker aufgereinigte Extrakt 4 ein marginal geringeres Potential für eine DNA-schädigende Wirkung aufwies. Da sich die beiden erstgenannten Ethylacetat-Extrakte insbesondere durch ihr Alter unterschieden, aber eine ähnliche charakteristische Zusammensetzung besaßen, wäre damit die vergleichbare Wirkung der Extrakte erklärbar. Extrakt 4 unterschied sich von den Ethylacetat-Extrakten insbesondere durch die Abwesenheit von phenolischen Säuren, alle anderen Bestandteile waren in Extrakt 4 ebenfalls mindestens äquimolar vorhanden. Hierbei stellte sich dann die Frage, ob die phenolischen Säuren eine wesentliche Rolle bei einer prooxidativen Wirkung der Extrakte spielen könnten. Untersuchungen von Galati et al. [2005] konnten eine prooxidative Wirkung von Bestandteilen des grünen Tees in Rattenhepatozyten nachweisen. Dabei zeigte u.a. die Gallussäure, allerdings in hohen Konzentrationen (3 mM), zytotoxische und prooxidative Effekte nach 3 h Inkubation.

Ein weiterer Aspekt wäre die Hemmung von humanen Topoisomerasen. Diese sind von substantieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der DNA-Topologie während der Replikation, der Transkription, der Chromosomenkondensation und der DNA-

Reparatur [Wang, 1996]. Es werden zahlreiche Polyphenole, darunter auch apfelrelevante Verbindungen als Topoisomerasehemmstoffe beschrieben [Fridrich et al., 2007 b; Habermeyer et al., 2005; Suzuki et al., 2001; Constantinou et al., 1995]. Daher wäre es denkbar, dass Extraktinhaltsstoffe, über eine Interaktion mit Topoisomerasen, die DNA-Integrität negativ beeinflussen.

Durch die zusätzliche adsorptive Säulenaufreinigung von Extrakt 4 wurden möglicherweise auch vorhandene Kontaminationen minimiert, die ein DNA-schädigendes Potential aufweisen könnten. Dies wären beispielsweise Mykotoxine oder thermische Zersetzungsprodukte der vorangegangenen verfahrenstechnischen Bearbeitung, wobei diese These aufgrund fehlender Analysendaten nicht weiter belegt werden konnte.

Um die antioxidative Wirkung der Extrakte zu untersuchen, wurde mit einem zweistufigen Inkubationsprotokoll die Wirkung auf den zellulären Redoxstatus gegenüber Menadion-vermittelter ROS im DCF-Assay gemessen. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Menadion-induzierten ROS durch die getesteten Apfeltresterextrakte beobachtet werden. Es zeigte sich, dass Ethylacetat als Extraktionsmittel gegenüber n-Butanol zu bevorzugen ist, da eine potentere antioxidative Wirkung im DCF-Assay zu beobachten war (siehe Abb. 4.24). Die Analysendaten unterstützten dieses Ergebnis der antioxidativen Kapazität des Extraktes 1, da mit n-Butanol-Extraktion im Vergleich zur Ethylacetat-Extraktion deutlich weniger Polyphenole, mit Ausnahme der Quercetinglykoside, in den Extrakt übergehen.

Die Extrakte auf Ethylacetatbasis verminderten konzentrationsabhängig ab 10 µg/ml potent die Menge an Menadion-induzierten ROS, wobei der durch neutrale Nachextraktion hergestellte Extrakt 4 die potenteste Wirkung aller getesteten Extrakte in einer Konzentration ≥ 50 µg/ml aufwies (siehe Abb. 4.25). Im Vergleich dazu zeigte Extrakt 5 (saure Nachextraktion) nur eine marginale Verminderung der durch Menadion erzeugten ROS. Schäfer et al. [2006 a] testeten Phloretin, Quercetin und Chlorogensäure auf eine antioxidative Kapazität im DCF-Assay mit ebenfalls 24 h Vorinkubation und 40 min Nachinkubation mit 250 µM *tert.*-Butylhydroperoxid (tBHP) in PBS. Alle drei Verbindungen zeigten eine antioxidative Wirkung gegenüber den tBHP-induzierten ROS, mit einem Wirkoptimum von 30 µM. Die potenteste antioxidative Wirkung zeigte dabei die Chlorogensäure mit ~25 % Reduktion des zellulären Redoxstatus, gefolgt von Phloretin und Quercetin mit ~15 %, bzw. >10 %

Reduktion. Somit ist wahrscheinlich, dass die Chlorogensäure bei Extrakt 5 einen Beitrag zur Wirkung des Extraktes leistete, da bei einer Extraktkonzentration von 250 µg/ml die Chlorogensäure mit 18 µM vorlag. Für die insgesamt marginale Wirkung des Extraktes 5 dürften jedoch weitere, wesentliche Substanzen in zu niedrigen Konzentrationen vorgelegen haben, was auch durch den niedrigen Gesamtpolyphenolgehalt bestätigt wird. So war Extrakt 5 als einziger der getesteten Extrakte frei von Aglyka. Die Chlorogensäure schien bei der antioxidativen Kapazität jedoch eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da der hochpotente Extrakt 4 frei von Chlorogensäure war. Bei Extrakt 4 konnte dagegen eine Beteiligung der Aglyka Phloretin und Quercetin an der antioxidativen Kapazität angenommen werden, da sie bei einer Konzentration von 250 µg/ml mit 9,4 bzw. 13,2 µM vorlagen.

Von Schäfer et al. [2006 a] wurden auch drei verschiedene Apfelsaftextrakte und ein Apfelmalscheextrakt, auf ihr antioxidatives Wirkpotential hin getestet. Dabei zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verminderung der zellulären ROS. Die Apfelsaftextrakte sind von der Zusammensetzung nicht mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Extrakten aus der Pektinproduktion vergleichbar, da bei den Apfelsaftextrakten Chlorogensäure der dominierende Hauptinhaltsstoff ist. Im Gegensatz dazu war der Apfelmalscheextrakt von seinem Polyphenolprofil ähnlich der Zusammensetzung der Extrakte aus der Pektinproduktion und enthielt vor allem Phloridzin und Quercetinglykoside als Hauptinhaltsstoffe. Trotz des deutlich unterschiedlichen Polyphenolprofils gegenüber den Apfelsaftextrakten zeigte er eine vergleichbare antioxidative Wirkqualität [Schäfer et al., 2006 a]. Um den Beitrag der bislang identifizierten Inhaltsstoffe zum antioxidativen Potential der Apfelextrakte zu bestimmen, wurden von Schäfer et al. [2006 b] rekonstituierte Mischungen untersucht, wobei zur Vereinfachung die Summe der Phloretinglykoside als Phloridzin und die Quercetinglykoside als Rutin zugesetzt wurden und die Extrakte ansonsten noch Chlorogen- und Kaffeesäure, sowie (-)-Epicatechin enthielten. Hierbei zeigten die rekonstituierten Mischungen in der humanen Kolonadenomzelllinie Caco-2 gegenüber Menadion nur in Konzentrationen bis 10 µg/ml eine marginale antioxidative Wirkung und wirkten in höheren Konzentrationen sogar prooxidativ. In HT29-Zellen mit *t*BHP als ROS-generierende Modellsubstanz konnte eine antioxidative Schutzwirkung mit zwei rekonstituierten Extrakten erzielt werden, prooxidative Effekte waren nicht zu beobachten [Schäfer et al. 2006 b]. Messungen an HT29-Zellen zeigten bei Schäfer et al. [2005 a] keinen Einfluss der

Apfelextrakte auf den Gesamtglutathionspiegel, wohingegen für die Aglyka Phloretin und Quercetin in einer Konzentration von 10 μM eine Induktion des Gesamtglutathionspiegels (tGSH) auf $\sim 120\%$ gemessen werden konnte. Da die Apfeltresterextrakte aus der Pektinproduktion bei 250 $\mu\text{g/ml}$ einen Gehalt von $\sim 10\ \mu\text{M}$ der beiden Aglyka aufwiesen, müsste allein durch die zwei Verbindungen eine Erhöhung des zellulären tGSH-Spiegels unter dem Einfluss der Extrakte zu erwarten sein.

Messungen mit den Apfeltresterextrakten konnten diese Annahme bestätigen. Mit Ausnahme von Extrakt 5 konnte für alle anderen Apfeltresterextrakte eine potente Induktion des tGSH-Status in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.39). Dabei korrelieren die Ergebnisse zur antioxidativen Wirkung der Extrakte im DCF-Assay mit den Messungen zur Erhöhung des tGSH-Status. Folglich ist die Aktivierung zellulärer Antioxidantien, wie Glutathion, scheinbar essentiell für die antioxidative Wirkung der Extrakte. Dies wurde besonders an Extrakt 5 deutlich, der nach 24 h nur eine marginale Erhöhung des tGSH-Status in HT29-Zellen bewirkte, während alle anderen untersuchten Extrakte, die auch im DCF-Assay eine annähernd gleichwertige potente Wirkung erzielten, mindestens eine Verdopplung des zellulären tGSH-Status bewirkten. Diese Annahme wird auch durch weitere Untersuchungen von Schäfer et al. [2006 a] bestätigt, da eine Verkürzung der Vorinkubationszeit mit den Apfelsaftextrakten von 24h auf 2h mit einem Verlust der antioxidativen Effekte im DCF-Assay einhergingen. Daher konnte geschlussfolgert werden, dass die antioxidativen Eigenschaften nicht mit dem direkten Vorliegen der polyphenolischen Extraktinhaltsstoffe verknüpft sind, sondern mit der Aktivierung von zellulären Abwehrmechanismen.

Die Erhöhung des zellulären tGSH-Status durch Polyphenole in verschiedensten Zelllinien war bereits mehrfach beschrieben worden. So konnte Bellion et al. [2008] nach 24 h Inkubation in Caco2-Zellen einen geringen Anstieg des tGSH-Status durch Apfelextrakte nachweisen. Untersuchungen von Scharf et al. [2003] konnten belegen, dass Quercetin eine konzentrationsabhängige Zunahme der γ -GCL-Aktivität und damit verbundene Erhöhung des tGSH-Levels nach 12 h und 24 h Inkubation in HepG2-Zellen bewirkt.

Schäfer untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation [2007] die Apfelextrakt-Bestandteile Quercetin, Phloretin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Phloridzin. Die Untersuchung ergab, dass Chlorogensäure und Phloridzin nach 24 h Inkubation in

HT29-Zellen keinen Einfluss auf den tGSH-Level aufwiesen. Unter gleichen Bedingungen zeigte Kaffeesäure in höheren Konzentrationen sogar eine schwach GSH-depletierende Wirkung. Nach Inkubation mit Quercetin oder Phloretin wurde in höheren Konzentrationen (100 μM) eine potente Induktion des tGSH-Status nachgewiesen. Eine Erhöhung des GSH-Status durch Quercetin, aber nicht für (-)-Epicatechin konnten bereits Rodgers und Grant [1998] in MCF-7-Zellen (Brust) nachweisen. Da diese Polyphenole einen wesentlichen Anteil aller getesteten Extrakte darstellten, wurden sie als mögliche Aktivatoren des zellulären GSH-Gehaltes diskutiert. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bisher nicht charakterisierte Verbindungen oder additive/synergistische Effekte durch das Zusammenwirken mehrerer Inhaltsstoffe in diesem Zusammenhang auch noch eine wichtige Rolle spielen könnten.

Der Einfluss von Polyphenolen auf den Glutathionspiegel konnte nicht nur in Zellkulturversuchen nachgewiesen werden, sondern auch in humanen Interventionsstudien. So zeigte eine neunwöchige Interventionsstudie, in der die protektive Wirkung eines flavonoid/anthocyanreichen Mehrfruchtsaftes an 18 Probanden getestet wurde, dass während der Intervention der tGSH-Level und der GSH-Status im Vollblut signifikant erhöht waren [Weisel et al., 2006].

Für eine Erhöhung des Glutathionspiegels bedarf es einer höheren Syntheserate durch die Enzyme γ -GCL und GSH-Synthetase [Nelson und Cox, 2001]. Daher wurden exemplarisch die Extrakte 1, 4 und HFA3 mittels Real-Time PCR auf eine mögliche Modulation der Gentranskription der γ -GCL untersucht (siehe Abb. 4.38).

Dabei zeigte sich, dass die drei untersuchten Extrakte nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen eine potente konzentrationsabhängige Erhöhung der γ -GCL-Transkripte bewirken, wobei die gemessenen Effekte im selben Konzentrationsbereich liegen, wie bei der beobachteten Erhöhung des zellulären tGSH-Spiegels. Der ältere Extrakt HFA3 bewirkte im Vergleich dazu eine schwächere Transkription der γ -GCL. Analog zu der Modulation des tGSH-Gehaltes durch Polyphenole, konnte auch deren Einfluss auf die Transkription der γ -GCL beobachtet werden.

Scharf et al. [2003] konnten an HepG2-Zellen nach 12 und 24 h Inkubation mit 10 - 50 μM Quercetin eine konzentrationsabhängige Zunahme an γ -GCL-Transkripten zeigen. Myhrstad et al. [2001] konnten an COS-1-Zellen (Niere, Primat) und HepG2-Zellen (Leber) eine Erhöhung der γ -GCL-Transkriptmenge durch eine 17 h Inkubation mit Quercetin und Zwiebelextrakten nachweisen. Diese Untersuchungen

bestätigen, dass die in den Apfeltrestereextrakten enthaltenen Polyphenole potente Aktivatoren der γ -GCL-Transkription darstellen.

Die Aktivierung der Transkription von γ -GCL kann über das antioxidativ-responsive Element (ARE) erfolgen, das auch für eine Reihe von weiteren Genprodukten verantwortlich ist, die eine wichtige Rolle bei der Prävention genotoxischer Schäden spielen. Hierzu zählen beispielsweise einige Glutathion-S-Transferasen, die NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase-1, verschiedene UDP-Glucuronosyltransferasen, oder die Hämoxxygenase-1. Ein Schlüsselregulator für die Transkription ARE-abhängiger Gene ist der nukleäre Transkriptionsfaktor Nrf-2 [Kang et al., 2005; Lee und Surh, 2005; Lee und Johnson, 2004].

Eine Reihe von Lebensmittelinhaltsstoffen wie beispielsweise Sulforaphan, Curcumin oder Kaffeesäurephenethylester wurden bereits als Aktivatoren des Nrf2/ARE-Signalweges beschrieben [Balogun et al., 2003; Dickinson et al., 2003; Kong et al., 2001].

Shen et al. [2005] konnten an Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J Mäusen) mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat die erhöhte Transkription von Phase II-Enzymen, wie der γ -GCL zeigen. In Nrf2-„knock out“-Mäusen (C57BL/6J/Nrf2 $-/-$ Mäusen) konnte hingegen keine Veränderung der ARE-vermittelten Gentranskription nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass Nrf2 für die Regulation dieser Gene eine wichtige Rolle spielt und die Aktivierung über den Nrf2-Signalweg verlaufen kann.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Translokation von Nrf2 zeigten, im Gegensatz zu den Versuchen der γ -GCL und zum tGSH-Gehalt, sehr unterschiedliche Ergebnisse. Einzig Extrakt 4 bewirkte nach 3h eine konzentrationsabhängige Translokation von Nrf2 in den Zellkern (siehe Abb. 4.37). Die Extrakte 1 und HFA3 bewirkten hingegen in höheren Konzentrationen (≥ 50 $\mu\text{g/ml}$) sogar eine Abnahme des Nrf2-Gehaltes im Zellkern (siehe Abb. 4.35 und 4.36). Daher konnte zumindest bei diesen zwei Extrakten eine Beteiligung von Nrf2 an der Induktion des Glutathionstatus in höheren Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Es könnte aber auch das Zeitfenster der Messungen des Nrf2-Gehaltes nicht optimal gewählt sein. Da Nrf2 als Abwehrsystem gegen oxidativen Stress gilt, sollte die Aktivierung, bzw. die Translokation zeitnah zum auslösenden Ereignis erfolgen, bevor die Zelle größeren Schaden durch eine chemische Noxe nimmt. Somit wäre es

möglich, dass bereits nach einer kürzeren Inkubationsdauer eine potentere Translokation in den Zellkern messbar wäre und nach 3 h das Nrf2-Protein durch zunehmende Bindung an das ARE sich der Messung wieder entzieht [Chen und Shaikh, 2009]. Im Arbeitskreis konnte mit dem Mykotoxin Alternariol nach einer Inkubation von 1 h eine stärkere Translokation von Nrf2 als nach 3 h gemessen werden. Allerdings finden sich für die Translokation von Nrf2 in der Literatur keine Hinweise für Polyphenole, die auf Inkubationszeiten ≤ 3 h hinweisen. So konnte Tanigawa et al. [2007] zeigen, dass durch Behandlung von HepG2-Zellen (Leber) mit 20 μM Quercetin nach 6 h Inkubation der Gehalt an Nrf2 signifikant im Zellkern erhöht war. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die maximale Nrf2 Freisetzung aus dem Komplex mit Keap1 durch Quercetin konzentrations- und zeitabhängig nach 6 h und 40 μM stattfindet. Mittels Nrf2-Antikörper konnte zudem gezeigt werden, dass Nrf2 einen stabilen ARE-Bindungskomplex eingeht und damit die Bildung antioxidativ wirkender Enzyme initiiert. Die Aktivierung detoxifizierender Gene konnte von Kluth et al. [2007] mit 25 μM Quercetin und 4 h Inkubation bestätigt werden.

In der eingesetzten Extraktkonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ lagen die Quercetin Konzentrationen von HFA3 bei 18 μM und somit im Konzentrationsbereich, der bereits als Nrf2 aktivierend beschrieben wird [Tanigawa et al., 2007]. Jedoch zeigte HFA3 mit der höchsten Konzentration an Quercetin den schwächsten Effekt, sodass wahrscheinlich bisher nicht charakterisierte Verbindungen oder unbekannte Effekte durch das Zusammenwirken mehrerer Inhaltsstoffe den schwer zu erklärenden Effekt der konzentrationsabhängigen Abnahme der Nrf2-Translokation bewirken.

Ein weiterer Extraktinhaltsstoff, der als aktivierend auf den Nrf2/ARE-Signalweg beschrieben wird, ist die Chlorogensäure. So konnte von Feng et al. [2005] unter Verwendung von epidermalen JB6-Mauszellen mittels Western Blot Analyse eine konzentrationsabhängige Erhöhung des Nrf2-Gehaltes im Zellkern nach 3 h Inkubation bis zu einer Konzentration von 40 μM Chlorogensäure nachgewiesen werden. Mittels Western Blot Analyse konnte Böttler im Rahmen ihrer Dissertation Chlorogensäure ebenfalls als potenten Aktivator von Nrf2 identifizieren, der nach 3 h Inkubation von HT29-Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,01 μM , mit einem Wirkoptimum von 100 μM , eine konzentrationsabhängige Erhöhung des Nrf2-Gehaltes im Zellkern bewirkte.

Da Extrakt 4 jedoch frei von Chlorogensäure ist, konnte eine Beteiligung an der beobachteten Aktivierung von Nrf2 jedoch ausgeschlossen werden. Denkbar wäre, dass der äußerst hohe Gehalt an Phloridzin an dem ausgeprägten Wirkungsverlauf, mitverantwortlich sein könnte, was jedoch weiterer Untersuchungen bedarf.

Bei Extrakt 1 lagen im Wirkoptimum von 50 µg/ml etwa 1,6 µM Chlorogensäure im Medium vor. Laut Böttler bewirkt 1 µM Chlorogensäure, unter fast identischen Bedingungen, eine Erhöhung des Nrf2-Gehaltes im Zellkern um 50 % über die Lösungsmittelkontrolle. Somit müsste der Extrakt 1 bereits nur durch die enthaltene Chlorogensäure eine Steigerung der Translokation um 50 % bewirken, gemessen wurden jedoch nur 20 %. Folglich wäre es denkbar, dass weitere Extraktinhaltsstoffe den Effekt wieder abschwächen, insbesondere da mit steigender Extraktkonzentration die Translokation stagnierte, bzw. sogar leicht rückläufig war, obwohl laut Böttler der Einfluss der Chlorogensäure hätte weiter zunehmen müssen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Apfeltresterextrakte insgesamt ein hohes antioxidatives Potential aufweisen, stellte sich die Frage, ob die Extrakte auch DNA-protektiv wirken können. Denn der Schutz der DNA-Integrität ist eine elementare Voraussetzung für ein mögliches chemopräventives Potential im Menschen. In Tierstudien konnte bereits für Apfelsaftextrakte ein solches nachgewiesen werden. So zeigten Barth et al. [2005] an männlichen F334 Ratten, die mit Dimethylhydrazin behandelt waren, einen signifikanten Rückgang der DNA-Strangbrüche in Schleimhautzellen des Kolons durch trüben Apfelsaft. Ebenso war ein Rückgang von aberranten Krypten im Kolon durch trüben Apfelsaft zu beobachten. Gossé et al. [2005] kamen mit Procyanidinen aus dem Apfel zu einem ähnlichen Ergebnis. Hierbei verringerte sich ebenfalls die Anzahl der aberranten Krypten im Kolon von männlichen Wistar Ratten, die mit Azoxymethan behandelt worden waren.

Die Untersuchungen zur Prävention Menadion-induzierter DNA-Schäden durch Apfeltresterextrakte erfolgten nach demselben Inkubationsprotokoll an HT29-Zellen, wie beim DCF Assay, mit 24 h Vorinkubation und einstündiger Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Hierbei zeigte bereits der Rohextrakt HF1 eine Tendenz zur DNA-Prävention. Dieses Potential konnte durch die Aufkonzentrierung mit einer Ethylacetatextraktion substanziell verstärkt werden. Der Extrakt HFA3 zeigte ein vergleichbares antioxidatives Potential gegenüber der Wirkung von Menadion, wie es Schäfer et al. [2006 a] für verschiedene Apfelsaftextrakte unter vergleichbaren Bedingungen an Caco-2-Zellen (Adenokarzinomzelllinie des Kolons) zeigen konnte.

Wohingegen an HT29-Zellen nur einer der drei Apfelextrakte protektiv gegenüber Menadion-vermittelter ROS wirkte und die restlichen Apfelsaftextrakte in Verbindung mit Menadion sogar prooxidativ wirkten [Dissertation Sandra Schäfer, Universität Kaiserslautern, 2006].

Eine Bewertung des Wirkanteils zur DNA-protaktiven Wirkung der im Extrakt HFA3 enthaltenen Verbindungen ist bei Quercetin und Phloretin möglich, die von Schäfer an HT29-Zellen auf eine DNA-protaktive Wirkung hin untersucht worden waren. Diese zwei Verbindungen zeigten dabei im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,3 bis 100 μM eine antioxidative Wirkung und bewirkten keine Verstärkung der schädigenden Wirkung von Menadion. Das Wirkoptimum lag bei Extrakt HFA3 zwischen 0,1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ und der Extrakt enthielt bei 10 $\mu\text{g/ml}$ 0,55 μM Quercetin und 0,23 μM Phloretin. Quercetin bewirkt laut Schäfer in dieser Konzentration eine Reduktion der Menadionwirkung um etwa 50 %, Phloretin etwa 70 % [Dissertation Sandra Schäfer]. Nach diesen Angaben müsste der Extrakt HFA3 theoretisch sogar eine noch stärkere DNA-protaktive Kapazität aufweisen. Dass der Einfluss von Phloretin und Quercetin auf die protaktive Wirkung gegenüber Menadion limitiert ist und sich mit anderen Faktoren überlagert, zeigte auch die Verifizierung der Ergebnisse von Extrakt HFA3. Obwohl der Gehalt der Aglyka Phloretin und Quercetin, aufgrund von Alterungserscheinungen stark zugenommen hatte, war die protaktive Wirkung des Extraktes schwächer geworden.

Zudem wäre es denkbar, dass andere Extraktbestandteile, die zu Autoxidation und folglich zu einem prooxidativen Effekt neigen, die potente Wirkung von Phloretin und Quercetin überlagerten. Wenn die Wirkprofile der einzelnen Extraktbestandteile einen U-kurvenförmigen Verlauf besitzen, aber die Wirkoptima in verschiedenen Konzentrationsbereichen liegen, kommt es zu Überschneidungen und aus der Summe der Einzelwirkungen setzt sich dann die Gesamtwirkung des Extraktes zusammen. Deswegen kann die potente Wirkung von Quercetin und Phloretin in den erwähnten Konzentrationen auch durch andere Extraktbestandteile wieder egalisiert werden, insbesondere wenn diese prooxidative Eigenschaften aufweisen [Halliwell, 2003]. Die Autoxidation von Extraktbestandteilen und deren Folgen für die DNA-protaktiven Eigenschaften wurden auch durch unterschiedliche Inkubationszeiten deutlich. Die Apfelsaftextrakte, die sich an HT29-Zellen nach 24 h Vorinkubation in Verbindung mit Menadion prooxidativ verhielten, zeigten nach einer auf 2 h reduzierten Vorinkubation keine bis marginale prooxidative Eigenschaften

[Dissertation Sandra Schäfer]. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass es während der 24 h Vorinkubation, je nach Extraktzusammensetzung, zu Autoxidationsprodukten kommen kann. Für Autoxidationsprodukte nach 24 h sprach auch, dass nach 3 h zwischen Extrakt 1 und HFA3 keine Unterschiede in der direkten DNA-schädigenden Wirkung der beiden Extrakte erkennbar waren, aber beide Extrakte sehr unterschiedliche Effekte nach 24 h zeigten.

Die bei Zellkultursystemen *in vitro* nicht vermeidbare Autoxidation trat wahrscheinlich auch bei Extrakt 1 auf, der identisch zum hoch effektiven Extrakt HFA3 von 2006 erzeugt wurde, jedoch im Gegensatz zu diesem, nicht in der Lage war, die DNA-schädigende Wirkung von Menadion zu vermindern. Nach erneuter Verifizierung der Ergebnisse mittels HFA3, konnte der Verlust der DNA-protektiven Wirkung mit dem Ausgangsmaterial des Extraktes 1 oder mit dem Aufreinigungsverfahren in Verbindung gebracht werden. Wahrscheinlich waren jedoch Jahrgangsunterschiede des Ausgangsmaterials dafür verantwortlich, denn die von Schäfer et al. [2006 a] untersuchten Apfelsaftextrakte aus verschiedenen Jahrgängen zeigten ebenfalls teils gravierende Unterschiede in der DNA-protektiven Wirkung gegenüber Menadion, die von protektiv bis prooxidativ reichten. Für Jahrgangsunterschiede sprach auch die Tatsache, dass mit einem neu erzeugten Ethylacetat-Extrakt (1a), der aus einem neuen Batch stammte, wieder annähernd dieselbe DNA-protektive Wirkung erzielt werden konnte, wie sie von Extrakt HFA3 bekannt war.

Interessanterweise zeigte der adsorptiv aufgereinigte und im neutralen mit Ethylacetat ausgeschüttelte Extrakt 4 eine deutlich potentere Minimierung der Menadion-induzierten DNA-Strangbrüche, als Extrakt 1, obwohl beide aus demselben Rohmaterial (Batch) erzeugt worden waren. Jedoch wiesen die beiden Extrakte starke Unterschiede hinsichtlich ihres Polyphenolmusters auf. Insbesondere der unterschiedliche Gehalt an Phloridzin und verschiedenen Phenolcarbonsäuren wäre eine mögliche Erklärung für die Wirkunterschiede zwischen den zwei Extrakten im Hinblick auf die DNA-Protektion. Somit wäre es denkbar, dass Inhaltsstoffe oder Inhaltsstoffverhältnisse zugunsten einer protektiven Gesamtwirkung des Extraktes verändert oder verschoben wurden. So zeigte Extrakt 2, der von der Zusammensetzung ähnlich dem Extrakt 1 ist, weder eine protektive, noch eine prooxidative Wirkung.

Abschließend kann gesagt werden, dass zur Steigerung der antioxidativen Kapazität von Apfeltrestereextrakten aus der Pektinproduktion, die Verwendung von Ethylacetat

als Extraktionsmittel substantiell bessere Ergebnisse liefert, als die Verwendung von n-Butanol. Die Analysendaten zum Polyphenolgehalt der Extrakte unterstützen die Ergebnisse der zellulären Effekte, da mit Ethylacetat mehr als die doppelte Menge an Polyphenolen extrahiert werden konnte, als mit n-Butanol. Durch saure Nachextraktion von Extrakt 4 wurde Extrakt 5 erstellt, der nur marginale Effekte in den verschiedenen Testsystemen zeigte. Deshalb wurde in weiteren Arbeiten innerhalb des Projektes dieser Extrakt, ebenso wie die n-Butanol-Extraktion, nicht weiter verfolgt. Die Verwendung von 30 %igem Aceton als Ausgangslösungsmittel bei Extrakt 2 und 3 lieferte weder eine Erhöhung des Polyphenolgehaltes, noch eine Steigerung der zellulären Wirkqualität im Vergleich zu den wässrig gelösten Extrakten. Es erwies sich die neutrale Ethylacetat-Extraktion des Extraktes 4 als besonders geeignet, um Extrakte mit potenter antioxidativer und DNA-protektiver Wirkung zu generieren.

Da jedoch aufgrund der komplexen Extraktzusammensetzung noch keine klaren Aussagen über relevante Einzelverbindungen gemacht werden können, ist auch nur eine eingeschränkte Aussage möglich, wie ein potenter antioxidativer und DNA-protektiver Extrakt zusammengesetzt sein sollte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auf die Phenolcarbonsäuren, die insbesondere in Extrakt 5 angereichert wurden, zukünftig verzichtet werden kann und das Polyphenolprofil von Extrakt 4 (siehe Tabelle 4.14) bisher die potenteste antioxidative Kapazität aufweist.

Zudem scheinen noch unbekannte Schwankungen des Rohmaterials, insbesondere bei der DNA-Protektion eine entscheidende Rolle zu spielen, wie durch die Versuche mit den aus drei verschiedenen Batches identisch generierten Extrakten HFA3, 1 und 1a gezeigt werden konnte. Daher sollte als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen aus dem Batch von Extrakt 1a, ein neutral extrahierter Extrakt 4a (analog zu Extrakt 4) generiert werden. Unter Zugrundelegung der beobachteten Verbesserung der DNA-Protektion von Extrakt 1 zu Extrakt 4, sollte dieser Extrakt 4a, theoretisch optimale DNA-protective Eigenschaften aufweisen. Falls diese Hypothese zutrifft, könnte mit einer Fraktionierung der Frage nach relevanten Inhaltsstoffen zielorientierter nachgegangen werden. Zusätzlich müsste der Gehalt und mittlere Oligomerisierungsgrad von Procyanidinen in den Extrakten bestimmt werden, da hierzu noch keine Angaben vorliegen und nicht auszuschließen ist, dass diese Substanzklasse einen wesentlichen Beitrag zur antioxidativen und DNA-protectiven Wirkqualität der Extrakte leistet.

5 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Beeinflussung der Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch verschiedene Apfelextrakte, aktivitätsgeleiteten Fraktionierungen apfelsaftmimetrischen rekonstituierten Mischungen, sowie identifizierten Phloretinderivaten, mit dem Ziel, relevante Inhaltsstoffe zu identifizieren, die für die bisher beobachtete potente Hemmung der Autophosphorylierung des EGFR durch komplexe Apfelsaftextrakte verantwortlich sind.

Kern et al. [2005] konnten bereits am isolierten EGFR mittels ELISA zeigen, dass einige Bestandteile, wie z.B. die Chlorogensäure oder die monomeren Bausteine der Procyanidine keine Wirkung auf die Aktivität des EGFR besitzen. Ebenfalls wichtige Vorarbeit leisteten Fridrich et al. [2007 b], indem für das Procyanidintrimer eine potente Wirkqualität für die Hemmung des zellulären EGFR nachgewiesen werden konnte.

Verschiedene sortenreine Most- und Tafelapfel-Extrakte zeigten am isolierten EGFR eine potente Hemmwirkung, obwohl Most- und Tafeläpfel sich in ihrem Polyphenolgehalt substantiell unterscheiden. Bei der Weiterführung der Versuche am zellulären EGFR mit Bohnapfel- (Mostapfel) und Topaz-Extrakten (Tafelapfel) wurde der Einfluss des Polyphenolgehaltes auf die Wirkqualität deutlich, da die Extrakte des Tafelapfels bis zur höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml nur marginale Hemmwirkungen zeigten, wohingegen die Bohnapfel-Extrakte eine potente konzentrationsabhängige Hemmung der EGFR-Aktivität bewirkten. Zudem wurde der Einfluss des Adsorberharzes und der Art des verwendeten Apfelsaftes (trüb/klar) bei der Extrakt Herstellung untersucht. So konnte durch die Verwendung von SP70-Harz, insbesondere in niederen Konzentrationen, eine potentere zelluläre Hemmwirkung des EGFR Phosphorylierungsstatus durch die Inkubation mit Bohnapfel-Extrakten erzielt werden. Ein Einfluss auf die Wirkqualität durch die Verwendung von trübem oder klarem Saft als Ausgangsmaterial für die Extraktgewinnung konnte dagegen nur bei den polyphenolarmen Tafelapfelextrakten nachgewiesen werden. Basierend auf allen Versuchen zeigte sich der ELISA als Testsystem für hoch komplexe polyphenolreiche Gemische nicht geeignet, da Unterschiede im Polyphenolprofil nicht genügend erfasst wurden. Bei Einzelverbindungen dagegen ist der ELISA aber weiterhin eine sinnvolle

Screeningmethode, bevor mit einer eventuell wirkungslosen Verbindung aufwendige Zellkulturversuche durchgeführt werden.

Die Derivate und Glykoside des Phloretins zeigten am isolierten Rezeptor fast alle eine hochpotente Hemmwirkung im unteren μM -Bereich, die wie folgt zusammengefasst werden kann: Phloretin-2'-O-xyloglucosid > 3-OH-Phloridzin > 3-OH-Phloretin > 3-OH-Phloretin-2'-O-xyloglucosid > Phloretin-2'-4'-di-(β -D-glucosid) > Phloretin >> Phloridzin. Am zellulären EGFR bewirkte von den untersuchten Verbindungen aber nur das Agykon 3-OH-Phloretin eine marginale Hemmung.

Mit Hilfe aktivitätsgeleiteter Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE06 sollte der von Fridrich et al. [2007 b] gezeigte Beitrag oligomerer Procyanidine, sowie weiterer Inhaltsstoffe, zum Hemmpotential komplexer Extrakte auf die Aktivität des EGFR tiefer untersucht werden. Die Fraktionierung zeigte dabei deutlich, dass eine messbare Hemmwirkung auf den zellulären EGFR nur von den Fraktionen ausging, die ausschließlich oligomere Procyanidine enthielten. Bestätigt wurde die Beobachtung durch die rekonstituierten Mischungen des Apfelsaftextrakt AE04, die beide (fast) alle identifizierten Einzelverbindungen enthielten, wobei nur ein rekonstituierter Extrakt oligomere Procyanidine enthielt, während der andere mit Glucose substituiert war. Dabei besaßen nur der native Extrakt und der procyanidinhaltige rekonstituierte Extrakt eine Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des zellulären EGFR.

Somit sind die meisten, in Apfelextrakten vorkommenden, bekannten Hauptkomponenten auf EGFR-hemmende Eigenschaften getestet. Dabei zeigten sich die monomeren Verbindungen entweder bereits am isolierten Rezeptor wirkungslos ((-)-Catechin, (+)-Epicatechin, Chlorogensäure, 4-Cumaroylchinasäure) oder am zellulären EGFR war keine Hemmwirkung bestimmbar (Quercetin-glykoside, Phloretinderivate) [Kern et al., 2005; Dissertation Diana Fridrich].

In wie weit Procyanidine für die Gesamtwirkung der Apfelsaftextrakte alleine verantwortlich sind oder es noch zusätzlich zu wirkungsverstärkenden Wechselwirkungen mit weiteren (noch unbekanntem) Extraktinhaltsstoffen kommt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sicher beantwortet werden. Allerdings beinhaltet die Substanzgruppe der Procyanidine auch die Gefahr als Gerbstoff proteindenaturierend zu wirken, was mit einem procyanidinreichen Speierlingextraktes gezeigt werden konnte.

Der Apfeltresterextrakt 4 war von der Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR mit den Extrakten des Apfelsaftextraktes Bohnapfels vergleichbar. Bei der Fermentation zur Simulation des Gastrointestinaltraktes kam es jedoch zu einem nahezu vollständigen Verlust der zuvor enthaltenen Polyphenole, so dass als Folge der Fermentation keine Hemmwirkung auf den zellulären EGFR mehr zu beobachten war.

Eine zweite Fragestellung galt der *in vitro* Charakterisierung des antioxidativen und DNA-protectiven Wirkprofils von Apfeltresterextrakten industriellen Ursprungs, um ein mögliches chemopräventives Potential der Extrakte abschätzen zu können. In ihrer Zusammensetzung unterscheiden sich die Apfeltresterextrakte deutlich von Apfelsaftextrakten und sind bisher noch nicht auf ihr gesundheitsförderndes Potenzial *in vitro* untersucht wurden. Hierzu wurden an der Kolonkarzinomzelllinie HT29 in einem zweistufigen Inkubationsprotokoll die Modulation der Menadion-induzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels Dichlorofluorescein (DCF)-Assay, sowie die Modulation der oxidativen DNA-Schädigung nach 24 h Vorinkubation mit Apfeltresterextrakten bestimmt.

Bis auf Extrakt 5 zeigten alle untersuchten Extrakte auf Basis einer Ethylacetat-Extraktion (1, 2, 3, 4, 6) im DCF-Assay in Konzentrationen ab 10 µg/ml eine vergleichbare Verminderung von Menadion-induzierten ROS. Diese antioxidative Wirkung im DCF-Assay korreliert dabei mit einer Erhöhung des zellulären Spiegels an Glutathion, das als zelluläres Antioxidans angesehen wird. Wahrscheinlich wird unter dem Einfluss der Polyphenole über den Transkriptionsfaktor Nrf2 auf das antioxidativ-responsive Element (ARE), eine verstärkte Transkription der γ -Glutamylcystein-Ligase (γ -GCL) bewirkt, die als Schlüsselenzym für die *de novo*-Synthese von Glutathion fungiert. Es gelang zwar auf RNA-Ebene eine erhöhte Transkriptionsrate für die γ -GCL nachzuweisen, doch eine dazu eindeutig korrelierende Translokation von Nrf2 in den Zellkern war nur teilweise messbar. Von den untersuchten Extrakten zeigte Extrakt 4, der als charakteristisches Herstellungsmerkmal mit neutraler Ethylacetat-Extraktion generiert wurde, das ausgeprägteste antioxidative Potential.

Bei der DNA-Protektion waren, in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial, deutlich unterschiedliche Wirkqualitäten zu beobachten. So zeigten Extrakt 1a und HFA3 eine DNA-protective Wirkung, während von den aus einem weiteren Batch hergestellten Extrakten 1, 2, 4 nur Extrakt 4 eine marginale DNA-Protektion bewirkte.

Möglicherweise könnten sich autoxidative Prozesse der in den Apfeltresterextrakten enthaltenen Polyphenole in hohen Konzentrationen anwendungslimitierend auswirken. So bewirkten die Extrakte nach 3 h bei der direkten Modulation des zellulären Redoxstatus einen U-kurvenförmigen Verlauf und es war im selben Zeitfenster auch eine leichte konzentrationsabhängige Zunahme von DNA-Schäden zu sehen. Es muss aber angemerkt werden, dass es sich hierbei um Zellkultur-Artefakte handeln könnte, da durch Autoxidation aus Polyphenolen in hohen Konzentrationen vermehrt chinoide Verbindungen entstehen können, die dann ihrerseits oxidativen Stress verursachen, was bereits mehrfach in Zusammenhang mit Zellkulturversuchen *in vitro* beschrieben wurde.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die in Apfelsaftextrakten enthaltenen Procyanidine in Abhängigkeit ihres Oligomerisierungsgrades Schlüsselsubstanzen für eine potente Hemmung der EGFR-Aktivität in humanen Tumorzellen *in vitro* darstellen.

Zudem konnte eine antioxidative und DNA-protective Wirkung für Apfeltrester-Extrakte *in vitro* nachgewiesen werden und über die neutrale Ethylacetat-Extraktion ein Aufreinigungsweg gefunden werden, durch den die antioxidativen und DNA-protectiven Eigenschaften des Rohextraktes substantziell verbessert werden können.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien und Geräteliste

6.1.1 Chemikalien

ABTS [®] -Tablette:	Roche
ABTS [®] -Puffer:	Roche
N-Acetylglukosamin:	Sigma Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP):	Alexis Biochemicals
Agarose (NMA, LMA):	BioRad
Agarose Wheat Germ Lectin in 1 M NaCl:	Amersham Biosciences
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	Roth
Bovine Serum Albumin Fraktion V:	Roth
Bovine Serum Albumin Standard:	Pierce
Bromphenolblau:	Sigma Aldrich
n-Butanol:	Roth
t-Butylhydrochinon:	Sigma Aldrich
CaCl ₂ :	Roth
Coomassie [®] Brilliantblau G250:	Roth
DAPI/SR101-Lösung:	Partec
1,4-Dithiothreitol (DTT):	Roth
Dimethylsulfoxid (Molekularbiologie):	Roth
Dimethylsulfoxid (technisch):	Roth
DMEM:	Invitrogen
Essigsäure:	Roth
Ethanol:	Roth
Ethidiumbromid:	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA):	Roth
Fetales Kälberserum (FKS):	Gibco
Glycerol:	Roth
Glycin:	Roth
HEPES:	Roth
Kaliumchlorid:	Roth
Katalase:	Sigma Aldrich
LumiGLO [®] :	Santa Cruz
Magnesiumchlorid-6-Hydrat :	Riedel-de Haën
Manganchlorid:	Roth
β-Mercaptoethanol:	Roth
Medium: D-MEM:	Gibco, Invitrogen
MEM:	Sigma Aldrich
Methanol:	Roth
Milchpulver:	Roth
Natriumazid:	Sigma Aldrich
Natriumchlorid:	Roth
Natriumdihydrogenphosphat:	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat:	Roth
N-Laurylsarcosin Na-Salz:	Sigma Aldrich

Nonidet® P40:	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin (P/S):	Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF):	Roth
Phosphorsäure:	Roth
PIPES (Piperazin,N,N'-bis-[2-ethansulfonsäure]):	Roth
Poly (Glu, Tyr) 4:1:	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Mix:	Roche
Rotiphorese 30 (37,5:1), Arcylamid 30 %:	Roth
Salzsäure:	Roth
Proteinleiter SeeBlue Plus2:	Invitrogen
Sulforhodamin B (SRB):	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED):	Roth
Trichloressigsäure:	Roth
Tris:	Roth
Triton®X-100	Roth
Trypanblau:	Sigma Aldrich
Trypsin:	Serva
Tween-20®:	Sigma Aldrich
Tyrphostin AG1478	Sigma Aldrich

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

Steriler Zellkulturbedarf wurde über die Firmen Greiner, Corning, Nunc und Sarstedt bezogen.

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

6.1.2 Eingesetzte Substanzen

Apfelsaftextrakte AE04, AE06	Prof. H. Dietrich [*]
Apfelsaftextrakte, sortenrein	Prof. H. Dietrich [*]
Apfeltresterextrakte	Prof. R. Carle [#]
Fraktionen aller Art	Prof. P. Schreier [§]
Phloretinderivate	Prof. P. Schreier [§]
Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	Extrasynthese
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	Extrasynthese
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	Extrasynthese
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	Extrasynthese
rekonstituierte Extrakte des AE04	Prof. P. Schreier [§]
Speierlingextrakt	Prof. H. Dietrich [*]

(^{*} Forschungsanstalt Geisenheim; [#] Universität Hohenheim, [§] Universität Würzburg)

6.1.3 Antikörper

Anti EGFR:	Santa Cruz
Anti pEGFR:	Santa Cruz
Anti- α -Tubulin:	Santa Cruz
Anti-Nrf2:	Santa Cruz
Anti-Phosphotyrosin HRP-konjugiert	Santa Cruz
Anti-mouse HRP-konjugiert:	Santa Cruz
Anti-goat HRP-konjugiert:	Santa Cruz

6.1.4 Geräte

Gerät	Name (®)	Firma
Autoklav	Systec 5075 EL	Systec
Biofreezer		New Brunswick
Brutschrank	Heracell	Heraeus
Brutschrank	CB210	Binder
Supply Consort EV231		
Elektroblotter	Perfect Blue „Semidry“	Peqlab Biotechnologie
Elektrophoresekammer	Perfect Blue	Peqlab Biotechnologie
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss
Geldokumentationsgerät	LAS 3000	Fuji Raytest
Hand-/Glashomogenisator:		Wheaton
Heizplatte	CH100	Peqlab Biotechnologie
Kühl-/Gefrierschränke:	Premium/Comfort	Liebherr
Magnetrührer/Heizplatte	IKA RH basic 2	IKA-Werke
Magnetrührer	HI 300N	Hanna Instruments
Mikroplattenleser	Victor 3V	Perkin Elmer
Mikroskop	Axiovert 40 C	Zeiss
Neubauer Zählkammer		Marienfeld
Pipettus	Pipettus Akkus	Hirschmann Laborgeräte
Power Station	Consort E835	Consort
Vortex	Vortex-Genie 2	Peqlab Biotechnologie
pH Meter	pH211/Microprocessor	Hanna Instruments
Spektralphotometer	Nanodrop	Peqlab Biotechnologie
Sterilwerkbank	Herasafe	Heraeus
Sterilwerkbank	KR-130 BW	Kojair
Stomacher Homogenisator		VWR
Thermocycler:	Thriller	Peqlab Biotechnologie
Überkopfschüttler	Roto-Shake	Peqlab Biotechnologie
Ultrazentrifuge	Centrikon t-1080	Kontron Instruments
Vakuumsaugpumpe	Laborport KNF	Neuberger
Wasserbad		Memmert
Waage (Analysenwaage)	CP 124 S	Sartorius
Waage (Grobwaage)	1574 MP8-2	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus

6.2 Zellkultur

6.2.1 Zelllinien

HT29:

Die Zellen stammen aus dem Jahr 1964 von einem primären Kolonkarzinom einer Frau, kaukasischen Typs, der als heterotransplantabel beschrieben wird und gut differenzierte Tumoren des Grades I ausbildet. Die Zellen weisen ein adhärentes Wachstum auf und wachsen sowohl als Monolayer, als auch in großen Kolonien mit epithelionale Zellen. Es handelt sich um einen menschlichen hypertriploiden Karyotyp mit 17,5 % Polyploidie. Die Verdopplungsrate liegt zwischen 40 und 60 Stunden [DSMZ].

Die Kultivierung erfolgte in „Dulbecco’s modified Eagle medium“ (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin-Streptomycin bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte. Die Lagerung erfolgt in DMEM-Kulturmedium mit 20 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C.

A431:

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie eines humanen epidermoiden Karzinoms der Vulva. Etabliert wurden sie aus einem soliden Tumor einer 85 Jahre alten Frau. Der Karyotyp ist hypotriploid mit 24 % Polyploidie. Die Zellen wachsen einschichtig in Monolayern und haben eine Verdopplungsrate von 80 bis 100 Stunden. Ein Charakteristikum dieser Zelllinie ist die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors [DSMZ].

Die Kultivierung erfolgte in „minimal essential medium“ (MEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin-Streptomycin und 4,5 g/l L-Glutamin bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte. Die Lagerung erfolgt in MEM-Kulturmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO bei -80°C.

6.2.2 Medien und Lösungen:

HT29-Medium:

DMEM
+ 10 % FKS
+ 1 % P/S

A431-Medium:

MEM
+ 10 % FKS
+ 1 % P/S
+ 4,5 g/l L-Glutamin

Desinfektionsmittel:

Ethanol/Wasser (70/30, v/v)

PBS (10x):

Natriumchlorid	1710 mM
Kaliumchlorid	34 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	15 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat	18 mM
pH 7,4	

FKS-Inaktivierung:

tiefgefrorenes FKS langsam auftauen, für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktivieren und steril aliquotieren (50 ml)

Trypsinlösung:

Trypsin	500 mg
EDTA	250 mg
PBS (10x)	100 ml

mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert prüfen (7,0-7,4), steril filtrieren und aliquotieren (5 ml)

6.2.3 Passagieren der Zellen

Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums werden die Zellen passagiert. Hierbei werden die Zellen ausgedünnt und mit frischem Nährmedium in eine neue Kulturflasche überführt. Hierzu müssen die als Monolayer wachsenden Zellen zunächst vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Alle Arbeiten mit Zellen werden zum Schutz vor Kontamination in einer Sterilbank durchgeführt.

Zunächst wird das Kulturmedium, das PBS und das Trypsin im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach Absaugen des alten Mediums werden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um Reste von FKS und tote Zellen zu entfernen. Dann werden ca. 2,5 ml Trypsin in die Kulturflasche gegeben und diese für einige Minuten (abhängig von der Zelllinie) im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen ablösen. Trypsin greift dabei die Zellwand an und bewirkt so ein Ablösen der angewachsenen Zellen. Damit die Zellen aber nicht völlig aufgelöst werden, muss das Trypsin nach dem Ablösen inaktiviert werden. Dies geschieht durch das FKS im Kulturmedium. Nach Zugabe von 10 ml FKS-haltigem Kulturmedium werden die Zellen mit der Pipette vereinzelt. Ein Teil der erhaltenen Zellsuspension wird mit frischem Medium in eine neue Kulturflasche gegeben, der Rest entweder verworfen oder, nach Bestimmung der Zellzahl für Versuche in Petrischalen ausgestreut.

6.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl ist vor allem beim Ausstreuen für Inkubationsansätze wichtig, wo eine bestimmte Zellzahl nötig ist. Dies geschieht mittels Neubauer-Zählkammer (Haemazytometer). Die Zählkammer und das Deckglas werden aus dem Ethanolbad geholt und abgetrocknet. Nach leichtem Anhauchen wird vorsichtig das Deckglas aufgesetzt, bis an den Anlageflächen Newton'sche Ringe erkennbar sind, um ein konstantes Innenvolumen zu gewährleisten. In den Kapillarraum wird nun eine entsprechende Zell-Trypanblau Suspension pipettiert (meist eine 1:10 Verdünnung). Trypanblau färbt nur tote Zellen an. Diese erscheinen bläulich unter dem Phasenkontrast-Mikroskop. Lebende erscheinen als hellgraue Kreise, da die Zellen den Farbstoff aktiv aus der Zelle transportieren können und nur durch den Phasenkontrast sichtbar werden.

Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop sind 9 große Quadrate erkennbar (siehe Abb. 6.1). Es werden die lebenden Zellen aus 4 Quadraten ausgezählt, das Ergebnis geviertelt und bei einer zuvor erfolgten Verdünnung von 1:10, mit 100.000 multipliziert. Dies ergibt die Zellzahl pro ml. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm², dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. 0,1 µl sind 1/10.000 ml. Mit der 1:10 Verdünnung vom Trypanblau-Ansatz ergibt das den Faktor von 100.000.

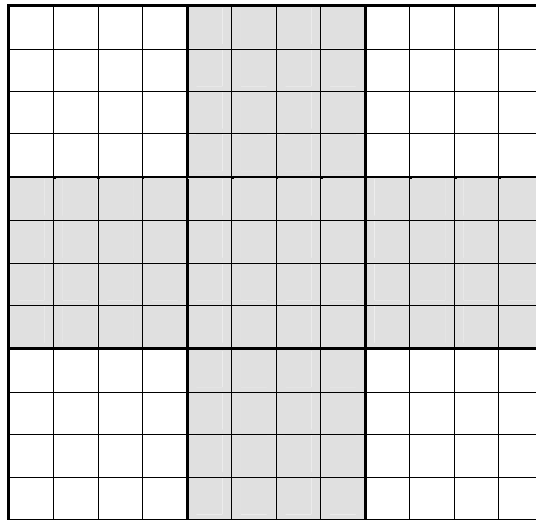


Abb. 6.1: Netzeinteilung der 9 Quadrate der Neubauer-Zählkammer

6.2.5 Einfrieren und in Kultur nehmen von Zellstocks

Die Zellen werden wie im oben beschrieben abtrypsiniert und in 10 ml serumhaltigem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend werden 1 ml Aliquote mit je 100 μ l DMSO in Kryoröhrchen hergestellt. Dabei dient das DMSO bei der Kryokonservierung von Zellen als Gefrierschutzmittel [Lindl, 2002]. Die Zellstocks werden bei -80°C im Biofreezer gelagert.

Um neue Zellen in Kultur nehmen zu können, werden die eingefrorenen Zellstocks im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden die Zellen so schnell wie möglich steril in 10 ml 20 % FKS-haltigem Zellkulturmedium überführt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 120 g zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml FKS-haltigem Kulturmedium (20 % FKS) aufgenommen. Die Zellsuspension wird in eine kleine Kulturflasche mit 25 cm^2 überführt und im Brutschrank kultiviert. In den nächsten Tagen werden die Zellen passagiert, das Medium auf 10 % FKS herabgesetzt und in eine größere Kulturflasche überführt.

6.2.6 Mycoplasmentest

Benötigte Reagenzien:

1x PBS siehe Abschnitt 6.2.2

Trypsin-Lösung siehe Abschnitt 6.2.2

DAPI/ Sulforhodamin 101-Lösung:

Tris 200 mM

NaCl 200 mM

DAPI 0,8 µM

SR101-Lösung 50 µM

in H₂O bidest. lösen und pH auf 7,6 einstellen.

Mycoplasmen gehören zu der Gruppe der Bakterien und sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Aufgrund ihrer Größe (Durchmesser von 0,1-2 µm) sind sie in der Lage die Sterilfilter der Kulturflasche zu passieren und damit die Zellkulturen zu kontaminieren. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung Mycoplasmascreening regelmäßig durchzuführen. Mit dem an die DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) kann die DNA der Mycoplasmen in infizierten Zellen angefärbt und identifiziert werden. Dazu werden wenige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension auf einem sterilen Objektträger in einer bereits mit FKS-haltigem Medium (10 % FKS) befüllten Petrischale ausgestreut und für 48 h im Brutschrank anwachsen gelassen. Anschließend wird der Objektträger mit eiskaltem Methanol gespült und mindestens für 30 Minuten in Methanol bei -20°C gelagert. Damit werden die Zellen auf dem Objektträger fixiert und nach dem Trocknen mit einigen Tropfen DAPI/ Sulforhodamin 101-Lösung versetzt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können die Objektträger bei einer Anregungswellenlänge $\lambda = 450 - 490$ nm auf Mycoplasmen untersucht werden. Die mycoplasmatische DNA erscheint als kleine, hell leuchtende blaue Punkte auf oder in den Zellen [Lindl, 2002].

6.3 Isolierung des EGFR

6.3.1 Kultivierung der Zellen

Die Gewinnung des EGFR erfolgt nach Erreichen einer Zelldichte von 80-90 % [Gastpar, 1997]. Um den EGFR aufzureinigen werden 40 Petrischalen (d=14 cm) mit je $3,6 \times 10^6$ A431-Zellen in 40 ml serumhaltigem MEM ausgestreut und im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen.

6.3.2 Isolierung des EGFR

Benötigte Reagenzien:

<u>1x PBS</u>	siehe Abschnitt 6.2.2
<u>Trypsin-Lösung</u>	siehe Abschnitt 6.2.2
<u>KMP-Puffer Stammlösung</u>	
PIPES	20 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
Kaliumchlorid	5 mM
<u>KMP-Puffer</u>	
KMP-Puffer-Stammlösung	10 ml
PMSF	0,2 mM
<u>CaCl₂ x 2 H₂O-Lösung</u>	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 M

Durchführung:

Die gesamten Aufarbeitungsschritte werden auf Eis durchgeführt.

- Medium absaugen.
- Zellen 2 x mit ca. 3 ml PBS spülen, abtrypsinieren mit 3 ml Trypsin-Lösung und für 12 Minuten im Brutschrank inkubieren.
- Inaktivierung des Trypsins mit 2 ml FKS-haltigem Medium, abschaben der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers.
- Petrischalen schräg stellen und die sich sammelnde Zelllösung in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführen.
- Zentrifugation bei 2000 g , 4°C für 8 Minuten.
- Überstand verwerfen und Zellpellet mit 6 ml 1x PBS resuspendieren.
- Zentrifugation bei 2000 g , 4°C für 8 Minuten.
- Überstand verwerfen und Zellpellet wiegen. Das Zellfeuchtgewicht sollte bei Verwendung von 40 Platten (d=14 cm) ca. 2 g betragen.
- Das Zellpellet wird in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert.
- Zum Aufbrechen der Zellmembran erfolgt 3x hintereinander eine Ultraschallbehandlung von je 10 sec auf Eis, je 20 sec zwischendrin pausieren.
- bei 150000 g, 2-4°C für 18 min ultrazentrifugieren, um die EGFR-haltige Membran von anderen Zellbestandteilen zu trennen.
- Überstand sammeln.
- Pellet in 10 ml KMP-Puffer resuspendieren und Ultraschallbehandlung zwei Mal wiederholen.
- Pellet verwerfen, Überstand mit 1M CaCl₂x2H₂O-Lösung auf eine Endkonzentration von 10 mM CaCl₂ einstellen. Innerhalb von 15 min aggregieren die intrazellulären Membranbestandteile bei Raumtemperatur, was durch eine Trübung der Lösung erkennbar wird.
- Abzentrifugieren der aggregierten Membranbestandteile bei 7000 g, 2°C für 30 min. Das Pellet wird verworfen.
- Überstand halbieren, nochmals bei 100 000 g, 2-4°C für 60 min ultrazentrifugieren
- Die abzentrifugierten Membranpellets können bei -80°C für 6-12 Monate gelagert werden.

6.3.3 Aufreinigung des EGFR

Die Aufreinigung des EGFR erfolgt mittels Weizenkeim-Lectin-Agarose-Affinitätschromatographie [Gastpar, 1997]. Hierzu werden ca. 5 ml Weizenkeim-Lectin-Agarose (gelagert in Natriumazid) in eine Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gefüllt und über Nacht mit 1 M NaCl gespült (Flussrate etwa 0,3 ml/min).

Benötigte Reagenzien:

DTT-Lösung

Dithiothreitol 10 mM

PMSF-Stammlösung

PMSF in Isopropanol 100 mM

KMP-T-Puffer

KMP-Puffer-Stammlösung 10 ml
 Triton[®]X-100 100 µl
 PMSF 0,2 mM

Säulenpuffer (pH 7,2)

HEPES 40 mM
 NaCl pH-Wert einstellen, dann erst Zugabe 500 mM
 Glycerol 10 % (v/v)
 Triton[®]X-100 0,05 % (v/v)

N-Acetylglukosamin-haltiger Säulenpuffer

N-Acetyl-D-Glukosamin 9,95 g
 Säulenpuffer 150 ml

NaCl-Lösung

NaCl 1 M

NaN₃-haltige NaCl-Lösung

NaN₃ in NaCl-Lösung 0,02 % (w/v)

Durchführung:

- Membranpellet von 20 Platten mit KMPT-Puffer resuspendieren und eine Stunde auf Eis rühren.
- Abtrennung der ungelösten Membranbestandteile durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g, 4°C für eine Stunde.
- Unterdessen 500 ml Säulenpuffer ansetzen und Säulenmaterial mit 50-100 ml Säulenpuffer spülen.
- Überstand der Zentrifugation auf die äquilibrierte Säule geben.
- 3 x das Eluat abfangen und erneut auf die Säule geben, dabei binden die Proteine an das Säulenmaterial.
- Säule mit ca. 200 ml Säulenpuffer innerhalb von 1,5-2 h gut spülen, um unspezifische Zellbestandteile zu beseitigen.
- Der EGFR eluiert mit 0,3 M N-Acetyl-D-Glukosaminhaltigem Säulenpuffer, wobei 5 Fraktionen zu je 4,5 ml abgefangen werden.
- Jede Fraktion wird mit 500 µl 10 mM DTT-Lösung versetzt, zu je 500 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.
- Säulenmaterial über Nacht mit einer 1 M NaCl-Lösung spülen und anschließend in einer 1M NaCl-Lösung mit 0,02 % Natriumazid (w/v) bei 4°C lagern.

6.3.4 Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Substrat

Lösungen:

Poly-Glutaminsäure/Tyrosin (4:1)

Poly (Glu,Try)sodium salt (4:1 Glu,Try) 1 mg/10 ml 1x PBS

Waschpuffer

1x PBS 500 ml
Tween-20® 0,1 %

Durchführung:

- 96-Loch-Immunoplatten werden pro Loch mit je 100 µl Proteintyrosinkinase (PTK)-Substrates „Poly-Glutaminsäure/Tyrosin“ (Poly Glu:Tyr 4:1) beschichtet.
- Bei 35°C im Trockenschrank über Nacht trocknen.
- Die getrockneten Platten werden 3x mit 200 µl/Loch Waschpuffer für je 5 min gewaschen, ausgeklopft und bis zur Trockne in den Trockenschrank gestellt.

Die Platten können im Dunkeln und trocken für mehrere Wochen gelagert werden.

6.3.5 Testung der einzelnen EGFR Fraktionen auf ihre PTK-Aktivität

Aus je einem Aliquot der fünf Fraktionen wird mit PBS eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dabei werden die Fraktionen im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 verdünnt. Die Durchführung entspricht der unter Kapitel 7.3 beschriebenen Methode, wobei auf eine Mehrfachbestimmung verzichtet wird.

Die Fraktionen, welche nach maximal einer Stunde bei 37°C bei $\lambda = 405$ nm eine Absorption von 0,8-1,2 aufweisen, können zur weiteren Untersuchung in entsprechenden Verdünnungen für den EGFR-ELISA eingesetzt werden.

6.4 Bestimmung der Proteintyrosinkinaseaktivität des EGFR mittels ELISA

Bei dem Enzymgekoppelten Immunosorbents Assay, kurz ELISA, handelt es sich um ein zellfreies Testsystem, in dem durch enzymatische Farbreaktion am isolierten EGFR getestet werden kann, ob eine Substanz Einfluss auf die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors nimmt.

In einer 96-Lochplatte wird das Substrat Polyglutamin-Tyrosin fixiert (siehe Abb. 6.2). Nach ATP und Rezeptorzugabe erfolgt eine Phosphorylierung des Substrates aufgrund der RTK des EGFR. Gibt man im Folgenden den Antiphosphotyrosin-Antikörper hinzu, der mit Peroxidase gekoppelt ist, so kommt es infolge der Zugabe des Peroxidasesubstrates ABTS zu einer Farbreaktion, die photometrisch detektiert werden kann. Wird diesem Testsystem eine zu untersuchende Substanz hinzugegeben, die die PTK-Aktivität des EGFR hemmt, so fällt diese Farbreaktion entsprechend schwächer aus.

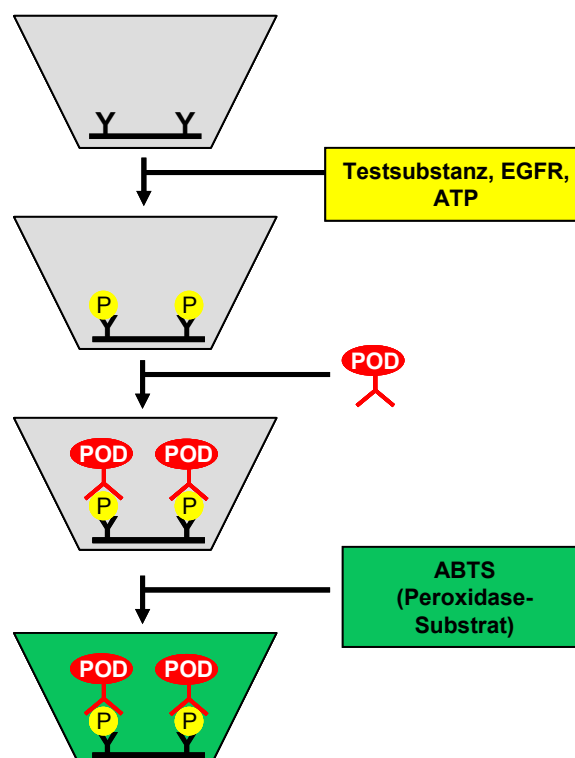


Abb. 6.2: Durchführungsprinzip des ELISA. ATP: Adenosintriphosphat; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; POD: mit Peroxidase konjugierter Antikörper; ABTS: 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure = Peroxidase Substrat; P: Phosphatgruppe.

Benötigte Reagenzien:

Waschpuffer

1 x PBS	500 ml
Tween-20 [®]	500 µl

Tyrphostin-Lösung

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

ABTS[®]-Lösung

In einem 50 ml Messkolben 1x ABTS[®]-Tablette mit 5 ml 10x ABTS[®]- Puffer versetzen, mit H₂O_{bidest.} bis zur Marke auffüllen.

Antikörperlösung

BSA	1 % (w/s) in 1x PBS
1:1000 Anti-Phosphotyrosin HRP-konjugiert (PY99, Santa Cruz)	

Assaypuffer (pH 7,2)

HEPES	50 mM
MgCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	2 mM
ATP	200 µM
Lagerung bei -20°C	

<u>1x PBS</u>	siehe Abschnitt 6.2.2
---------------	-----------------------

Durchführung:

Die Arbeitsschritte werden im abgedunkelten Raum durchgeführt, da die Reaktion lichtempfindlich ist.

- Die Randlöcher der 96-Lochplatte werden mit jeweils 100 µl bidest. Wasser befüllt, um gleiche Bedingungen bei den Inkubationen zu erhalten.
- Von der Testsubstanz werden 10 µl als 10 % DMSO-Lösungen in bidest. Wasser nach folgendem Schema in die mittleren Löcher der Platte pipettiert (siehe Abb. 6.3). Die Konzentrationen der Testsubstanz werden absteigend in einer Dreifachbestimmung aufgegeben.
- Zum Vergleich werden ein Blindwert (Lösungsmittelkontrolle) und eine sogenannte „Normalreaktion“ mitgeführt. Hierzu wird eine 10 % DMSO vorgelegt.
- Als Positivkontrolle wird Tyrphostin AG 1478 (100 µM in 10 % DMSO) verwendet.
- Anschließend wird eine EGFR-haltige Fraktion auf Eis aufgetaut und nach Bedarf mit 1x PBS verdünnt. Pro Loch werden 40 µl dieser Verdünnung hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Zum Blindwert werden 50 µl bidest. Wasser hinzugegeben. Zu den restlichen Substanzen jeweils 50 µl des Assaypuffers, der zuvor auf 37°C erwärmt wurde, um die Tyrosinkinase-reaktion zu starten.
- Die Platte wird für 30 Minuten in den 37°C warmen Trockenschrank gestellt.
- Nach Ablauf der Zeit wird der Assaypuffer von den Platten abgeschüttet und diese 3 Mal mit je 200 µl Waschpuffer und anschließendem Trockenklopfen nach jedem Waschschrift gespült.
- Im Folgenden wird ein Peroxidase gekoppelter Phosphotyrosin-Antikörper dem Testsystem zugesetzt. Hierzu wird der Antikörper in einer 1 % BSA in 1x PBS 1:1000 verdünnt und jeweils 75 µl/Loch in die Mikrotiterplatte pipettiert.
- Die Inkubation erfolgt für 1 Stunde im Trockenschrank bei 37°C.
- Anschließend wird der überschüssige Antikörper durch Ausschütten der Platten und Waschen nach obig beschriebenen Verfahren entfernt.
- Zum Start der Peroxidase vermittelten Farbreaktion werden 100 µl Peroxidasesubstrat (ABTS-Lösung) hinzugegeben und photometrisch bei 405 nm im Mikroplattenlesegerät gemessen. Die Messung sollte nach maximal 1 Stunde ABTS-Zugabe abgeschlossen sein, da sich der gebildete Farbstoff anschließend zersetzt.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt als „Test over Control“ [T/C] – Wert in Bezug auf den Mittelwert der Normalreaktion, der als 100 % gesetzt wird.

Formel für den „Test over Control“ – Wert:

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

- Es gilt:
- T/C: „Test over Control“-Wert
 - T: optische Dichte der Testsubstanz
 - C_N: optische Dichte der Normalreaktion
 - C_B: optische Dichte des Blindwerts

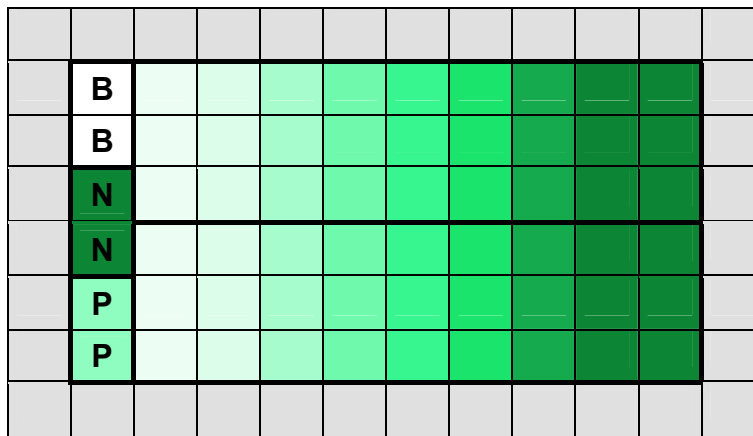


Abb. 6.3: Auftrageschema des ELISA. B: Blindwert; N: Normalreaktion; P: Positivkontrolle; grauer Rand: bidest. Wasser; Auftragung der Testsubstanz als 3-fache Bestimmung, in absteigender Konzentration.

6.5 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse werden die Proteine zunächst durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat) aufgetrennt und anschließend durch Blotten auf eine Nitrocellulosemembran elektrophoretisch transferiert. Die auf der Membran fixierten Proteine werden mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert und chemolumineszenztrisch detektiert.

6.5.1 Probenvorbereitung und Substanzinkubation (EGFR)

- In einer mittleren Petrischale (\varnothing 10 cm) werden $2,0 \cdot 10^6$ A431-Zellen in 10 ml 10%igem FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 48 h kultiviert.
- Vor der Substanzinkubation erfolgt eine 24 h Serumreduktion auf 1 % FKS.
- Die Substanzinkubation erfolgt mit Katalase (100 U/ml) in 5 ml serumfreiem Medium für 45 Minuten.
- Die zu untersuchende Substanz wird in DMSO gelöst und entsprechend zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt (Endkonzentration: 1 %).
- Die Lösungsmittelkontrolle ist somit 1 % DMSO.
- Als Positivkontrolle wird eine Endkonzentration von 10 μ M Tyrphostin AG 1478 eingesetzt.
- 15 Minuten vor Ablauf der 45 Minuten Inkubation wird der EGFR mit EGF stimuliert.

6.5.2 Gewinnung der Proteine (EGFR)

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgt auf Eis.

- Nach Ablauf der 45 Minuten Inkubationszeit werden die Petrischalen auf Eis gestellt und das Medium abgekippt.
- Anschließend werden die Zellen 2-mal mit jeweils 3 ml eisgekühltem PBS gewaschen.
- Das PBS wird daraufhin möglichst vollständig von den Petrischalen abgesaugt.
- Je 200 μ l RIPA-Puffer werden nun auf jede Petrischale gegeben und gut verteilt, um die Zellen zu lysieren.

- Die Zellen werden abgeschabt und möglichst rückstandsfrei in einen Handhomogenisator überführt. Die mechanische Bearbeitung der Zellen erfolgt mit 40 Hüben im Handhomogenisator.
- Die aufgeschlossenen Zellen werden nun bei 20000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig in ein neues Probengefäß überführt und das Pellet verworfen.

Benötigte Reagenzien:

RIPA-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,4	790 mg
NaCl	900 mg
EDTA	37,2 mg
Natriumfluorid	42 mg
Igepal	1 ml

Auf 100 ml mit H₂O_{bidest.} auffüllen.

Pro 1 ml RIPA-Puffer direkt vor Verwendung zugegeben:

Na-Orthovanadat (1 mM)	5 µl
Protease Inhibitor Mix (1 Tablette/2 ml H ₂ O _{bidest.})	20 µl
PMSF (1 mM)	10 µl

6.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit der Methode nach Bradford können Proteine quantitativ bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 (siehe Abb. 6.4) an Proteine.

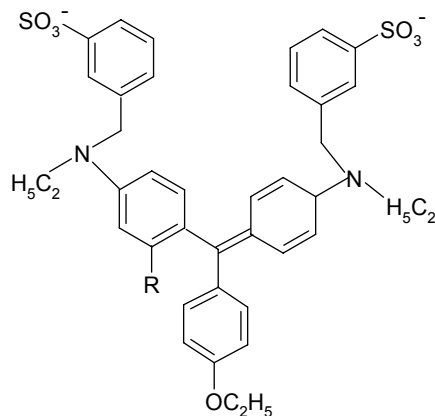


Abb. 6.4: Struktur des Coomassie Brilliant Blue G250[®]

Dabei lagert sich der anionische Farbstoff unspezifisch an basische bzw. unpolare Seitenketten der Proteine an. Das Absorptionsmaximum des ungebundenen Farbstoffes liegt bei 465 nm und verschiebt sich durch die Bindung an die Zellproteine zu 595 nm. Der gebildete Komplex zwischen Protein und Farbstoff ist nach 2 min abgeschlossen und für ungefähr 1 Stunde stabil.

Um anhand der gemessenen Absorptionswerte die Proteinmenge zu bestimmen, wird eine Standardreihe mit BSA („bovine serum albumin“) erstellt. Die Konzentrationen liegen dabei zwischen 0,1 und 1,4 mg/ml BSA.

Benötigte Reagenzien:

Bradford Reagenz

Coomassie–Blue G250	100 mg
EtOH	50 ml
H ₃ PO ₄ (85 %)	100 ml

Mit bidestilliertem Wasser auf 1 l auffüllen. Das Reagenz muss 1 Monat vor der Verwendung angesetzt und vor der Verwendung filtriert werden.

Arbeitsschritte:

- Das erhaltene Zelllysate wird 1:10 verdünnt.
- Es werden 10 µl der Verdünnung mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt.
- Analog werden 10 µl der BSA-Standardreihe ebenfalls mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt.
- In eine 96-Well-Platte werden nun jeweils 200 µl der Proben und der Standardreihe in einer Dreifachbestimmung pipettiert.
- Die photometrische Vermessung der Absorption erfolgt bei 595 nm im Mikroplattenlesegerät.

Auswertung:

Ziel dieser Proteinbestimmung ist es, den Proteingehalt aller Einzelproben für die anschließende SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) einheitlich zu normieren. Hierbei wird von den Werten der Standardreihe der Wert des Wassers abgezogen und von den Werten der Probe, der Wert des RIPA-Puffers. Anschließend errechnet sich die benötigte Proteinmenge durch lineare Regression. Es werden pro Geltasche 40 µg Gesamtprotein aufgetragen.

6.5.4 Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE

Bevor die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden, um die Proteine aufzutrennen, müssen die Proteine noch denaturiert werden. Dies geschieht mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol.

Das anionische Detergenz SDS lagert sich an die Proteine an und überdeckt deren Eigenladung, so dass letztlich alle Proteine eine negative Überschussladung erhalten. β -Mercaptoethanol ist eine reduzierende Thiolverbindung und spaltet in Verbindung mit SDS bei 95°C alle vorhandenen intra- und interzellulären Disulfidbrücken.

Legt man nun an das mit den denaturierten Proben beladene Gel eine Spannung an, so wandern die Proteine zur positiv geladenen Anode. Da eine direkte Beziehung zwischen Molekulargewicht und Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine besteht, können die Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden.

Entsprechend dem Molekulargewicht, des nachzuweisenden Proteins, werden Gele mit unterschiedlichen Acrylamidgehalten verwendet. In dieser Arbeit sind das Gele mit 7 % (EGFR) und 12 % (Tubulin) Acrylamid.

Benötigte Reagenzien:

10x Laufpuffer

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

6x SDS-Probenpuffer

Ansatz für 100 ml :

Tris, pH 6,8 0,5 M	50 ml
Glycerin	40 ml
SDS	1,24 g

0,16 g Bromphenolblau

kurz vor Gebrauch zugeben:

β-Mercaptoethanol	5 % (v / v)
-------------------	-------------

Gießen der Trenn- und Sammelgele:

- Zunächst werden die Glasplatten mit Ethanol entfettet und in die dafür vorgesehene Elektrophoresekammer eingebaut.
- Wasser, Tris·HCl, Acrylamid und SDS werden entsprechend dem Pipettierschema (Tabelle 6.1) zusammengegeben und vermischt.
- Kurz vor der Befüllung der Gele werden APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) als Radikalstabilisator, in die vorgelegte Mischung pipettiert, gemischt und zwischen die Glasplatten der Kammern gefüllt.
- Die Höhe des Trenngels sollte ca. 6 cm betragen.
- Anschließend wird das Trenngel mit n-Butanol überschichtet, um zu verhindern, dass eine Austrocknung des Gels während der ca. 1 h Polymerisation stattfindet, sowie um eine einheitliche Gelgrenze zu erzeugen.

- Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das n-Butanol abgesaugt, der Zwischenraum der Glasplatten mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Papiertüchern getrocknet.
- Es werden nun zwischen die Glasplatten die Kämme gesteckt, die später, nach auspolymerisieren des Sammelgels, eine Geltasche bilden.
- Das Sammelgel wird nach Tabelle 6.2 angesetzt und blasenfrei in den verbleibenden Zwischenraum zwischen Glasplatten und Kämmen pipettiert.

Tabelle 6.1: Pipettierschema der Acrylamid-Trenngele (für je ein Gel).

	7%iges Gel	12%iges Gel
H ₂ O _{bidest.}	2,54 ml	1,72 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,23 ml	1,23 ml
Acrylamid (30 %)	1,15 ml	1,97 ml
SDS (10 %)	49,2 µl	49,2 µl
APS (10 %)	24,6 µl	24,6 µl
TEMED	2,46 µl	2,46 µl

Tabelle 6.2: Pipettierschema der Acrylamid-Sammelgele (für je ein Gel).

	4%iges Gel
H ₂ O _{bidest.}	1,2 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,5 ml
Acrylamid (30 %)	0,25 ml
SDS (10 %)	20 µl
APS (10 %)	20 µl
TEMED	2 µl

- Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels (ca. 1 h) wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen von Gelresten befreit.
- Mittels Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. 6.5.3) errechnet sich die Proteinmenge der jeweiligen Proben, die mit Wasser entsprechend verdünnt werden, um anschließend pro Geltasche den gleichen Gesamtproteingehalt zu enthalten.
- Diese Proteinverdünnung wird vor dem Befüllen der Geltaschen mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und auf dem Schüttelinkubator für 5 Minuten bei 95°C und 900 rpm denaturiert.
- Pro Geltasche werden nun 20 µl (entspricht 40 µg Gesamtprotein) der Proben aufgegeben.
- In eine äußere Tasche werden 8 µl des Molekulargewichtmarkers SeeBlue Plus2 pipettiert.
- Die Elektrophoresekammern werden mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt.
- Anschließend wird die Elektrophoresekammer für 30 Minuten an eine Power-Station mit 100 V angeschlossen, die Spannung dann für weitere 30 Minuten auf 120 V und nach weiteren 30 Minuten auf 140 V erhöht. Dieser langsame Anstieg der Voltzahl dient der Bandenschärfung der Proteine im Sammelgel. Die Elektrophorese wird nach gewünschter Proteinauftrennung abgeschlossen.

6.5.5 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

Um die aufgetrennten Proteine detektieren zu können, muss zunächst ein Transfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran zur Fixierung der Proteine stattfinden, da die Antikörper zu groß sind, um ins Gel zu diffundieren. Dieser so genannte Blot erfolgt nach dem „semi-dry“-Verfahren.

Benötigte Reagenzien:

2x Blottingpuffer

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

wird vor Gebrauch mit bidest. Wasser 1:1 verdünnt

20x TBS

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

Waschpuffer

1x TBS	
Tween-20 [®]	0,3 %

Blockierreagenz

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

Arbeitsschritte:

- Es werden pro Gel 6 Whatman-Paper und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Gels zugeschnitten, die für mindestens 15 Minuten im 1x Blotting-Puffer äquilibriert werden.
- Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele vorsichtig aus den Glasplatten herausgelöst.
- Das Sammelgel wird abgetrennt und verworfen.
- Das Trenngel wird vorsichtig im 1x Blotting Puffer gewaschen.
- Das Gel wird gemäß Abb. 6.5 zwischen den Whatman-Papern auf die Nitrocellulosemembran transferiert.
- Der Blot läuft für 1 Stunde und 15 Minuten bei 70mA pro Gel.

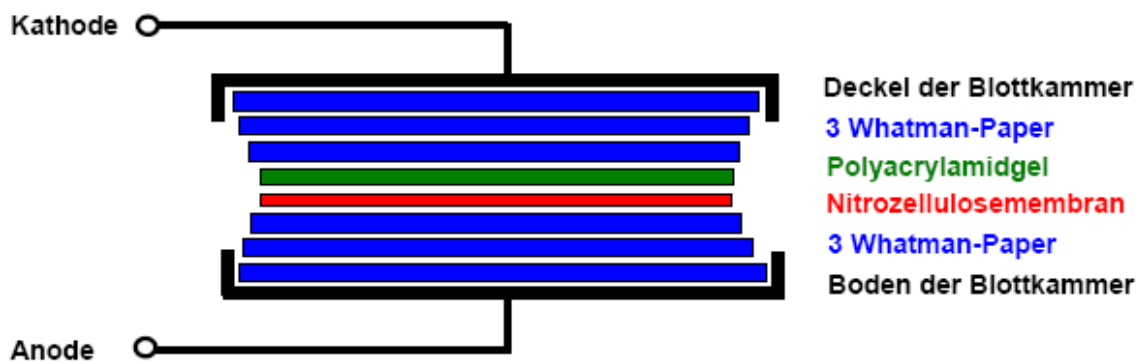


Abbildung 6.5: Schematischer Aufbau des Western Blots.

6.5.6 Immunologische Detektion

Die Detektion des Zielproteins erfolgt mit Hilfe von Antikörpern. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein, während der sekundäre Antikörper gegen den Primären gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper ist mit HRP („horseradish peroxidase“) konjugiert, welches nach Zugabe des Substrates Luminol in einer chemolumineszentrischen Reaktion die nachzuweisenden Proteine sichtbar macht (siehe Abb. 6.6).

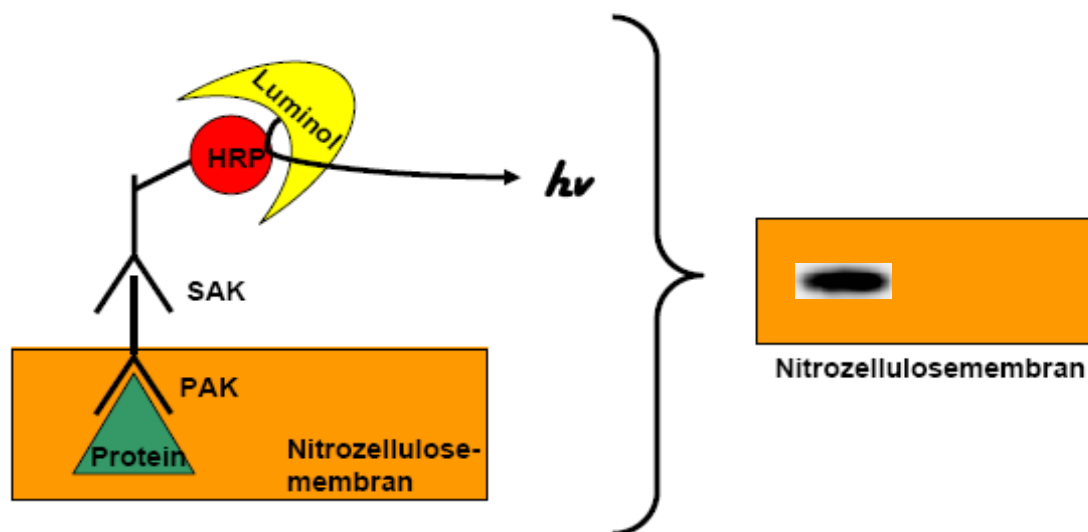


Abb. 6.6: Schematische Darstellung der Immunologischen Detektion. PAK: primärer Antikörper; SAK: sekundärer Antikörper; HRP: horseradish peroxidase; $h\nu$: Lichtquant.

Antikörper:

Primärantikörperinkubation und Verdünnung:

Tubulin („mouse“):	1:5000 im Blockierreagenz
pEGFR („goat“):	1:1000 im Blockierreagenz
EGFR („mouse“)	1:1000 im Blockierreagenz

Sekundärantikörperinkubation und Verdünnung:

Anti-„goat“ HRP-conj.	1:2000 im Blockierreagenz
Anti-„mouse“ HRP-conj.	1:2000 im Blockierreagenz

Durchführung:

- Nach dem Blot müssen die unspezifischen Stellen auf der Membran mit einem Blockierreagenz (Milchpulver) für 1 Stunde blockiert werden.
- Der primäre Antikörper wird dann in einer entsprechenden Verdünnung mit dem Blockierreagenz, über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben.
- Anschließend wird der überschüssige und nicht spezifisch gebundene Antikörper mittels Waschpuffer entfernt. Das Waschen erfolgt 3x hintereinander für je 5 min mit ca. 15 ml des Waschpuffers.
- Die Sekundärantikörperinkubation erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur, ebenfalls im Blockierreagenz.
- Anschließendes Waschen der Membran für 3x für 5 min mit 15 ml Waschpuffer.
- Die Detektion erfolgt mittels LumiGLO-Lösung, die in Wasser verdünnt wird (je 100 µl LumiGLO I und II mit 1800 µl bidest. Wasser pro Membran).
- Detektiert werden die Banden mit Hilfe der LAS-3000 (Image Reader, Fujifilm). Anschließend erfolgt noch die softwareunterstützte, semiquantitative Auswertung (Aida Image Analyser Multilabeling v.3.52).

6.5.7 Untersuchung des Transkriptionsfaktors Nrf2 mittels Western Blot Analyse

Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Hierzu werden die zu untersuchenden Proteine zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Kapitel 6.8.4) und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe Kapitel 6.8.5). Die Detektion der Proteine erfolgt durch eine immunologische Reaktion mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (siehe Kapitel 6.8.6).

Benötigte Reagenzien:

Lysepuffer A:

10 mM Hepes
10 mM KCl
0,1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
pH 7,9 einstellen,
mit H₂O_{bidest} auf 100 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C
vor Gebrauch pro ml angesetztem Puffer frisch hinzugeben:
40 µl Proteaseinhibitormix
10 µl DTT

Lysepuffer B:

20 mM HEPES
0,4 M NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
pH 7,9 einstellen
mit H₂O_{bidest} auf 100 ml auffüllen
Lagerung bei 4°C
vor Gebrauch pro ml angesetztem Puffer frisch hinzugeben:
40 µl Proteaseinhibitormix
10 µl DTT

Antikörper:

Primärantikörperinkubation und Verdünnung:

Tubulin („mouse“): 1:5000 im Blockierreagenz
Nrf2 („rabbit“): 1:300 im Blockierreagenz

Sekundärantikörperinkubation und Verdünnung:

Anti-„rabbit“ HRP-conj. 1:2000 im Blockierreagenz
Anti-„mouse“ HRP-conj. 1:2000 im Blockierreagenz

Durchführung:

- In einer großen Petrischale (Ø 14 cm) werden $3,0 \cdot 10^6$ HT29-Zellen in 10 ml 10%igem FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 48 h kultiviert.
- Die Substanzinkubation erfolgt mit Katalase (100 U/ml) in 5 ml serumfreiem Medium für 3h.
- Die zu untersuchende Substanz wird in DMSO gelöst und entsprechend zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt (Endkonzentration: 1 %).
- Die Lösungsmittelkontrolle ist somit 1 % DMSO.
- Inkubationslösungen verwerfen.
- HT29-Zellen 2x mit je 5 ml eiskaltem 1 x PBS waschen; durch Schrägstellen der Petrischalen können die noch vorhandenen PBS-Reste mit einer Pipette entfernt werden.
- Zellen mit 700 µl 1x PBS abschaben und die Zellsuspension in ein eisgekühltes Eppendorf-Gefäß überführen.
- Zentrifugation für 3 min bei 800 g und 4°C
- Überstand verwerfen und Zellpellet in 200 µl eiskaltem Lysepuffer A resuspendieren; 15 min inkubieren.
- 17 µl Nonidet® P40 10%-ig zugeben und anschließend 5 s vortexen.
- Zentrifugation für 3 min bei 4°C und 800 g.
- Der Überstand enthält die zytosolische Fraktion und wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
- Zellpellet in 65 µl Lysepuffer B resuspendieren und 15 min inkubieren, währenddessen alle 2 min für ca. 12 s vortexen.
- Zentrifugation für 5 min bei 15 000 g und 4°C.
- Der Überstand enthält die Kernfraktion und wird in ein neues, eisgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Das Zellpellet wird verworfen.
- Mittels der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 6.5.3) wird von den isolierten Zellfraktionen der Proteingehalt bestimmt.
- Der Proteingehalt der Proben wird auf 2 mg/ml eingestellt.
- Die Proben werden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine im Thermocycler bei 95°C 5 min denaturiert und anschließend zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt.

Durchführung:

- 5000 HT29-Zellen werden in einer 24-Loch-Platte ausgestreut und kultiviert.
- Zur Inkubation wird das Medium abgesaugt und jedes Loch mit 1 ml 1 x PBS-Lösung gespült.
- Die Substanzinkubation erfolgt pro Loch in 1 ml serumfreiem für 45 min.
- Auf die Hälfte der Zellen wird je Experiment zusätzlich Katalase (100 U/ml) aufgeben.
- Mitgeführt wird eine Standardreihe im Konzentrationsbereich zwischen 0,25 - 10 μM H_2O_2 .
- Nach Beenden der Inkubation erfolgt das Überpipettieren von je 2 x 50 μl des Mediumüberstands als Duplikat in eine 96-Loch-Platte. Als Blindwert wird 50 μl Puffer eingesetzt.
- Start der Reaktion durch Zugabe von 50 μl „working solution“ in jedes Loch.
- Nach 30 min Inkubation im Dunklen bei RT erfolgt die Fluoreszenzmessung bei $\lambda = 585 \text{ nm}$ mittels Mikrotiterplattenlesegerät (Victor³V).

Auswertung:

Die Berechnung der gebildeten H_2O_2 -Menge erfolgt, nach Abzug der Kontrolle, durch lineare Regression.

6.7 Sulforhodamin B-Test

Der Sulforhodamin B (SRB)-Test ist ein Standardverfahren für eine schnelle und unkomplizierte Beurteilung der Zytotoxizität einer Substanz. Prinzipiell werden hier wachstumshemmende Eigenschaften einer Testsubstanz im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt. Der eingesetzte Farbstoff Sulforhodamin B (siehe Abb. 6.8) wird in der protonierten Form vom fixierten Protein aufgenommen und kann ausschließlich nach Waschung und Trocknung durch Zusatz einer basischen Pufferlösung (pH10) eluiert werden.

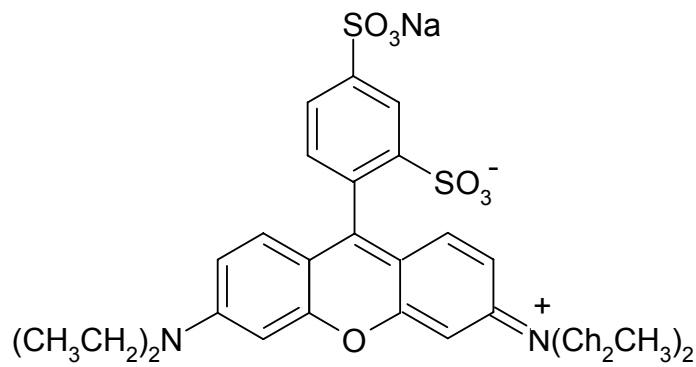


Abb. 6.8: Strukturformel des Farbstoffes Sulforhodamin B

Da innerhalb einer Zelllinie eine konstante Korrelation zwischen Zellzahl und Proteingehalt besteht, lässt sich über eine anschließende photometrisch Vermessung der Probe bei 570 nm eine Aussage über das Zellwachstum treffen, das gegenüber der unbehandelten Kontrolle in Prozent angegeben wird.

Benötigte Reagenzien:

Trichloressigsäure (TCA)

50 % Trichloressigsäure in H₂O_{bidest.}

Sulforhodamin B

0,4 % Sulforhodamin B in 1 % Essigsäure

Essigsäure

1 % Essigsäure in H₂O_{bidest.}

Tris-Base

10 mM Tris-Base in H₂O_{bidest.} pH 10,0

Durchführung:

- In einer 24-Lochplatte werden pro Loch 4000 Zellen in 10%igem FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 48 Stunden in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert.
- Die Substanzinkubation erfolgt ebenfalls in 10%igem FKS-haltigem Medium für die gewünschte Inkubationsdauer in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C.
- Die Reaktion wird mit 100 µl 50%iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) abgestoppt.
- Um die noch lebenden Zellen am Boden zu fixieren lässt man die TCA für mindestens 1 Stunde bei 4°C einwirken.
- Anschließend werden die Zellen 4 Mal mit bidest. Wasser gewaschen um Zell- und Mediumreste zu entfernen.
- Die 24-Lochplatte wird getrocknet.
- Im abgedunkelten Raum werden die Zellen mit 250 µl 0,4 %iger (w/v) SRB-Lösung für mindestens 30 Minuten gefärbt.
- Der nicht an Zellprotein gebundene Farbstoff wird ausgewaschen. Zunächst 2x mit bidest. Wasser, anschließend 2x mit 1%iger (v/v) Essigsäure.
- Die 24-Lochplatte wird getrocknet.
- Der Farbstoff wird in einer adäquaten Menge Tris-Base (pH 10) gelöst.
- Photometrische Vermessung der 24-Lochplatte bei 570 nm.

Auswertung:

Die gemessenen Absorptionswerte einer Platte der zu untersuchenden Substanz werden gemittelt und zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle, welche auf 100% festgelegt wird, ins Verhältnis gesetzt. Dieser erhaltene Wert ist der sogenannte „Test over Control“-Wert: T/C, der ein Maß für den Proteingehalt darstellt, der wiederum mit der Zellzahl korreliert und als Verhältnis zur Kontrolle ausgedrückt wird.

6.8 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

Mit Hilfe des DCF-Assays kann der relative Redoxstatus der Zellen erfasst werden [Wang und Joseph, 1999]. Der verwendete unpolare, nicht fluoreszierende Farbstoff 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) diffundiert durch die Zellmembran ins Zytosol und wird dort durch intrazelluläre Esterasen zu dem nicht fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert (Abb. 6.9). Aufgrund erhöhter Polarität kann der Farbstoff nicht mehr aus der Zelle austreten.

Durch die Einwirkung von Peroxiden (H_2O_2) und anderen reaktiven Sauerstoffspezies wird 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) zu dem fluoreszierenden Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert, der bei einer mittleren Wellenlänge von $\lambda = 485$ nm angeregt werden kann und bei einer mittleren Wellenlänge von $\lambda = 530$ nm emittiert [LeBel et al., 1992]. Dabei verläuft die Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies ROS unspezifisch und lässt keine Aussage zu, um welche ROS im Testsystem es sich handelt [Frank et al., 2000].

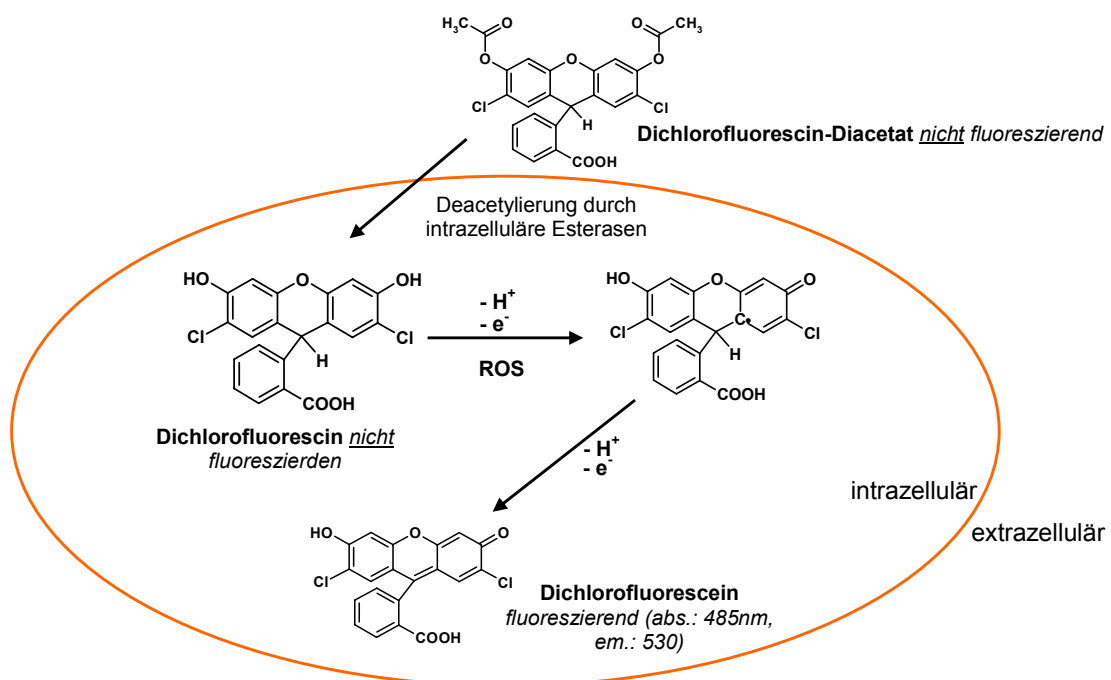


Abbildung 6.9: Zwischenstufen der Umwandlung von reduziertem und acetyliertem 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) in fluoreszierendes 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) innerhalb der Zelle.

Benötigte Reagenzien:

1x PBS	siehe Abschnitt 6.2.2
farbloses DMEM-Medium	
2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat	10 mM

im schwarzen Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen und in DMSO lösen.

Durchführung:

Zunächst werden 4 - 4,5 x 10⁴ Zellen in einem Volumen von 100 µl pro Well einer schwarze 96-Lochplatten mit klarem Boden ausgestreut und für 48 h im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

Je nach Inkubationsprotokoll kann sowohl der direkte Einfluss von Substanzen auf den relativen Redoxstatus der Zelle, als auch mittels zweistufigem Inkubationsprotokoll die antioxidative Wirkungen von Substanzen gegenüber Menadion-induzierten ROS untersucht werden.

Die Untersuchung auf eine protektive Wirkung gegenüber ROS beinhaltet zunächst eine 24 h Vorinkubation mit den zu untersuchenden Testsubstanzen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) und DMSO (1 %) als Lösungsmittelkontrolle in serumhaltigem Medium (10 % FKS). Nach Entfernen des Inkubationsmediums werden die Zellen mit 100 µl PBS-Lösung pro Well einmal gewaschen und mit dem Farbstoff 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (Endkonzentration 50 µM in PBS) für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Da es sich bei dem Farbstoff um eine lichtempfindliche Substanz handelt werden alle nachfolgenden Arbeiten im Dunkel durchgeführt. Der überschüssige Farbstoff wird durch die nachfolgenden Waschschriffe (2x) mit PBS entfernt und die Zellen mit dem Redoxcyclus Menadion (Endkonzentration 20 µM) im serumfreiem farblosen DMEM-Medium inkubiert. Die fluorimetrische Messung im Mikroplattenlesegerät erfolgt zu Beginn der Menadion-Inkubation (0 min) und nach 1h.

Um den direkten Einfluss der Extrakte auf den relativen Redoxstatus der Zelle erfassen zu können, werden die Zellen erst nach der Inkubation mit DCF-DA und dem Waschschriff mit den Testsubstanzen in serumfreien farblosen DMEM-Medium inkubiert. Zudem wird sowohl eine Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) als auch eine Positivkontrolle (20 µM Menadion) mitgeführt. Die Fluoreszenzintensität wird sofort (0 min) und nach 3 h gemessen.

Auswertung:

Aus der Differenz beider Messungen bei $t = 0$ min und $t = 60$ min bzw. 180 min lässt sich der Fluoreszenzanstieg, verursacht durch die Oxidation des Dichlorofluorescein-Diacetat zu Dichlorofluorescein bestimmen. Die Auswertung erfolgt als relative Fluoreszenzintensität in Prozent, bezogen auf die mit nur mit Menadion behandelten Zellen, bzw. bei der direkten Messung auf die Lösungsmittelkontrolle.

$$\text{rel. FI [\%]} = \frac{FI_{(x \text{ min, T})} - FI_{(0 \text{ min, T})}}{FI_{(x \text{ min, K})} - FI_{(0 \text{ min, K})}} \times 100$$

FI: Fluoreszenzintensität

T: Testsubstanz

K: Kontrolle, auf die die Testsubstanz bezogen werden soll.

6.9 Glutathionbestimmung

Der Gesamtglutathiongehalt wird über einen kinetischen Test bestimmt. Dabei wird in Anwesenheit von Glutathionreduktase (GR) GSH/GSSG in einer NADPH abhängigen Reaktion mit 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) umgesetzt (Abb. 6.10). Da alle Reaktionsedukte (NADPH, GSR, DTNB) außer GSH in einem deutlichen Überschuss vorhanden sind, ist die zeitabhängige Extinktionszunahme bei 412 nm proportional zum Gesamtglutathiongehalt (tGSH). Anhand mitgeführter Standardlösungen kann der tGSH-Gehalt berechnet werden.

Um den GSSG-Gehalt bestimmen zu können, wird das vorhandene GSH mittels 2-Vinylpyridin kovalent gebunden und damit aus dem Gleichgewicht der Reaktion entzogen [Griffith, 1980]. Die Reaktion ist in Abb. 6.11 dargestellt. Das verbliebene GSSG wird analog zur tGSH Bestimmung in Gegenwart von GR wieder zu GSH reduziert und mit DTNB umgesetzt.

Die zeitabhängige Extinktionszunahme bei $\lambda = 412$ nm ist proportional zur GSH-Konzentration, dass wiederum dem GSSG-Gehalt entspricht, wobei aus einem GSSG zwei Äquivalente GSH entstehen. Durch Differenzbildung kann der GSH-Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnet werden.

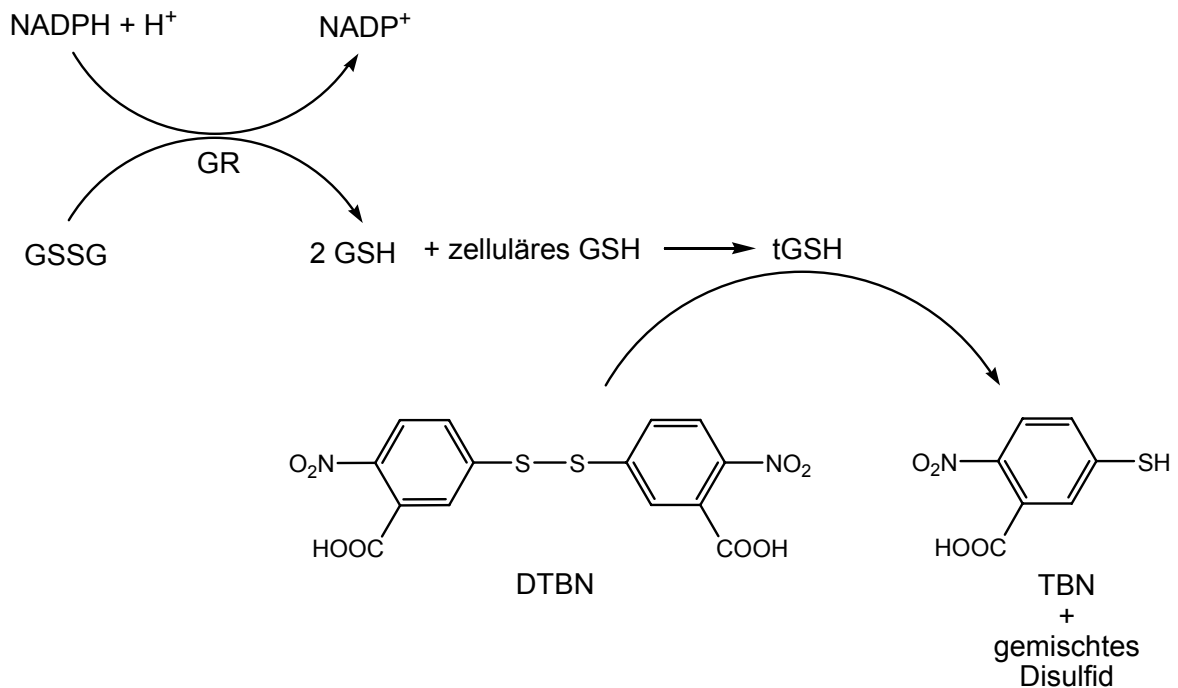


Abb. 6.10: Schematische Darstellung der Bestimmung des tGSH-Gehalts. DTNB, 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure); GR, Glutathionreduktase; GSH, reduziertes Glutathion; GSSG, oxidiertes Glutathion; tGSH, Gesamt-GSH; TNB, 5-Thio-2-Nitrobenzoat.

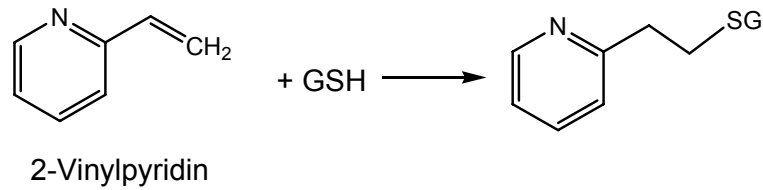


Abb. 6.11: Umsetzung von GSSG mit 2-Vinylpyridin.

Benötigte Reagenzien:

Puffer A

KH ₂ PO ₄	125 mM
EDTA	8 mM

in H₂O_{bidest.} lösen, auf 250 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C.

Puffer B

K ₂ HPO ₄	125 mM
EDTA	8 mM

in H₂O_{bidest.} lösen und auf 500 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C.

A/B-Puffer:

15 ml Puffer A
85 ml Puffer B

Lösung frisch anzusetzen.

tGSH-Reagenzmix (Angaben pro Loch)

A/B-Puffer	164 µl
DTNB-Lösung	20 µl
NADPH-Lösung	4 µl
GR (50 U/ml)	2 µl

Den Reagenzmix jedes Mal erst unmittelbar vor der Messung anzusetzen.

GSSG-Reagenzmix (Angaben pro Loch)

A/B-Puffer	154 µl
DTNB-Lösung	20 µl
NADPH-Lösung	4 µl
GR (50 U/ml)	2 µl

Der Reagenzmix ist jedes Mal erst unmittelbar vor der Messung anzusetzen.

Sulfosalicylsäure-Lösung (SAA)

5 bzw. 10 % (w/v) in H₂O_{bidest.} lösen;
Lagerung bei 4°C.

1 mM GSH-Stammlösung

30,73 mg GSH in 1 ml H₂O_{bidest.} lösen
200 µl davon in 19,8 ml 5 % SSA lösen
zu je 1 ml aliquotieren und bei -80°C aufbewahren

1 mM GSSG-Stammlösung

61,27 mg GSSG in 1 ml H₂O bidest. lösen
200 µl davon in 19,8 ml 5 % SSA lösen
zu je 1 ml aliquotieren und bei -80°C aufbewahren

DTNB-Lösung 6 mM

in A/B-Puffer lösen; Lösung frisch anzusetzen.

Glutathionreduktaselösung (GR) (50 U/ml)

GR aus Hefe 168 U/ml

Das Enzym ist abhängig von seiner Aktivität mit A/B-Puffer auf 50 U/ml zu verdünnen. Die Lösung ist jedes Mal frisch anzusetzen.

NaHCO₃-Lösung

0,5 % (w/v) in H₂O_{bidest.} lösen; Lagerung bei 4°C

NADPH-Lösung

20 mM

in 0,5 % NaHCO₃-Lösung lösen; Lagerung bei -80°C.

Triethanolamin-Lösung

50 % (v/v) in H₂O_{bidest.} Lösen; Lagerung bei 4°C.

Durchführung:

Inkubation

Für den Versuch werden etwa $1,2 \times 10^6$ HT29–Zellen in 10 ml Kulturmedium (10 % FKS) in mittleren Petrischalen (d = 10 cm) ausgestreut und bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank für 48 h kultiviert. Anschließend erfolgt bei gleichen Bedingungen eine 24 h Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Neben den gewünschten Substanz Konzentrationen werden eine Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) und eine Buthioninsulfoximinlösung (1 mM) als Positivkontrollen mitgeführt.

Aufarbeitung der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen zweimal mit je 5 ml eiskalter PBS-Lösung gewaschen. Danach werden die Zellen für zwei bis drei Minuten im Brutschrank mit 1 ml Trypsin-Lösung inkubiert und die Trypsinreaktion mit gleicher Menge serumhaltigem Medium (10 % FKS) abgestoppt. Die bereits teils abgelösten Zellen werden mittels einer Pipette in ein auf Eis stehendes 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die verbliebenen Zellen werden durch zweimaliges Nachspülen mit je 1 ml serumfreiem Medium (0 % FKS) abgelöst und mit der Zellsuspension vereinigt. Nach dem Resuspendieren der Lösung werden zur Viabilitätsbestimmung 20 µl von der Zellsuspension entnommen und entsprechend der Zelldichte mit Trypanblau verdünnt (siehe Kapitel 6.12). Die ermittelte Viabilität der Zellen sollte dabei 80 % nicht unterschreiten um sicher zu stellen, dass von den eingesetzten Substanzen keine zytotoxische Wirkung ausgeht und keine Artefakte gemessen werden.

Im nächsten Arbeitsschritt wird die Zellsuspension bei 4°C und 460 g für 10 min zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 1 ml A/B–Puffer resuspendiert und nach dem Nachspülen mit 600 µl A/B–Puffer in ein 2 ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Anschließend werden die Zellen bei 4°C und 400 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet mit 370 µl A/B-Puffer versetzt. Nach intensivem Resuspendieren und Vortexen der Lösung werden von der Suspension zweimal je 10 µl für die Proteinbestimmung entnommen. Die restlichen 350 µl Zellsuspension werden zur Ausfällung der Proteine im

Verhältnis 1:1 mit 10 % 5-Sulfosalicylsäure (SSA) versetzt und nach dem Vortexen für 15 min auf dem Eis stehen gelassen. Nach der Zentrifugation bei 4°C und 20.000 rpm für 10 min können die aufgearbeiteten Proben für maximal vier Wochen bei -80°C im Biofreezer gelagert oder sofort zur Messung eingesetzt werden.

Messung von tGSH

Die Bestimmung des tGSH-Gehaltes erfolgt aus dem Überstand der vorher zentrifugierten Zellsuspension.

Vor der Messung wird zunächst ausgehend von einer GSH-Stammlösung (1 mM) eine Glutathion-Standardgerade in 5%iger SSA hergestellt, wobei die Standards jedes Mal unmittelbar vor der Messung frisch angesetzt werden müssen.

Anschließend werden 10 µl des GSH-Standards und des Blindwertes (5 % SSA) sowie je 10 µl des Überstandes der Proben in eine klare 96-Lochplatte pipettiert. Die Messung mit dem Mikroplattenlesegerät erfolgt unmittelbar nach dem mittels einer Mehrkanalpipette die Platte pro Well mit 190 µl frisch angesetztem tGSH Reagenzmix versetzt wurde. Sind die Extinktionswerte der Proben über den linearen Absorptionsbereich hinaus, muss es entsprechend mit einer Mischung aus A/B-Puffer und 10 % SSA-Lösung (Verhältnis 1:1) verdünnt werden.

Die Standards und Proben werden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm jeweils als Doppelbestimmung vermessen. Zur Bestimmung der Extinktionszunahme pro Zeit erfolgt eine zweite Messung der Absorption nach exakt 2 Minuten.

Tabelle 6.3: Pipettierschema der GSH-Standardreihe

Endkonzentration [µM]	1 mM GSH-Standardlösung [µl]	H ₂ O _{bidest.} [µl]
10	10	990
20	20	980
40	40	960
60	60	940
80	80	920
100	100	900
120	120	880
160	160	840
200	200	800

Messung von GSSG

Um den GSSG-Gehalt ermitteln zu können wird jeweils 500 µl des Überstandes mit 20 µl 2-Vinylpyridin und 100 µl 50 % TEA versetzt. Die Derivatisierung des Glutathions erfolgt im Thermomixer für 1 h bei 26°C und 600 rpm. Vor der Messung wird ausgehend von einer GSSG-Stammlösung (0,1 mM) eine Standardreihe in 5 % SSA hergestellt, wobei die Standards jedes Mal unmittelbar vor der Messung frisch angesetzt werden müssen. Anschließend werden jeweils 20 µl von der Standardreihe, dem Blindwert (5 % SSA) und von der umgesetzten Probelösung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Die Messung mit dem Mikroplattenlesegerät erfolgt unmittelbar nach dem mittels einer Mehrkanalpipette die Platte pro Well mit 180 µl frisch angesetztem tGSH Reagenzmix versetzt wurde. Die Messung erfolgt als Doppelbestimmung, bei Raumtemperatur und einer mittleren Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Zur Bestimmung der Extinktionszunahme pro Zeit erfolgt eine zweite Messung der Absorption nach exakt 10 Minuten.

Tabelle 6.4: Pipettierschema der GSH-Standardreihe der GSSG-Messung

Endkonzentration [µM]	0,1 mM GSH-Standardlösung [µl]	H ₂ O _{bidest.} [µl]
0,7	7	993
1,3	13	987
2,5	25	975
5	50	950
10	100	900
10	100	900
20	200	800

Auswertung:

Zur Auswertung wird aus den Messwerten von der Doppelbestimmung ein Mittelwert gebildet und die Differenz aus Extinktionen E_1 bei $t=0 \text{ min}$ und E_2 bei $t=2 \text{ bzw. } 10 \text{ min}$ ermittelt. Danach wird der ΔE -Wert durch die Minutenzahl dividiert, Blindwert subtrahiert und damit die Extinktionszunahme pro Minute bestimmt. Die gemessenen Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit der Standards werden grafisch aufgetragen und mittels linearer Regression einer Geradengleichung bestimmt.

$$E/\text{min} = \left[\frac{E_2 - E_1}{\text{min}} \right] - \text{Blindwert}$$

E_1 = Extinktion nach 0 min

E_2 = Extinktion nach 2, bzw. 10 min

E/min = Extinktionszunahme pro Minute

Anhand der Gleichung kann aus den gemessenen Extinktionen der Proben, die dazugehörige tGSH- bzw. GSSG-Konzentration (μM) berechnet werden. Die erhaltenen Werte werden auf die zugehörige Proteinmenge der Probe normiert und in nmol GSH / mg Protein angegeben. Der GSH-Gehalt berechnet sich als Differenz aus dem tGSH- und GSSG-Gehalt. Der prozentuale GSH-Status berechnet sich aus dem GSH-Gehalt und dem tGSH-Gehalt erhalten. Der prozentuale GSH-Status berechnet sich aus dem GSH- und tGSH-Gehalt nach folgender Formel:

$$\text{GSH-Status} = \frac{(\text{tGSH} - \text{GSSG})}{\text{tGSH}} \times 100$$

6.10 Real Time PCR

Um die Expression ausgewählter Gene, beziehungsweise deren Modulation durch die Testsubstanzen zu untersuchen, wird eine quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wird nach Isolierung der RNA, diese mit Hilfe Reverser Transkriptasen in cDNA („complementary“ DNA) umgeschrieben. Nachfolgend werden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus der cDNA ausgewählte Sequenzen *in vitro* amplifiziert. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA durch Fluoreszenzmessungen erfolgt durch den Farbstoff SYBR[®] Green (QIAGEN).

Benötigte Reagenzien:

DEPC-H₂O

1 ml DEPC in 1 l H₂O_{bidest.} lösen, über Nacht rühren und autoklavieren.

Durchführung:

Zellinkubation

Für die Untersuchungen zur Modulation der Transkriptmenge verschiedener ARE-regulierter Gene werden $0,8 \times 10^6$ HT29-Zellen in einer Petrischale (d = 5 cm) ausgestreut und für 48 h im Brutschrank kultiviert. Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen unter Zusatz von 100 U/ml Katalase für 24 h inkubiert. Bei jedem Experiment wird eine Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) sowie 200 µM *tert.*-Butylhydrochinon (tBHQ) als Positivkontrolle mitgeführt.

RNA-Isolierung

Zur Präparation der RNA wird das RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN) verwendet. Im ersten Arbeitsschritt erfolgt die Zellyse in einem RNaseinhibitor-haltigen Extraktionspuffer, um die Isolierung intakter RNA sicherzustellen. Anschließend erfolgen das Homogenisieren der RNA, sowie die Bindung der Gesamt-RNA an eine RNeasy Silica-Membran. Nach dem Auswaschen von Verunreinigungen mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration, wird die RNA in RNase-freiem Wasser von der RNeasy Mini Spin-Säule eluiert (Abb. 6.12).

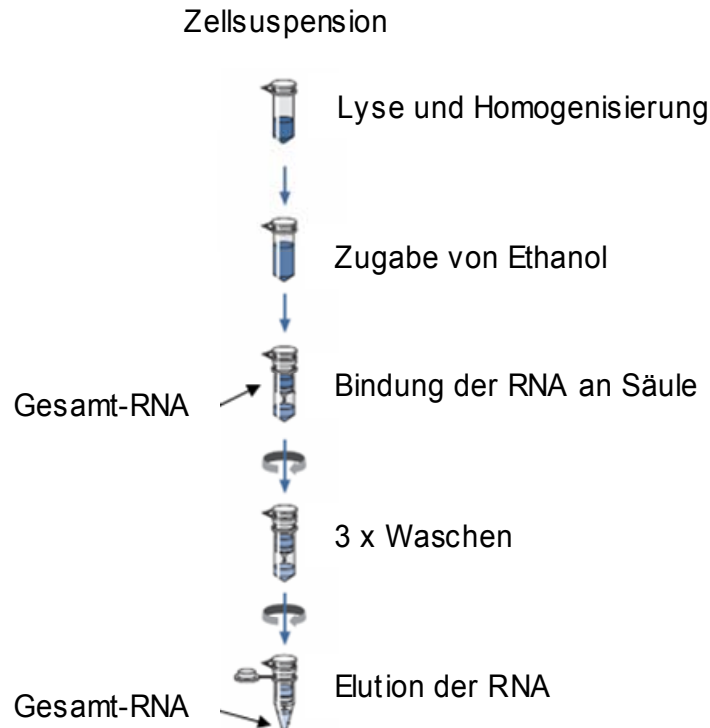


Abb. 6.12: Schematische Darstellung des RNeasy[®] Mini Verfahrens [QIAGEN Handbuch].

- Entfernen des Inkubationsmediums und Spülen des Zellrasens mit 5 ml eiskalter PBS-Lösung.
- Verwerfen der PBS-Lösung und Zellyse durch Zugabe von 600 µl RLT-Puffer, dem 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml Pufferlösung zugesetzt werden.
- Abschaben des Zellrasens mit Hilfe eines sterilen Einweg-Schaber (Sarstedt) und Überführen des Zellysats in ein steriles Eppendorfgefäß (1,5 ml).
- Homogenisieren des Zellysats und der DNA durch 5-maliges resuspendieren durch eine 0,9 mm Kanüle.
- Zugabe von 600 µl Ethanol (70 %) und Aufgabe von 700 µl der Zellsuspension auf die Silica-Säule.
- Zentrifugation für 0,5 min bei 10 000 g (RT).
- Nach Verwerfen des Durchflusses Aufgabe der restlichen Zellsuspension auf die Säule und wiederholte Zentrifugation für 0,5 min mit 10 000 g (RT).
- Verwerfen des Durchflusses und Aufgabe von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule.
- Zentrifugation bei 10 000 g für 15 s (RT) und Verwerfen des Durchflusses.

- Aufgabe von 500 μl RPE-Puffer auf die Säule und Zentrifugation für 15 s bei 10 000 g (RT). Verwerfen des Durchflusses und Aufsetzen der Säule auf ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß.
- Nochmalige Aufgabe von 500 μl RPE-Puffer auf die Säule und Zentrifugation bei 10 000 g für 2 min und 1,5 min bei maximaler Geschwindigkeit (RT).
- Aufsetzen der Säule auf ein RNase-freies Eppendorfgefäß und Aufgabe von 50 μl RNase-freiem Wasser auf die Silica-Säule.
- Zentrifugation für 1,5 min bei 10 000 $\times g$ (RT) und sofortige Lagerung der eluierten RNA auf Eis.

Die Gehaltsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA erfolgt bei $\lambda = 260$ nm mittels Nanodrop[®]-Spektralfotometer. Die Reinheit der gewonnenen RNA wird durch das Verhältnis zwischen der Absorption bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm (ratio A_{260} : A_{280}) bewertet, wobei $\lambda = 280$ nm das Absorptionsmaximum der Proteine darstellt. Eine ausreichende Reinheit ist bei einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,9 bis 2,3 gegeben [RNeasy[®], Mini Handbuch].

Reverse Transkription

Da die Taq-DNA-Polymerase der PCR ausschließlich DNA vervielfältigen kann, wird mit Hilfe Reverser Transkriptasen, die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Reverse Transkriptasen sind virale Enzyme. Da es sich hierbei, im Vergleich zur Mehrzahl der zellulären Transkriptionsvorgänge, um genetische Informationsüberschreibung in umgekehrter Richtung handelt, spricht man von Reverser Transkription. Dabei binden zunächst Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Region der mRNA am 3'-Ende des Transkripts (Abb. 6.13, A). Von diesem Startpunkt aus synthetisiert die RNA-abhängige DNA-Polymerase die komplementäre DNA in 5'→3'-Richtung (Abb. 6.13, B). Nach Abschluss der Synthese des ersten cDNA-Stranges, wird der mRNA-Strang von der Reversen Transkriptase abgebaut und durch einen zweiten cDNA-Strang ersetzt, woraus ein cDNA-Doppelstrang resultiert (Abb. 6.13, C).

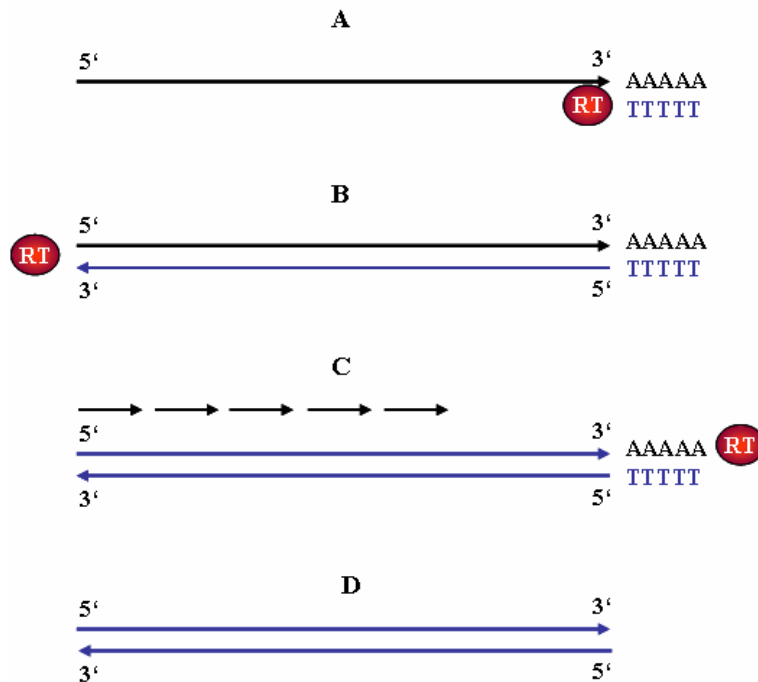


Abb. 6.13: Schematische Darstellung der Reversen Transkription.

Für diese Reverse Transkription wird das QuantiTect® Reverse Transcription“-Kit (QIAGEN) verwendet. Vor der eigentlichen Reversen Transkription, findet ein zusätzlicher Abbau der genomischen DNA (gDNA) statt. Pro Reaktion werden 1 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben.

Durchführung:

Die gesamte Aufarbeitung erfolgt auf Eis.

- Verdünnung der isolierten RNA auf 1 µg mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 12 µl und Zugabe von 2 µl gDNA Wipe-out Puffer.
- Inkubation bei 42°C für 2 min.
- Zugabe von 6 µl RT-Mastermix (4 µl 5 x RT-Puffer, 1 µl Primer Mix und 1 µl Reverse Transkriptase).
- Inkubation bei 42°C für 15 min.
- Inaktivierung der Reversen Trankriptase durch Inkubation bei 95°C für 3 min.

Sofortige Lagerung der cDNA auf Eis, Lagerung bei - 20°C für maximal 2 Monate möglich.

Real Time PCR

Durch die PCR kann die DNA genspezifisch mit Hilfe einer hitzeresistenten DNA-Polymerase *in vitro* vervielfältigt werden. Dazu wird die Taq-Polymerase, die ursprünglich einem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* entstammt, eingesetzt. Für die PCR werden die zu amplifizierenden DNA-Matrizen und genspezifische Primer (QuantiTect[®] Primer Assays; QIAGEN) eingesetzt. Die verwendeten Primer sind so konstruiert, dass sie eine Exon/Exon-Schnittstelle überspannen [QuantiTect[®] Primer Assay Handbuch]. Zu Beginn der PCR muss die HotStarTaq-DNA-Polymerase durch Inkubation bei 95°C aktiviert werden. Für die Durchführung der qRT-PCR wird das QuantiTect[®] SYBR Green PCR-Kit (QIAGEN) verwendet.

Die PCR läuft in einer zyklischen Wiederholung von drei Schritten ab (Denaturierung, Annealing, Elongation). Bei der Denaturierung werden die cDNA-Matrize und die Primer durch Erhitzen in ihre Einzelstränge durch Aufbrechen beziehungsweise Aufschmelzen der Wasserstoffbrückenbindungen aufgetrennt (Abb. 6.14, A). Durch Erniedrigung der Temperatur lagern sich die Primer spezifisch an die entsprechenden DNA-Sequenzen an (Annealing). Nachfolgend verlängert die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase durch Bindung an das Primer-Template-Hybrid die DNA-Sequenz in 5'→3' Richtung unter Verbrauch von dNTPs (Abb. 6.14, B). Das Temperaturoptimum der HotStarTaq-Polymerase wird in der Elongation erreicht. Dabei wird der komplementäre DNA-Strang bis zum Ende der Sequenz vervollständigt (Abb. 6.14, C).

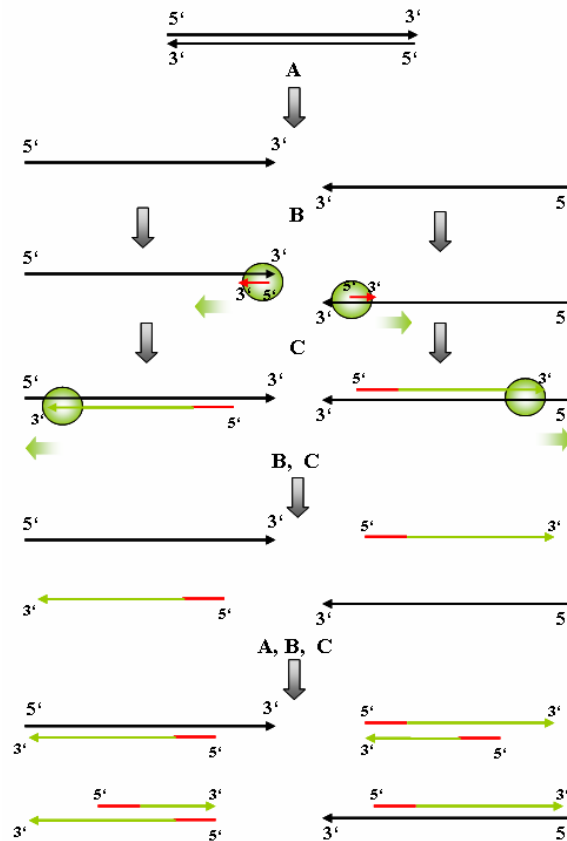


Abb. 6.14: Mechanismus der PCR.

Durchführung:

Die gesamte Aufarbeitung erfolgt auf Eis.

- In eine 96-Loch Platte (Hard Shell WHT/WHT, BIO-RAD) werden 12,5 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (2 x) pro Loch vorgelegt.
- Zugabe von 2,5 µl QuantiTect® SYBR Green Primer Assay (10 x) und 0,5 µl cDNA-Template entspricht 25 ng RNA-Aquivalent als Duplikat.
- Mit H₂O_{bidest.} wird auf ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Well aufgefüllt und die Platte versiegelt (Microseal 'B' Film, BIO-RAD).
- Die Reaktion findet im Thermocycler (PTC-200, MJ Research mit optischer Messeinheit Chrom4™, BIO-RAD) mit folgendem PCR-Programm statt:

Inkubation bei 95°C für 15 min,
Inkubation bei 94°C für 15 s,
Inkubation bei 55°C für 30 s,
Inkubation für 72°C für 30 s,
Detektion der Fluoreszenz,
39 x Wiederholen der Schritte 2 - 5,
Bestimmung der Schmelzkurven von 40°C - 60°C in Schritten von 1°C.

Bei der quantitativen RT-PCR wird parallel zur Amplifikation die DNA mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessung, da der Farbstoff in doppelsträngige DNA interkaliert. Der daraus gebildete Komplex absorbiert blaues Licht ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) und emittiert grünes ($\lambda_{\max} = 524 \text{ nm}$), wodurch die Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden kann. Zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation der untersuchten Sequenz, wird nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei bei einer spezifischen PCR-Reaktion jede Schmelzkurve einen einzelnen Peak aufweisen muss. Bei der Quantifizierung der Transkriptmenge handelt es sich um eine relative Quantifizierung, da sie auf ein nicht reguliertes Kontrollgen („house keeping“ Gen) bezogen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde das Kontrollgen β -Aktin eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Dabei muss im exponentiell ansteigenden Bereich der Amplifikationskurve ein Schwellenwert („threshold“) festgelegt werden. Dadurch kann jeder Amplifikationskurve ein PCR-Zyklus-Wert („threshold cycle“, CT-Wert) zugeordnet werden. Die Berechnung der relativen Transkription (rT) erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Gen}} - \text{CT}_{\beta\text{-Aktin}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Testsubstanz}} - \Delta\text{CT}_{\text{Lösungsmittelkontrolle}}$$

$$\text{rT (relative Transkriptionsänderung)} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

6.11 Comet Assay

Der Comet Assay ist eine Technik, durch die es ermöglicht wird, DNA-Schädigungen in einzelnen Zellen festzustellen. Entwickelt wurde der Assay 1984 von Östling und Johanson zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. Mit der Weiterentwicklung durch Singh im Jahre 1988, konnte durch die Verwendung von basischen Puffern zusätzlich auch DNA-Einzelstrangbrüche, Alkali-sensitive Stellen (z.B. apurine Stellen), DNA-DNA- und DNA-Protein-Crosslinks und Einzelstrangbrüche, die noch mit unvollständigen Reparaturproteinen verbunden sind, festgestellt werden. Vorteile sind noch, dass auch leichte DNA-Schädigungen nachweisbar sind, sich der Test relativ preiswert durchführen lässt und es, bis auf Ethidiumbromid keine sehr gefährlichen oder radioaktiven Abfälle gibt [Tice et al., 2000].

Verwendete Reagenzien:

Agarose:

NMA (normal melting agarose)	0,5 % (w/v) in PBS
LMA (low melting agarose)	0,8 % (w/v) in PBS

PBS für Agarose:

Natriumchlorid	8,00 g/l (137 mM)
Kaliumchlorid	0,20 g/l (2,7 mM)
Kaliumdihydrogenphosphat	0,20 g/l (1,5 mM)
Di-Natriumhydrogenphosphat	1,15 g/l (8,1 mM)

Lyspuffer-Stammlösung:

Natriumchlorid	146,1 g/l (2,5 M)
EDTA	37,23 g/l (100 mM)
Tris (Roth)	12,11 g/l (100 mM)
mit halbkonzentrierter Natronlauge auf pH 10	
N-Laurylsarcosin	10,00 g/l

Lyspuffer-Gebrauchslösung:

89 % (v/v) Lyspuffer-Stammlösung

10 % (v/v) DMSO, technisch

1 % (v/v) Triton-X

Enzypuffer 10-fach:

HEPES 95,32 g/l (400 mM)

Kaliumchlorid 74,56 g/l (1 M)

EDTA 1,862 g/l (5 mM)

BSA 2,000 g/l

mit verdünnter Kalilauge (KOH) auf pH 8,0

Elektrophoresepuffer-Stammlösung:

Natriumhydroxid 400,0 g/l (10 M)

EDTA (pH 10) 74,46 g/l (200 mM)

Neutralisationspuffer:

Tris 48,46 g/l (0,4 M)

mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 7,5

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml bidest. Wasser

Ethidiumbromid-Färbelösung:

Stammlösung mit bidest. Wasser 1:500 verdünnen (Endkonz. 20 µg/ml)

Durchführung:

Das Prinzip des Comet Assays beruht auf folgenden Einzelschritten:

1. Vorbereiten der Objektträger
2. Inkubation der Zellen
3. Einbettung der Zellen in Agarose auf dem Objektträger
4. Lyse der Zellen
5. Enzymbehandlung
6. Alkalisierung und Elektrophorese
7. Neutralisation, Anfärben und Auswertung

1. Vorbereiten der Objektträger (OT)

Ziel ist es, möglichst einheitliche und luftblasenfreie Gele zu erhalten, die einfach auswertbare Schweife mit wenig Hintergrundrauschen zu erhalten. Bewährt haben sich „gefrostete“ (aufgeraute) OT, da das Gel besser haftet und dadurch stabilisiert wird. Es werden 3 Lagen Agarose auf den OT aufgebracht. Für die erste Schicht werden 40 µl geschmolzene NMA („normal melting agarose“) auf die raue Seite des OT pipettiert und mit einem anderen OT auf der gesamten Fläche zu einem dünnen Agarose-Film ausgestrichen. Die OT werden auf der Heizplatte kurz getrocknet.

Für die zweite Lage werden zweimal 65 µl NMA im Abstand von ca. 3,5 cm auf den OT pipettiert und sofort mit Deckgläsern (24 x 24 mm) abgedeckt. Zum Aushärten der Agarose-Felder wird eine eisgekühlte Unterlage verwendet (großer Eppendorf-Röhrchen-Ständer im Eisbett). Die OT lassen sich jetzt für ca. 5 Tage in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahren.

2. Inkubation der Zellen und Viabilitätsbestimmung (Trypanblau-Auszählung)

In kleinen Kunststoff-Petrischalen (Ø 50 mm) werden 300.000 Zellen (HT29) in 5 ml Kulturmedium (serumhaltig) 48 Stunden lang im Brutschrank anwachsen gelassen. Zur Inkubation wird das Medium abgesaugt und durch 5ml Inkubationsmedium (serumfrei) mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen (1 % DMSO-Endkonzentration) ersetzt. Nach einer Stunde Inkubation werden die Petrischalen kodiert, um eine neutrale und unbeeinflusste Auswertung zu gewährleisten. Das Medium abgegossen und die Petrischalen mit 2 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden wird 0,5 ml Trypsin zugegeben, für 1,5 Minuten inkubiert und zügig 0,5 ml Kulturmedium zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen werden mit einem Zellschaber abgeschabt und die Zellsuspension in ein eisgekühltes 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Schale wird mit 0,5 ml Kulturmedium nachgespült und die Suspensionen vereinigt. Sind alle Petrischalen abtrypsinisiert, wird die Viabilität und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. In einem Eppendorf-Röhrchen werden 30 µl Trypanblau vorgelegt, mit 30 µl Zellsuspension vermischt und die bestückte Neubauer Zählkammer am Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Aus dem Verhältnis von lebenden und toten Zellen lässt sich die Viabilität berechnen (siehe Abb. 6.15) Die Viabilität sollte nicht unter 80 % liegen, da sonst zytotoxische Effekte vorliegen, die das spätere Ergebnis verfälschen können.

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen (lebende+tote)}} \times 100$$

Abb. 6.15: Berechnung der Viabilität

3. Einbettung der Zellen in Agarose auf dem Objektträger

Für den Erfolg sind Agarosekonzentration (LMA) und Zelldichte sehr ausschlaggebend. Es sollten nur ein paar Zellen im Sichtfeld liegen, da bei zu hoher Zelldichte die Schweife überlappen und damit die Auswertung erschweren oder gar unmöglich machen.

Aus jedem Eppendorf-Röhrchen werden zwei Aliquots mit ca. 70.000 Zellen entnommen und abzentrifugiert (4°C, 2000 U/min, 10 min). Die Eppendorf-Röhrchen werden immer auf Eis gelagert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. In den OT wird die Kodierung eingraviert und das Deckglas entfernt, das Zell-Pellet mit 65 µl geschmolzener LMA („low melting agarose“) mild resuspendiert, auf das vorhandene NMA-Feld pipettiert und sofort mit einem Deckglas bedeckt. Der OT wird für 10 Minuten auf Eis gelagert, um die Agarose aushärten zu lassen.

4. Lyse der Zellen

Die Lyse dient zum Freisetzen der DNA, indem die übrigen Zellbestandteile fragmentiert und aufgelöst werden.

Die Lysepuffer-Gebrauchslösung wird am Vorabend in der Lysekammer angesetzt und im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt. Nach Entfernen der Deckgläser, werden die OT mindestens eine Stunde, besser über Nacht, in den Lysepuffer eingelegt.

5. Enzymbehandlung

Die Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (Fpg) aus *E. coli* dient dazu, oxidierte DNA-Basen in Einzelstrangbrüche zu überführen. Fpg erkennt oxidierte DNA-Basen und schneidet sie aus dem DNA-Strang heraus. Dabei entsteht ein Einzelstrangbruch.

Die OT werden in der Lysekammer nach Abgießen des Lysepuffers dreimal für 5 Minuten mit 4°C kaltem Enzympuffer gewaschen. Während des dritten

Waschschrittes wird Enzym aus dem Biofreezer auf Eis aufgetaut und mit Enzypuffer auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

Auf die OT, die Enzym behandelt werden sollen, werden 50 µl Enzymlösung je Agarose-Feld pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Auf die nicht zu behandelten OT werden 50 µl Enzypuffer je Feld pipettiert und mit Deckglas versehen. Die OT werden für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

6. Alkalisierung und Elektrophorese

Die Alkalisierung ($\text{pH} > 13$) dient der Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, um insbesondere Einzelstrangbrüche, die durch die Fpg-Behandlung verursacht wurden, detektierbar zu machen. Während der Elektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zum Pluspol und durch das Agarosegel trennen sich die Bruchstücke der Größe nach auf, da die kleineren Bruchstücke in bestimmter Zeit eine weitere Strecke zurücklegen können als die Größeren. Je stärker die DNA geschädigt ist, umso größer wird demnach der entstehende Schweif. (siehe Abb. 6.16). Die OT werden, nach Entfernen des Deckglases, in die eisgekühlte Elektrophorese-Kammer gelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass die eingravierte Zahl in Richtung Plus-Pol zeigt, dies ist für die spätere Auswertung wichtig. Die Kammer wird mit 4°C kalten Elektrophorese-Puffer gefüllt, so dass die OT ca. 3-4 mm mit Flüssigkeit bedeckt sind. Die Alkalisierungsdauer beträgt 20 min. Die Kammer wird dazu abgedunkelt.

Anschließend wird die Elektrophorese für 20 Minuten gestartet. Die Voltzahl wird konstant auf 25 Volt eingestellt und die erforderlichen 300 milli-Ampere werden durch Hinzufügen oder Entfernen von Elektrophorese-Puffer eingestellt.

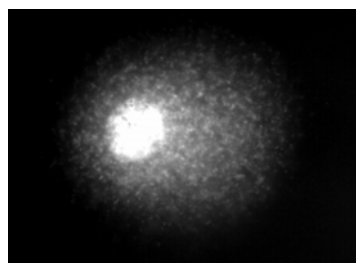


Abb. 6.16: Zellkern mit DNA-Fragmenten nach der Elektrophorese

7. Neutralisation, Anfärben und Auswertung

Nach der Elektrophorese muss das Agarosegel durch dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit Neutralisationspuffer neutralisiert werden.

Zur Visualisierung der DNA wird auf jedes Agarose-Feld 40 µl Ethidiumbromid-Färbelösung pipettiert und dieses mit einem Deckglas abgedeckt. In einer feuchten Kammer können die OT jetzt einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zugunsten deutlicherer Intensitäten, sollten sie aber möglichst rasch ausgewertet werden.

Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erscheinen die geschädigten Zellen nun mit einem Schweif aus DNA-Bruchstücken, der ihnen das Aussehen eines Kometen gibt. Die Vermessung des Schweifes (siehe Abb. 6.17) erfolgt durch ein computergestütztes Bildverarbeitungsprogramm (Comet Assay III von Perspective Instruments). Die „Tail-Intensity“ (Schweif-Intensität) ist die Intensität des Kometenschweifes in Prozent, bezogen auf die Intensität des Kometenkopfes. Der grüne Balken im Intensitätsmaximum des Zellkernes definiert das Ende des Kopfes und den Beginn des Schweifes.

Pro Agarose-Feld werden 50 Zellen ausgewertet und das Ergebnis der zwei Felder gemittelt.

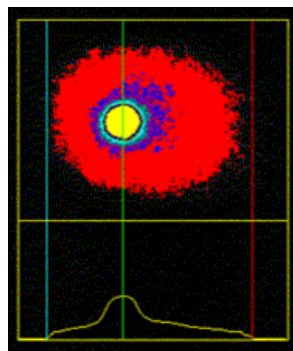


Abb. 6.17: Bestimmung der „Tail-Intensity“

6.12 Trypanblau-Auszählung

siehe Kapitel 6.11 „2.Inkubation der Zellen und Viabilitätsbestimmung (Trypanblau-Auszählung)“

6.13 *In vitro* Fermentation (Simulation der gastrointestinalen Passage)

Verwendete Reagenzien:

Fermentationspuffer für 10 Proben:

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	10,888 g
H ₂ O	800 ml
Natronlauge 10 M für pH-Wert 7,0	< 4 ml

Dialysepuffer für eine „Dünndarmdialyseflasche“:

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	27,22 g
NaHCO ₃	3,76 g
H ₂ O	2000 ml
Natronlauge 10 M für pH-Wert 6,5	~ 10 ml

0,5 g fermentierbares Material (100 % fermentierbar) mit 10 ml Fermentationspuffer in mischen.

Durchführung:

Simulation der gastrointestinalen Passage:

Mund

- 6,25 ml 0,85 % NaCl hinzugeben (für 10 Proben: 0,681 g in 80 ml H₂O)
- 17,36 µl α-Amylase (17,36U, Stammlsg.: 500U/500 µl, in 20 mM NaH₂PO₄), 5 min, 37°C, Schüttelbad (Puffer: 0,023 g NaH₂PO₄ in 10 ml H₂O)

Magen

- 2,813 ml 150 mM HCl hinzugeben (für 10 Proben: 2,625 ml 2 M HCl + 32,375 ml H₂O)
- 1,11 mg Pepsin in 0,9375 ml 20 mM HCl zugeben (für 10 Proben: 12,21 mg Pepsin 10,3125 ml 20 mM HCl; 110 µl + 10,89 ml H₂O)
- pH-Wert von 2 vorsichtig mit 2 M HCl einstellen, anschließend für 2 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubieren.

Dünndarm

- inzwischen intestinales Extrakt herstellen und Dialyseschläuche für 30 min wässern
- nach 2 h pro Flasche 5 ml intestinales Extrakt zu Magensuspension hinzugeben.

Substanz	Menge 1x	Menge 11x
NaHCO ₃	0,047 g	0,517 g
Oxgall	0,003 g	0,033 g
Pankreatin	0,026 g	0,286 g
H ₂ O	5 ml	55 ml
Natronlauge 10 M für pH-Wert 6,5		wenige Tropfen

Flaschen befüllt mit 2 l Dialysepuffer bereitstellen.

- Fermentationsansatz (25 ml) auf 2 Dialyseschläuche verteilen (je 12,5 ml), ~25 cm Schlauchlänge. Schlauchklammern schräg ansetzen und obere Klammer mit schnur versehen.
- Dialyseflaschen mit Stopfen und Lochdeckel versehen und Kanüle durch Stopfen stechen.
- Begasung (6-7 Zyklen) für halb-anaerobe Atmosphäre, Gas: 86 % N₂, 4 % H₂, 10 % CO₂
- Zyklus Überdruck ca. 0,8 bar, Unterdruck bis 0,6 bar
- Im letzten Überdruckzyklus Kanülen vorsichtig aus dem Stopfen ziehen.
- Dialyseflaschen für 6h bei 37°C im Schüttelwasserbad.

Bearbeitung der Faecesproben

Faeces:

- mind. 3 Faecesspender verwenden!
- In Plastiktüte sammeln, Tüte entlüften, verschließen und bis zur Verwendung (max. 3 h) auf Eis lagern.
- Faecesproben zu gleichen Mengen auf die erforderliche Faecesmenge poolen (in Stomacher Tüte).
- vierfache Menge Fermentationspuffer zugeben, leicht kneten und im Stomacher Homogenisator befestigen. Einstellungen: 250 rpm, 3 min

300 ml Faecessuspension	
Substanz	Menge
Faeces	60 g (20 g pro Spender)
Fermentationspuffer	240 ml

- Stomacher Homogenisator nach Gebrauch mit Ethanol abspülen.
- in großes Becherglas durch Metall-Sieb überführen.
- in eine Duranglasflasche überführen und anaerobe Atmosphäre erzeugen (Begasung 12-13 Zyklen) und bei 37°C warmhalten

Dickdarmsimulation:

- Dialyseflaschen mit Kanüle entgasen
- Dialyseschlauch entnehmen und Inhalt des Schlauches in Fermentationsflasche überführen
- event. 2x50 ml Dialysat als Aliquot bei -80°C aufbewahren (Analytik)
- Je Fermentationsflasche (~25 ml) selbe Menge Faecessuspension zugeben.
- pH-Wert auf 6,5 einstellen, Begasung 12-13 Zyklen
- Fermentationsflaschen bei 37°C für 24h im Schüttelwasserbad inkubieren.

Stopp der Fermentation:

- Zentrifuge auf 4°C vorkühlen
- Entgasen, pH-Wert messen und Fermentationslösung in 50 ml Tube überführen.
- Tubes auf Eis zum Abstoppen der Fermentation
- Zentrifugation: 30 min, 4500 rpm, 4°C
- Überstand in neues 50 ml Tube überführen (Pellet auf Eis aufbewahren)
- Zentrifugation : 15 min, 4500 rpm, 4°C
- Überstand in 10 ml Aliquots und Pellet bei -80°C einfrieren.

Sterilfiltration:

- Tubes mit Proben auftauen (unter fließendem Wasser)
- In 2 ml Tubes aus Eis aliquotieren
- Zentrifugation: 13500 rpm, 15 min, 4°C
- Unter der Sterilbank sterilfiltrieren: 10 ml Spritze, Kanülen (25x60mm), 0,22 µm Filter
- Überstand mit Kanüle abnehmen, Kanüle entfernen, Filter aufsetzen und Lösung in vorgelegte 2 ml Tubes geben.
- Einfrieren bei -80°C.

7 Literaturverzeichnis

- Aherne S. A., O'Brien N. M. (2002)** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18(1), 75-81.
- Amelsvoort J. M. M., Van Het Hof K. H. Mathot J. N. J. J., Mulder T. P. J., Wiersma A., Tijburg L. B. M. (2001)** Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica*, 13(12), 891-901.
- Appeldoorn M. M., Vincken J. P., Gruppen H., Hollman P. C. H. (2009)** Procyanidin Dimers A1, A2, and B2 Are Absorbed without Conjugation or Methylation from the Small Intestine of Rats. *The Journal of Nutrition*., 139, 1469-1473.
- Arts I. C., van de Putte B., Hollman P. C. (2000a)** Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem*. 48(5), 1746-1751.
- Arts I. C., van De Putte B., Hollman P. C. (2000b)** Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem*. 48(5), 1752-1757.
- Arts K., Hollman P., Mesquita H., Feskens E., Kromhout D. (2001)** Dietary catechins and epithelial cancer incidence: Zutphen Elderly Study. *Int. J. Cancer*. 92, 298-302.
- Balogun, E., Hoque M., Gong P., Killeen E., Green C. J., Foresti R., Lam J. A., Motterlini R. (2003)**. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J*. 371, 887-895.
- Barth S. W., Faehndrich C., Bub A., Watzl B., Will F., Dietrich H., Rechkemmer G., Briviba K. (2007)** Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *J Agric Food Chem*. 55(4), 1181-7.
- Barth S.W., Fährndrich C., Bub A., Dietrich H., Watzl B., Will F., Briviba K., Rechkemmer G.(2005)** Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis*. 26(8), 1414-21.
- Bausenwein J., Serke H., Eberle K., Hirrlinger J., Jogschies P., Hmeidan F. A., Blumenauer V., Spanel-Borowski K. (2009)** Elevated levels of oxidised low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women. *Mol Hum Reprod*.
- Baxter N. J., Lilley T. H., Haslam E., Williamson M. P. (1997)** Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry*. 36, 5566-5577.
- Bazley L. A., Gullick W. J. (2005)** The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer Suppl*. 1, S17-27.
- Belitz H. D. und Grosch W., Schieberle P. (2001)** Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Auflage, Springer Verlag.
- 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. *Mol Nutr Food Res*. 53(10), 1226-36.

- Berg** J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2003). Biochemie. 5 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Biesalski** H.-K. und Grimm P. (2007). Taschenatlas Ernährung. 3., erweiterte und aktualisierte Auflage, Verlag Thieme, Stuttgart.
- Binnig** R. (2001) Die Möglichkeiten der Verwertung, Nutzung und Entsorgung von Trester aus der Fruchtsaftherstellung. Ed. Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V., Bonn (VdF).
- Birus** T. (2001). Moderne Apfelsaft-Technologie-Das Fruchtsaft-Fachbuch für den Praktiker. Fachverlag Flüssiges Obst GmbH, Schönborn.
- Boadi** W. Y., Iyere P. A., Adunyah S. E. (2005) In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *J Appl Toxicol.* 25(1), 82-8.
- Bors** W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.* 186, 343-354.
- Bors** W., Michel C. (1999) Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: Pulse radiolysis studies. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1413-1426.
- Boyer** J., Brown D., Liu R. H. (2005) In vitro digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutrition Journal*, 4(1)
- Brabender** J., Danenberg K. D., Metzger R., Schneider P. M., Park J., Salonga D., Hölscher A. H., Danenberg P. V. (2001) Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res.* 7(7), 1850-5.
- Carle** R. und Schieber A. (2006) Gewinnung funktioneller Lebensmittelinhaltsstoffe aus Reststoffen der Karottensaft- und Apfelsaftproduktion. *Ernährungs-Umschau.* 53(9), 348-352.
- Carle** R., Keller P., Schieber A.; Rentschler C., Katzschner T., Rauch D., Fox G., Endress H.-U. (2001) Method for obtaining useful materials from the by-products of fruit and vegetable processing. WO. 01/78859.
- Carlsen** H., Myhrstad M.C., Thoresen M., Moskaug J.Ø., Blomhoff R. (2003) Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *J Nutr.* 133(7), 2137-40.
- Carpenter** G. (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem.* 56, 881-914.
- Chakravarti** A., Loeffler J. S., Dyson N. J. (2002) Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res.* 62(1), 200-7.
- Chen** J., Shaikh Z. A. (2009) Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*
- Chen** L., Lee M. J., Li H., Yang C. S. (1997) Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos.* 25, 1045-1050.
- Chen** R. H., Sarnecki C., Blenis J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* Mar. 12(3), 915-27.
- Chen** R. H., Sarnecki C., Blenis J. (1992) Nuclear Localization and Regulation of erk- and rsk-Encoded Protein Kinases. *Molecular and Cellular Biology.* 12(3).

- Chew** E.-H., Poobalasingam T., Hawkey C.J., Hagen T. (2007) Characterization of cullinbased E3 ubiquitin ligases in intact mammalian cells-Evidence for cullin dimerization. *Cellular Signalling*. 19, 1071-1080.
- Citri** A., Yarden Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(7), 505-16.
- Constantinou** A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A., Moon R. (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod*. 58(2), 217-25.
- Crespy** V., Aprikian O., Morand C., Besson C., Manach C., Demigne C., Remesy C. (2001b) Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J Nutr*. 131, 3227-30.
- Crespy** V., Morand C., Besson C., Manach C., Démigné C., Rémésy C. (2001a) Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*. 131(8), 2109-2114.
- Cullinan** S. B., Zhang, D., Hannink M., Arvais E., Kaufman R. J., Diehl J. A. (2003) Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent. *Cell Survival Molecular and Cellular Biology*. 23 (20), 7198-209.
- Cunningham** D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I., Van Cutsem E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 351(4), 337-45.
- Da Silva** E. L., Abdalla D. S., Terao J. (2000) Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. *IUBMB Life*. 49(4), 289-295.
- D'Archivio** M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 43(4), 348-361.
- Dawson** J. P., Berger M. B., Lin C. C., Schlessinger J., Lemmon M. A., Ferguson K. M. (2005) Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol*. 25(17), 7734-42.
- Day** A. J., Williamson G. (2001) Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr*. S105-S110.
- De Larco** J. E., Todaro G. J. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75(8), 4001-5.
- De Long** M. J., Prochaska H. J., Talalay P. (1985) Tissue-specific Induction Patterns of Cancer-protective Enzymes in Mice by tert-Butyl-4-hydroxyanisole and Related Substituted Phenols. *Cancer Research*. 45, 546-551.
- Déprez** S., Brezillon C., Rabot S., Philippe C., Mila I., Lapierre C., Scalbert A. (2000) Polymeric proanthocyanidins are catabolized by a human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids. *J Nutr*. 130, 2733-8.
- Déprez** S., Mila I, Huneau J. F., Tome D., Scalbert A. (2001) Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal*. 3(6), 957-67.
- DeYulia** G. J. Jr., Cárcamo J. M. (2005) EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases. *Biochem Biophys Res Commun*. 334(1), 38-42.

- Dickinson** D. A., Levenon A. L., Moellering D. R., Arnold E. K., Zhang H., Darley-USmar V. M., Forman H. J. (2004) Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med.* 37(8), 1152-9.
- Dinkova-Kostova** A. T., Holtzclaw W. D., Cole R. N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M., Talalay P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1. Diplomarbeit Elena Maser, Universität Karlsruhe, 2009
Diplomarbeit Julia Reichert, Universität Karlsruhe, 2007
Diplomarbeit Nadine Volz, Universität Karlsruhe, 2007
Dissertation Diana Fridrich, Universität Karlsruhe, 2008
Dissertation Melanie Kern, Universität Kaiserslautern 2006
Dissertation Sandra Schäfer, Universität Kaiserslautern, 2006
Dissertation Ute Böttler, Universität Wien, 2009
Dissertation Wolfgang Hümmer, Universität Würzburg, 2009
- Dixon** R. A., Xie D. Y., Sharma S. B. (2005) Proanthocyanidins- a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165(1), 9-28.
- Djahansouzi** S., Hanstein B., Bender H., Dall G. (2004) Wachstumsfördernde Signalübertragungswege. Rezeptorblockaden als Therapieprinzip. *Gynäkologie*, 37, 215-220.
- Durling** L. J., Busk L., Hellman B. E. (2009) Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food Chem Toxicol.*
- Earp** H. S. 3rd, Calvo B. F., Sartor C. I. (2003) The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 114, 315-33.
- Ebermann** R. und Elmadfa I. (2008) Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. 1. Auflage, Springer Verlag, Wien, New York.
- Eggler** A. L., Gay K. A., Mesecar A. D. (2008) Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: Induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res*, 52, 84-94.
- Eisenbrand** G. und Metzler M. (2002) Toxikologie, 2. Auflage, Wiley-VCH-Verlag.
- Evans** P., Halliwell B. (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition.* 85(2), 67-74.
- Faaland** C. A., Mermelstein F. H., Hayashi J., Laskin J. D. (1991) Rapid uptake of tyrphostin into A431 human epidermoid cells is followed by delayed inhibition of epidermal growth factor (EGF)-stimulated EGF receptor tyrosine kinase activity. *1: Mol Cell Biol.* 11(5), 2697-703.
- Faria** A., Calhau C., de Freitas V., Mateus N. (2006) Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J Agric Food Chem.* 54(6), 2392-7.
- Faria** A., Mateus N., de Freitas V., Calhau C. (2006) Modulation of MPP⁺ uptake by procyanidins in Caco-2 cells: involvement of oxidation/reduction reactions. *FEBS Lett.* 580(1), 155-60.
- Feng** R., Lu Y., Bowman LL, Qian Y., Castranova V., Ding M. (2005) Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem.* 280(30), 27888-95.

- Feskanich D.**, Ziegler R., Michaud D., Giovannucci E., Speizer F., Willett W., Colditz G. (2000) Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1812-1823.
- Fraga C. G.** (2007) Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life.* 59(4-5), 308-15.
- Fridrich D.**, Teller N., Esselen M., Pahlke G. und Marko D. (2008) Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol.Nutr. Food Res.* 52, 815-822.
- Fridrich D.**, Kern M., Fritz J., Pahlke G., Köhler N., Winterhalter P., Marko D. (2007) The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Mol Nutr Food Res.* 51(2), 192-200. **B**
- Fridrich D.**, Kern M., Pahlke G., Volz N., Will F., Dietrich H., Marko D. (2007) Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 51(5), 594-601. **A**
- Fuller S. J.**, Sivarajah K., Sugden P. H. (2008) ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 44(5), 831-54.
- Garcia de Palazzo I.E.**, Adams G. P., Sundareshan P., Wong A. J., Testa J. R., Bigner D. D., Weiner L. M. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 53(14), 3217-20.
- Garrett T. P.**, McKern N. M., Lou M., Elleman T. C., Adams T. E., Lovrecz G. O., Zhu H. J., Walker F., Frenkel M. J., Hoyne P. A., Jorissen R. N., Nice E. C., Burgess A. W., Ward C. W. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell.* 110(6), 763-73.
- Giudice A.** und Montella M. (2006) Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *BioEssays.* 28, 169–181.
- Gonthier M. P.**, Donovan J. L., Texier O., Felgines C., Remesy C., Scalbert A. (2003) Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med.* 35(8), 837-44.
- Gossé F.**, Guyot S., Roussi S., Lobstein A., Fischer B., Seiler N., Raul F. (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 26(7), 1291-5.
- Gossé F.**, Guyot S., Roussi S., Lobstein A., Fischer B., Seiler N., Raul F. (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 26, 1291-1295.
- Griffith O. W.** (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem.* 257(22), 13704-12.
- Gu L.**, Kelm M. A., Hammerstone J. F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R.L. (2004) Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr.* 134(3), 613-7.
- Guyot S.**, Le Bourvellec C., Marnet N., Drilleau J. F. (2002) Procyanidins are the most Abundant Polyphenols in Dessert Apples at Maturity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35, 289-291.

- Habermeyer M., Fritz J., Barthelmes H. U., Christensen M. O., Larsen M. K., Boege F., Marko D., (2005)** Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem Res Toxicol.* 18(9), 1395-404.
- Hahn A., Ströhle A., Wolters M. (2006)** Ernährung: Physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Haigler H., Ash J.F., Singer S. J., Cohen S. (1978)** Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(7), 3317-21.
- Half E., Broaddus R., Danenberg K. D., Danenberg P. V., Ayers G. D., Sinicrope F. A. (2004)** HER-2 receptor expression, localization, and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer.* 108(4), 540-8.
- Hall A. G. (1999)** Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. 1: *Eur J Clin Invest.* 29(3), 238-45.
- Halliwell B. (2003)** Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 540(1-3), 3-6.
- Halliwell B. (2006)** Reaktive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology.* 141, 312-322.
- Halliwell B. (2008)** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys.* 15;476(2), 107-12.
- Halliwell B. und Aruoma O.I. (1991)** DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett.* 281(1-2), 9-19.
- Halliwell B. und Cuttidge J. M. C. (1990)** The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 280(1), 1-8.
- Halliwell B. und Gutteridge J. M. C. (1999).** Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed., *Oxford University Press.*
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000)** The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1), 57-70.
- Hänsel R. und Sticher O. (2007)** Pharmakognosie-Phytopharmazie. 8., überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Harborne J.B, Williamson C.A. (2000)** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55, 481-505.
- Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. (2003)** EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 284(1), 2-13.
- Hashimoto K., Takasaki W., Yamoto T., Manabe S., Sato I., Tsuda S. (2008)** Effect of glutathione (GSH) depletion on DNA damage and blood chemistry in aged and young rats. *J Toxicol Sci.* 33(4), 421-9.
- Henderson C. J., Sahraoui A., Wolf C. R. (2000)** Cytochrome P450s and chemoprevention. *Biochem Soc Trans.* 28, 42-46.
- Hertog M. G, Feskens E. J, Hollman P. C, Katan M. B, Kromhout D. (1993)** Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer.* 22(2), 175-184.
- Higashiyama S., Iwabuki H., Morimoto C., Hieda M., Inoue H., Matsushita N. (2008)** Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci.* 99(2), 214-20.

- Hilger R. A., Scheulen M. E., Strumberg D. (2002)** The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*. 25(6), 511-8.
- Hollman P., Katan M. B. (1997)** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*. 51, 305-310.
- Hollman P. C., de Vries J. H., van Leeuwen S. D., Mengelers M. J., Katan M. B. (1995)** Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 62, 1276-1282.
- Hollman P. C., Katan M. B. (1999)** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*. 37(9-10), 937-942.
- Hollman P. C., Katan M. B. (1999)** Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res*. S75-80.
- Huang H. C., Nguyen T., Pickett C. B. (2002)** Phosphorylation of Nrf2 at ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (45), 42769-74.
- Huang H. S., Nagane M., Klingbeil C. K., Lin H., Nishikawa R., Ji X. D., Huang C. M., Gill G. N., Wiley H. S., Cavenee W. K. (1997)** The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*. 272(5), 2927-35.
- Huemmer W., Dietrich H., Will F., Schreier P., Richling E. (2008)** Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnol J*. 3(2), 234-43.
- Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y. (1997)** An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 236(2), 313-22.
- Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J. D., Yamamoto M. (1999)** Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*. 13, 76-86.
- Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., O'Connor T., Yamamoto M. (2003)** Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells*. 8, 379-91.
- Jain A. K., Bloom D. A., Jaiswal A. K. (2005)** Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *The Journal of biological chemistry*. 280(32), 29158-68.
- Jain A. K., Jaiswal A. K. (2006)** Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(17), 12132-12142.
- Jiang B., Lyles J. T., Reynertson K. A., Kronenberg F., Kennelly E. J. (2008)** Stability evaluation of selected polyphenols and triterpene glycosides in black cohosh. *J Agric Food Chem*. 56(20), 9510-9.
- Jorissen R. N., Walker F., Pouliot N., Garrett T. P., Ward C. W., Burgess A. W. (2003)** Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 284(1), 31-53.

- Jura N.**, Endres N. F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M. H., Wemmer D. E., Zhang X., Kuriyan J. (2009) Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*. 137(7), 1293-307.
- Kahle K.**, Huemmer W., Kempf M., Scheppach W., Erk T., Richling E. (2007) Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J Agric Food Chem*. 55(26), 10605-14.
- Kahle K.**, Kraus M., Richling E. (2005) Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res*. 49(8), 797-806.
- Kahle K.**, Kraus M., Scheppach W., Richling E. (2005) Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Mol Nutr Food Res*. 49(12), 1143-50. **B**
- Kang M. I.**, Kobayashi A., Wakabayashi N., Kim S.G., Yamamoto M. (2004) Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *PNAS*. (7), 2046-51.
- Kern M.**, Fridrich D., Reichert J., Skrbek S., Nussler 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. *Mol Nutr Food Res*. 51(9), 1163-72.
- Kern M.**, Tjaden Z., Ngiewih Y., Puppel N., Will F., Dietrich H., Pahlke G., Marko D. (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res*. 49(4), 317-28. **A**
- Kleihues P.**, Louis D. N., Scheithauer B. W., Rorke L. B., Reifenberger G., Burger P. C., Cavenee W. K. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 61(3), 215-25.
- Kluth D.**, Banning A., Paur I., Blomhoff R., Brigelius-Flohé R. (2007) Modulation of pregnane X receptor- and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. *Free Radic Biol Med*. 42(3), 315-25.
- Knekt P.**, Jarvinen R., Reunanen A., Maatela J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 312(7029), 478-481.
- Knekt P.**, Jarvinen R., Seppanen R., Heliövara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol*. 146, 223-230.
- Knekt P.**, Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 76(3), 560-568.
- Kobayashi M.**, Yamamoto M. (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advan. Enzyme Regul.* 46, 113-140.
- Koehle C.** und Bock K. W. (2006) Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochemical pharmacology*. 72, 795-805.
- Kuhnle G.**, Spencer J. P. E., Schroeter H., Shenoy B., Debnam E. S., Srail S. K. S., Rios-Evans C., Hahn U. (2000) Epicatechin and Catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 277, 507-512.

- Lapidot T.**, Walker M. D., Kanner J. (2002) Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem.* 50(11), 3156-60.
- Lavoie S.**, Chen Y., Dalton T. P., Gysin R., Cuénod M., Steullet P., Do K. Q. (2009) Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem.* 108(6), 1410-22.
- Lee J. M.**, Johnson J. A. (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 37, 139-143.
- Lee J. M.**, Li J., Johnson D., Stein T., Kraft A., Calkins M., Jakel R., Johnson J. (2005) Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J.* 19, 1061-1066.
- Lee J. S.** und Surh Y. J. (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* 224, 171-184.
- Levitzki A.** (1999) Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 82(2-3), 231-9.
- Levitzki A.**, Gazit A. (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 267(5205), 1782-8.
- Liang Y. C.**, Lin-shiau S. Y., Chen C. F., Lin J. K. (1997) Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 67(1), 55-65.
- Long L.**, Clement M., Halliwell B. (2002) 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.
- Lu S. C.** (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 30(1-2), 42-59.
- Lu, S. C.** (2008) Review Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine.*
- Mamot C.**, Rochlitz C. F. (2005) Iressa, Tarceva und Eributux-Medikamente einer neuen Generation. *Schweiz Med. Forum.* 5, 475-479.
- Mamot C.**, Drummond D. C., Greiser U., Hong K., Kirpotin D. B., Marks J. D., Park J. W. (2003) Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 63(12), 3154-61.
- Manach C.**, Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L. (2004) Polyphenols: food source and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 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. *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl), 230S-242S.
- Marengo B.**, De Ciucis C., Verzola D., Pistoia V., Raffaghello L., Patriarca S., Balbis E., Traverso N., Cottalasso D., Pronzato M. A., Marinari U. M., Domenicotti C. (2008) Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med.* 44(3), 474-82.
- Marks S. C.**, Mullen W., Borges G., Crozier A. (2009) Absorption, Metabolism, and Excretion of Cider Dihydrochalcones in Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *J Agric Food Chem.*

- Marnett** L. J., Riggins J. N., West J. D. (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest.* 111(5), 583-93.
- Masella** R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 16(10), 577-86.
- McMahon** M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. (2003) Keap1-dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-driven Gene Expression Cell Survival. *Molecular and cellular biology.* 23 (20), 7198-7209.
- McMahon** M., Thomas N., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J. D. (2004) Turnover of Nrf2 Is Determined by at Least Two Separate Protein Domains, the Redox-sensitive Neh2 Degron and the Redox-insensitive Neh6 Degron. *The Journal of Biological Chemistry.* 279(30), 31556–31567.
- McMahon** M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. (2004). Redox-regulated
- Meng** X., Sang S., Zhu N., Lu H., Sheng S., Lee MJ, Ho CT, Yang CS.(2002) Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem Res Toxicol.* 15, 1042–1050.
- Merlino** GT, Ishii S., Whang-Peng J., Knutsen T., Xu YH, Clark AJ, Stratton RH, Wilson RK, Ma DP, Roe BA, et al. (1985) Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNAs from A431 human carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 5(7), 1722-34.
- Monteiro** R., Calhau C., Martel F., Faria A., Mateus N., Azevedo I. (2005) Modulation of MPP+ uptake by tea and some of its components in Caco-2 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 372(2), 147-52. **B**
- Monteiro** R., Calhau C., Martel F., Guedes de Pinho P., Azevedo I. (2005) Intestinal uptake of MPP+ is differently affected by red and white wine. *Life Sci.* 76(21), 2483-96. **A**
- Moodie** S. A., Wolfman A. (1994) The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 10(2), 44-8.
- Moon** J. H., Nakata R., Oshima S., Inakuma T., Terao J. (2000) Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279, 461-467.
- Moon** J. H., Tsushida T., Nakahara K., Terao J. (2001) Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med.* 30(11), 1274-1285.
- Moskaug** J. Ø., Carlsen H., Myhrstad M. C., Blomhoff R. (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl), 277S-283S.
- Mullen** W., Edwards C. A, Crozier A. (2006) Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr.* 96, 107-116.
- Na** H.-K. and Surh, Y.-J. (2008) Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology.* 46, 1271-1278.
- Nair** P. (2005) Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. *Current Science*, vol. 88, no. 6.

- Natsume M.**, Osakabe N., Oyama M., Sasaki M., Baba S., Nakamura Y., Osawa T., Terao J. (2003) Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med.* 34, 840-849.
- Nautiyal J.**, Rishi A. K., Majumdar A. P. (2006) Emerging therapies in gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol.* 12(46), 7440-50.
- Nelson D. L.** & Cox M. M. (2001) *Lehninger Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Neuwirt H.**, Arias M. C., Puhf M., Hobisch A., Culig Z. (2008) Oligomeric proanthocyanidin complexes (OPC) exert anti-proliferative and pro-apoptotic effects on prostate cancer cells. *Prostate.* 68(15), 1647-54.
- Nguyen T.**, Sherratt, P. J., Pickett, C. B. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43, 233-260.
- Ogiso H.**, Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J. H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Yokoyama S. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* 110(6), 775-87.
- Olayioye M. A.**, Neve R. M., Lane H. A., Hynes N. E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19(13), 3159-67.
- Oshero N.**, Levitzki A. (1994) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem.* 225(3), 1047-53.
- Oshero N.**, Gazit A. Gilon C., Levitzki A. (1993) Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrphostins. *J Biol Chem.* 268(15), 11134-42.
- Paz-Elizur T.**, Sevilya Z., Leitner-Dagan Y., Elinger D., Roisman L., Livneh Z. (2008) DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis. *Cancer Lett.* 266(1), 60-72.
- Peters H. D.** (2003) Neue Substanzen und neue Wirkprinzipien in der Onkologie. *Der Onkologe.* 9, 1058-1087.
- Pinkas-Kramarski R.**, Shelly M., Guarino B. C., Wang L. M., Lyass L., Alroy I., Alimandi M., Kuo A., Moyer J. D., Lavi S., Eisenstein M., Ratzkin B. J., Seger R., Bacus S. S., Pierce J. H., Andrews G. C., Yarden Y. (1998) ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol.* 18(10), 6090-101.
- Pinkas-Kramarski R.**, Soussan L., Waterman H., Levkowitz G., Alroy I., Klapper L., Lavi S., Seger R., Ratzkin B, Sela M., Yarden Y. (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15(10), 2452-67.
- Pinkus R.**, Weiner L. M., Daniel V. (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem.* 271(23), 13422-9.
- Prenzel N.**, Fischer O. M., Streit S., Hart S., Ullrich A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer.* 8(1), 11-31.
- Ramos S.** (2008) Review Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (5), 507-26.
- Reboul E.**, Thap S., Tourniaire F., André M., Juhel C., Morange S., Amiot M. J., Lairon D., Borel P. (2007) Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Br J Nutr.* 97(3), 440-6.

- Remacle J.**, Raes M., Toussaint O., Renard P., Rao G. (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res.* 316(3), 103-22.
- Rice-Evans C. A.**, Miller N. J., Paganga. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Rios L. Y.**, Gonthier M. P., Rémésy C., Mila I., Lapierre C., Lazarus S. A., Williamson G., Scalbert A. (2003) Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr.* 77(4), 912-8.
- Rodgers E. H.**, Grant M. H. (1998) The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 116(3), 213-28.
- Rodriguez-Proteau R.**, Mata J. E., Miranda C. L., Fan Y., Brown J. J., Buhler D. R. (2006) Plant polyphenols and multidrug resistance: effects of dietary flavonoids on drug transporters in Caco-2 and MDCKII-MDR1 cell transport models. *Xenobiotica.* 36(1), 41-58.
- Roux P. P.**, Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2), 320-44.
- Scalbert A.**, Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S.
- Schaefer S.**, Baum M., Eisenbrand G., Dietrich H., Will F., Janzowski C. (2006) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 50(1), 24-33. **B**
- Schaefer S.**, Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C. (2006) Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 50(4-5), 413-7. **A**
- Schaeffer H. J.**, Weber M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 19(4), 2435-44.
- Schieber A.**, Hilt, P., Streker P., Endreß, H.-U. (2003) A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 4, 99-107.
- Schieber A.**, Keller, P., Carle, R. (2001) Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 910(2), 265-273.
- Schlessinger J.** (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103(2), 211-25.
- Schulze W. X.**, Deng L., Mann M. (2007) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol.* 1, 2005.0008.
- Sebastian S.**, Settleman J., Reshkin S. J., Azzariti A., Bellizzi A., Paradiso A. (2006) The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta.* 1766(1), 120-39.
- Sembries S.**, Dongowski, G., Mehrländer, K., Will, F., Dietrich, H. (2006) Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomaces in rats. *J. Agric. Food Chem.* 54, 10269-10280.

- Shepherd** A. G., Manson, M. M., Ball, H. W., McLellan, L. I. (2000) Regulation of rat glutamatecysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) subunits by chemopreventive agents and in aflatoxin B(1)-induced preneoplasia. *Carcinogenesis*. 21(10), 1827-1834.
- Skehan** P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren JT, Bokesch H., Kenney S., Boyd MR. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82(13), 1107-12.
- Spencer** J. P., Schroeter H., Rechner A. R., Rice-Evans C. (2001) Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*. 3(6), 1023-1039.
- Stamos** J., Sliwkowski M. X., Eigenbrot C. (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem*. 277(48), 46265-72.
- Steeghs** N., Nortier J. W., Gelderblom H. (2007) Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments. *Ann Surg Oncol*. 14(2), 942-53.
- Steinbach** J. P., Eisenmann C., Klumpp A., Weller M. (2004) Co-inhibition of epidermal growth factor receptor and type 1 insulin-like growth factor receptor synergistically sensitizes human malignant glioma cells to CD95L-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 321(3), 524-30.
- Sun** J. S., Tsuang, Y. H., Huang, W. C., Chen, L. T., Hang, Y. S., Lu, F. J. (1997) Menadione induced cytotoxicity to rat osteoblasts. *Cell Mol Life Sci*. 53, 967-976.
- Suzuki** K., Yahara S., Hashimoto F., Uyeda M. (2001) Inhibitory activities of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate against topoisomerases I and II. *Biol Pharm Bull*. 24(9), 1088-90.
- Tanigawa** S., Fujii M., Hou D. X. (2007) Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med*. 42(11), 1690-703.
- Tatum** J. H., Shaw P. E., Berry, R. E. (1996) Degradation Products from Ascorbic Acid. (Winter Haven, Fruit and Vegetable Products Lab.) *J. Agric. Food Chem*. 17, 38-40.
- Thiel** G., Rössler O. (2005) Signaltransduktion: Rezeptortyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden. *Biologie unserer Zeit*. 5, 312-319.
- Tietze** F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total an oxidized glutathion: Application to mammalian blood and other tissues, *Anal Biochem*. 27(3), 502-22.
- Touriño** S., Selga A., Jiménez A., Juliá L., Lozano C., Lizárraga D., Cascante M., Torres J. L. (2005) Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J Agric Food Chem*. 53(12), 4728-35.
- Toyokuni** S., Akatsuka S. (2007) Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathol Int*. 57(8), 461-73.
- Toyokuni** S. und Akatsuka S. (2007) Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathology International*. 57, 461-473.
- Valko** M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160, 1-40.

- Veeriah S., Hofmann T., Glei M., Dietrich H., Will F., Schreier P., Knaup B., Pool-Zobel B. L. (2007)** Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). 1: *J Agric Food Chem.* 55(8), 2892-900.
- Veeriah S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., et al. (2006)** Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinog.* 45, 164-174.
- Velichkova M. und Hasson, T. (2005)** Keap1 Regulates the Oxidation-Sensitive Shuttling of Nrf2 into and out of the Nucleus via a Crm1-Dependent Nuclear Export Mechanism. *Molecular and Cellular Biology.* 25 (11), 4501-13.
- Wagner H. (1999)** Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart, 6.Auflage.
- Wakabayashi N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Holzclaw, W. D.; Kang, M. I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Talalay, P. (2004)** Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *PNAS.* 101(7), 2040-5.
- Walgren R. A., Karnaky K. J. Jr., Lindenmayer G. E., Walle T. (2000)** Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(3), 830-836.
- Wang J. C. (1996)** DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 65, 635-92.
- Wang Y., Prywes R. (2000)** Activation of the c-fos enhancer by the erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and p62TCF sites. *Oncogene.* 19(11), 1379-85.
- Watzl B., Rechkemmer G. (2001)** Phenolsäuren, *Ernährungs-Umschau*, 48, Heft 10, 413-415.
- Wells A. (1999)** EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(6), 637-43.
- Wieduwilt M. J., Moasser M. M. (2008)** The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 65(10), 1566-84.
- Wild A. C. und Mulcahy, R. T. (2000)** *Free Radic.Res.* 32, 281-301.
- Wilkinson M. G., Millar J. B. (2000)** Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J.* 14(14), 2147-57.
- Willcox J. K., Ash S. L., Catignani G. L. (2004)** Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 44(4), 275-95.
- Wolfe K., Wu, X., Liu, R. H. (2003)** Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.* 51, 609-14.
- Wosikowski K., Schuurhuis D., Kops G. J., Saceda M., Bates S. E. (1997)** Altered gene expression in drug-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 3(12 Pt 1), 2405-14.
- Wu X., Fan Z., Masui H., Rosen N., Mendelsohn J. (1995)** Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest.* 95(4), 1897-905.
- Yang C. S., Hong J., Hou Z., Sang S. (2004)** Green tea polyphenols: antioxidative and prooxidative effects. *J Nutr.* 134(11), 3181S.
- Yarden Y., Sliwkowski M. X. (2001)** Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2), 127-37.

- Ye X.**, Krohn R. L., Liu W., Joshi S. S., Kuszynski C. A., McGinn T. R., Bagchi M., Preuss H. G., Stohs S. J., Bagchi D. (1999) The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 196(1-2), 99-108.
- Yu R.**, Tan T. H., Kong A. N. (1997) Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *J Biol Chem.* 272(46), 28962-70.
- Zessner H.**, Pan L., Will F., Klimo K., Knauft J., Niewöhner R., Hümmer W., Owen R., Richling E., Frank N., Schreier P., Becker H., Gerhauser C. (2008) Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Mol Nutr Food Res.* 52 Suppl 1, S28-44.
- Zhang D. D.**, Lo, S. C., Cross, J. V., Templeton, D. J., Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Molecular and Cellular Biology.* 24(24), 10941-10953.
- Zhang D. D.**, Hannink M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 23(22), 8137-51.
- Zhang X.**, Gureasko J., Shen K., Cole P. A., Kuriyan J. (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 125(6), 1137-49.
- Zhang X.**, Pickin K. A., Bose R., Jura N., Cole P. A., Kuriyan J. (2007) Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature.* 450(7170), 741-4.
- Zhou A.**, Sadik O. A. (2008) Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study. *J Agric Food Chem.* 56(24), 12081-91.
- Zhu Q. Y.**, Holt R. R., Lazarus S. A., Ensunsa J. L., Hammerstone J. F., Schmitz H. H., Keen C. L.. (2002) Stability of the flavon-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1700-1705.
- Zipper L. M.** und Mulcahy, R. T. (2002) The Keap1 BTB/POZ Dimerization Function Is Required to Sequester Nrf2 in Cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry,* 277(39), 36544-52.

8 Anhang

- Formelverzeichnis
- Publikationen
- Lebenslauf
- Danksagung
- Epilog

Formelverzeichnis

Lineare Regression: $y = A + B \cdot x$ nach Origin 6.0 mit Messpunkten (x/y):

y-Achseabschnitt (A):

$$A = \frac{\left(\sum_i y_i \right) \left(\sum_i x_i^2 \right) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i (x_i \cdot y_i) \right)}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n \sum_i (x_i \cdot y_i) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i y_i \right)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i \right)^2$$

Fehler der Steigung (m_B):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnittes (m_A):

$$m_A = \sqrt{\frac{S \sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

IC₅₀-Wert:

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

Fehler des IC₅₀-Wertes (m_{IC50}):

$$m_{IC50} = \sqrt{\left(-\frac{1}{B}\right)^2 \cdot (m_A)^2 + \left(\frac{A-50}{B^2}\right)^2 \cdot (m_B)^2}$$

Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung (σ_{n-1}):

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

Ausreißertest nach Nalimov (r):

$$r = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\sigma_{n-1}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Publikationen:

Veröffentlichungen:

Fritz J., **Roth M.**, Holbach P., Esselen M., Marko D. (2008), Impact of delphinidin on the maintenance of DNA integrity in human colon carcinoma cells. Journal of agricultural and food chemistry, 56, 8891-8896.

Roth M., Teller N., Volz N., Blust V., Thiele W., Sleeman J., Pahlke G., Esselen M., Marko D. Impact of apple polyphenols on receptor tyrosine kinase signalling. (in Bearbeitung)

Roth M., Maser E., Blust V. Fehr M., Fromm M., Kammerer D., Carle, R. Marko D. Protective properties of apple extracts against menadione-induced oxidative stress and genotoxicity in human colon carcinoma cells. (in Bearbeitung)

Tagungsbeiträge

Roth M., Fritz J., Marko D. Lack of antioxidative effectiveness of delphinidin in cell culture. Posterbeitrag, 1. International Symposium on Nutrition and Intestinal Health (NutIntest), 28. Februar – 1. März 2007, Universität Kaiserslautern.

Roth M., Fritz J., Marko D. Lack of antioxidative effectiveness of delphinidin in cell culture. Posterbeitrag, Baden Württemberger Toxikologen Treffen (BW-ToxNet), 10. Juli 2007, Forschungszentrum Karlsruhe.

Roth M., Volz N., Marko D. Apfelextrakte als Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors: Tafelapfel kontra Mostapfel. Posterbeitrag, Jahrestagung 2008 des Regionalverbandes Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in der GDCh, 3. – 4. März 2008, Universität Hohenheim

Roth M., Volz N., Marko D. Apfelextrakte als Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors: Tafelapfel kontra Mostapfel. Posterbeitrag, 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 8.-10. September 2008, Universität Kaiserslautern.

Lebenslauf und bisheriger Bildungsgang

Matthias Roth

Diplom-Lebensmittelchemiker

* 2. September 1978 in Heilbronn

Schule

1985 - 1998

Freie Walldorfschule Heilbronn, abgeschlossen mit der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

Nov 1998 – Okt 1999

Zivildienst in Heilbronn im Bereich häusliche Altenpflege beim Paritätischen Wohlfahrtsverband

Studium

Okt 1999 – Apr 2006

Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe, abgeschlossen mit Diplom. Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung zur oxidativen/antioxidativen Wirkung von Anthocyanidinen und zur Beeinflussung der Tubulinpolymerisation“

Mai - Juli 2006

Wissenschaftlicher Hilfsmitarbeiter im Arbeitskreis von Prof. Dr. D. Marko

seit Aug 2006

Promotion am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe, Arbeitskreis von Prof. Dr. D. Marko.
Fachtoxikologische Weiterbildung bei der Deutschen Gesellschaft für Toxikologie.

Danksagung

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

Frau Prof. Dr. Doris Marko für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Gudrun und Melanie, deren wissenschaftliche Unterstützung zu wichtigen Ideen und Erkenntnissen beigetragen haben.

Melanie und Costa für die Durchsicht des Manuskripts.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Lebensmittelchemie / -toxikologie.

Allen Partnern des BMBF-Netzwerkes, „Ernährung und Darmgesundheit“, sowie allen Beteiligten am AiF-Projekt 15617N für die freundliche und kooperative Zusammenarbeit.

Meinen Diplomanden Elena Maser und Verena Eschbach.

Meiner Familie, die mich während dieser Zeit immer unterstützt hat.

Epilog

„Wer Vollkommenheit anvisiert, merkt bald, dass sie ein bewegliches Ziel ist“

[J.W. von Goethe]

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

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

Karlsruhe, 10. Januar 2010

Unterschrift: _____

