

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Campus Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Einfluss des Flavonoids Quercetin auf den mTOR-Signalweg von  
Zervix- und Mammakarzinomzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Anja Kathrin Klappan  
aus  
Bamberg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann  
Priv. Doz. Dr. Christian Schindlbeck

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. A. Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2014

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Übersicht	7
1.2	Der Naturstoff Quercetin	8
1.3	Chemische Eigenschaften und natürliches Vorkommen von Quercetin	9
1.4	Medizinische Wirkungsweisen und klinischer Nutzen von Quercetin	11
1.5	Quercetin zur Prävention und Therapie von Krebs	12
1.6	Der mTOR-Signalweg	14
1.6.1	Begriffserklärung und Funktion	14
1.6.2	Die Regulierung des mTORC1-Signalweges und dessen Effekte	16
1.6.3	Die Rolle von mTOR bei Krebs	20
1.6.4	mTOR-Inhibitoren und deren Rolle in der modernen Krebstherapie	22
1.6.5	Die Beziehung von mTOR und Autophagie	24
1.7	Fragestellung	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	28
2.2	Chemikalien und Biochemikalien	30
2.3	Verwendete Puffer	31
2.4	Medikamente	32
2.5	Zellfarbstoffe für Fluoreszenzuntersuchungen	32
2.6	Antikörper	33
2.6.1	Verwendete Antikörper für den Western-Blot	33
2.6.2	Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz	34

<b>2.7 Zellkultur und Zelllinien</b> .....	<b>34</b>
2.7.1 Verwendete Zelllinien .....	34
2.7.2 Zellkultur .....	35
2.7.3 Kryokonservierung der Zelllinien .....	35
<b>2.8 MTT-Assay</b> .....	<b>36</b>
<b>2.9 Phasenkontrastuntersuchungen und Zellfärbung</b> .....	<b>37</b>
<b>2.10 Western-Blot-Analyse</b> .....	<b>38</b>
2.10.1 Methodik zur Herstellung der Zellysate .....	38
2.10.2 Methodik der Gelelektrophorese .....	38
2.10.3 Methodik des Western-Blots.....	39
<b>2.11 Immunfluoreszenzanalysen</b> .....	<b>41</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
3.1 Wachstumshemmung von Tumorzellen durch Quercetin .....	42
3.2 Zellmorphologische Veränderungen durch Quercetin.....	45
3.3 Induktion von Autophagie durch Quercetin.....	47
3.4 Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin in Tumorzellen.....	51
3.5 Bildung von Aggresomen durch Quercetin in MCF7-Tumorzellen .....	56
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>58</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>80</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>82</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>84</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>10</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>85</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Übersicht

Krebs zählt mit 7,6 Millionen Toten im Jahre 2008 zu den Haupttodesursachen weltweit (WHO, 2012). 1,6 Millionen Neuerkrankungen und ca. 580.000 Tote durch Krebserkrankungen wurden im Jahre 2012 alleine in den Vereinigten Staaten von Amerika erwartet (Siegel et al., 2012). Aus Pflanzen gewonnene Stoffe spielen als Chemotherapeutika in der Therapie von Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Zu diesen gehören zum Beispiel Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Docetaxel, Etoposid und Teniposid (Herold, 2010).

Der Naturstoff Quercetin, ein Bioflavonoid, ist seit langem bekannt für seine antitumorale Wirkungsweise. Die genauen Mechanismen, die hinter dieser Wirkungsweise stecken, blieben lange unklar. In der vorliegenden Arbeit konnte wissenschaftlich belegt werden, dass die Inkubation der epithelialen Tumorzelllinien HeLa und MCF7 mit Quercetin eine starke Vakuolenbildung induzierte, die schließlich zur Apoptose der Tumorzellen führte. Diese Vakuolen konnten durch Fluoreszenzfarbstoffe als Autolysosomen identifiziert werden, welche im Prozess der Autophagie vorkommen. Bevor es zur Auslösung von Autophagie in den mit Quercetin behandelten Tumorzellen kam, zeigte sich auf molekularer Ebene eine Inhibition des Autophagie-kontrollierenden mTOR-Signalweges. Dabei kam es zu einer Reduktion der Phosphorylierung der mTOR-Substrate 4E-BP1 und p70S6-Kinase, zwei wichtige Faktoren für die Initiation der Translation.

Da der mTOR-Signalweg für das Zellwachstum und die Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt, werden mTOR-Inhibitoren immer häufiger in der modernen Krebstherapie eingesetzt. Damit könnte Quercetin als potentieller mTOR-Inhibitor bei Tumorerkrankungen in Zukunft an Bedeutung gewinnen.

## 1.2 Der Naturstoff Quercetin

Der Name Quercetin kommt vom lateinischen Wort quercus, was Eiche bedeutet. Dies resultiert daher, dass Quercetin ursprünglich insbesondere in Rotweinen gefunden wurde, die längere Zeit in Eichenfässern lagerten. Dieses Polyphenol gehört zur Klasse der Flavonoide, die ubiquitär in vielen Pflanzen und pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen (Lamson and Brignall, 2000, Croft, 1998). Flavonoide lassen sich in sechs Subklassen einteilen. Zu diesen gehören Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanole, Anthocyane und Isoflavonoide (siehe Tabelle 1). Quercetin gehört zur Subklasse der Flavonole zu welcher z.B. auch Kämpferol und Myricetin gezählt werden (Kelly, 2011, Watzl and Rechkemmer, 2001)

Subklassen der Flavonoide	Ausgewählte Beispiele
Flavone	Apigenin, Luteolin
Flavonole	Quercetin, Kämpferol, Myricetin
Flavanone	Naringenin, Hesperidin
Flavanole	Catechin, Epicatechingallat
Anthocyane	Malvidin, Cyanidin
Isoflavonoide	Genistein, Daidzein

**Tabelle 1: Die Flavonoide und ihre Subklassen mit Beispielen. Quelle (Kelly, 2011)**

Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die man als Farbstoffe in vielen Pflanzenbestandteilen findet, jedoch dienen sie diesen auch zum Wachstum und zur Entwicklung, zum Schutz vor Umwelteinflüssen und als Antioxidantien (Hirpara et al., 2009). Ähnlich wie dem Vitamin C werden den Flavonoiden schon lange ein



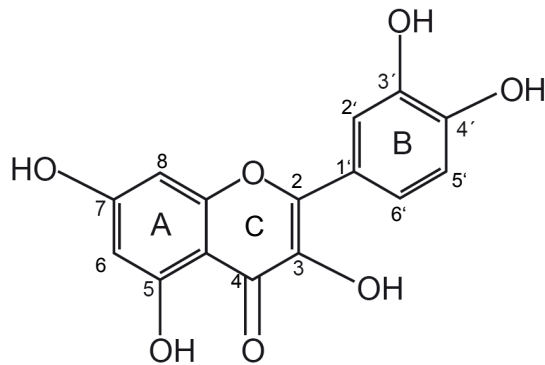
für den Menschen gesundheitlicher Nutzen zugeschrieben (Bischoff, 2008, Hirpara et al., 2009).

Unter den Flavonoiden zählt Quercetin zu dem weitverbreitetsten Flavonoid unserer Nahrung. Schon seit mehreren Jahrzehnten wird Quercetin wegen seiner positiven gesundheitlichen Effekte und für die Prävention und Therapie von Krebserkrankungen erforscht.

### **1.3 Chemische Eigenschaften und natürliches Vorkommen von Quercetin**

Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon) hat eine hellgelbe Farbe und ist in Wasser schwer, jedoch gut in Alkohol löslich. Definitionsgemäß handelt es sich bei Quercetin um ein Aglykon, da kein Zucker an das Molekül gebunden ist. Chemisch gesehen haben alle Flavonoide ein Grundgerüst aus 3 Kohlenstoffringen mit 2 aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring C, wobei strukturelle Unterschiede am C-Ring die einzelnen Subklassen voneinander differenzieren (Watzl and Rechkemmer, 2001).

Quercetin ist ein Pentahydroxyflavon und lässt sich anhand der Lage der OH-Gruppen von anderen Flavonolen unterscheiden. OH-Gruppen befinden sich, wie der chemische Name schon sagt, an Position 3, 5, 7, 3' und 4'. Im Unterschied zu Quercetin fehlt Kämpferol eine OH-Gruppe an Position 3' und Myricetin hat eine zusätzliche OH-Gruppe an Position 5' (Kelly, 2011). Die chemische Struktur von Quercetin ist zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Chemische Struktur von Quercetin. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Brüning, 2013).**

Viele unserer Nahrungsmittel enthalten Quercetin. In diesen kommt es allerdings selten in seiner aglykonen Form, sondern hauptsächlich als Flavonoidglykosid vor (Croft, 1998, Watzl and Rechkemmer, 2001, Formica and Regelson, 1995). Meist wird die OH-Gruppe an Position 3 durch eine Glykosylgruppe (z.B. Glukose, Rhamnose, Rutinose) ersetzt (Kelly, 2011), wie zum Beispiel bei Rutin, Quercitrin oder Isoquercetrin. Durch diese zusätzlichen Zuckermoleküle erhöht sich die Wasserlöslichkeit von Quercetin (Murakami et al., 2008).

Hohe Konzentrationen an Quercetin finden sich in verschiedenen Obst- und Gemüsesorten. Dazu gehören zum Beispiel Äpfel, Weintrauben, Kapern, Zwiebeln und Teeblätter (USDA, 2003). Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Quercetin liegt bei 16 mg pro Tag und wird hauptsächlich durch den Konsum von Äpfeln, Zwiebeln und Tee aufgenommen (Boots et al., 2008, Hertog et al., 1993b). Ausgewählte Nahrungsmittel, die eine hohe Konzentration an Quercetin enthalten, fasst Tabelle 2 zusammen. Nicht nur durch unsere Nahrung, sondern auch durch das Angebot an diversen Nahrungsergänzungsmitteln, die einen gesundheitlichen Nutzen propagieren, kann Quercetin in verschiedenen Formen und Konzentrationen zu sich genommen werden.

Nahrungsmittel	Durchschnittsgehalt von Quercetin in mg/100g
rote Weintrauben	3.54
Äpfel	4.42
Spinat	4.86
Zwiebeln	13.27
Kakaopulver	20.13
Preiselbeeren	21.00
Holunder	42.00
Liebstockel	170.00
Kapern	180.77
getrocknete Teeblätter	204.66

**Tabelle 2: Nahrungsmittel mit hohen Konzentrationen an Quercetin in aufsteigender Reihenfolge. Quelle (USDA, 2003).**

## 1.4 Medizinische Wirkungsweisen und klinischer Nutzen von Quercetin

Durch epidemiologische Beobachtungen weiß man, dass eine Ernährung die viele Flavonoide und somit Quercetin enthält, positiv auf die Gesundheit wirkt und zum Beispiel die Mortalität durch koronare Herzerkrankungen senkt (Knekt et al., 2002, Hertog et al., 1993a). Der positive gesundheitliche Nutzen von Quercetin ist sehr vielseitig und wurde schon durch viele *in-vitro*- sowie *in-vivo*-Studien, aber auch durch klinische Studien bestätigt. Im Folgenden werden einige wichtige Wirkungsweisen von Quercetin beschrieben.

So zählt vor allem die antioxidative Wirkungsweise von Quercetin nicht nur zu den meist erforschten, sondern auch zur Hauptursache wodurch Quercetin positive gesundheitliche Effekte, wie bei der Atherosklerose oder Ischämie, erzielt (Bischoff, 2008, Boots et al., 2008, Kelly, 2011, Lakhanpal and Rai, 2007). Neben der Funktion als Antioxidans wirkt Quercetin auch antiinflammatorisch (Chirumbolo, 2010, Read, 1995), unter anderem durch die Inhibition von TNF $\alpha$

(Kumazawa et al., 2006), einem wichtigen Faktor bei der Pathogenese von chronischen Entzündungen. Klinische Anwendung findet Quercetin, hauptsächlich wegen seiner antiinflammatorischen Effekte, bei chronischer Prostatitis (Shoskes and Nickel, 2011).

Außerdem besitzt Quercetin antihypertensive (Larson et al., 2012) und kardioprotektive (Chirumbolo, 2012) Mechanismen. So konnte in einer *in-vivo*-Studie an spontan hypertensiven Ratten gezeigt werden, dass die tägliche orale Gabe von Quercetin über fünf Wochen hinweg den Blutdruck signifikant senkte (Duarte et al., 2001). Eine weitere Studie an Patienten mit Hypertonie Grad 1, bei denen der Blutdruck durch Quercetin signifikant gesenkt werden konnte, bestätigte die antihypertensive Komponente von Quercetin am Menschen (Edwards et al., 2007). Neben den genannten medizinischen Wirkungsweisen ist Quercetin auch bekannt für seine antiallergischen (Bischoff, 2008, Joskova et al., 2011, Kelly, 2011), antiviralen (Lu et al., 2012) und neuroprotektiven (Ossola et al., 2009) Mechanismen.

### **1.5 Quercetin zur Prävention und Therapie von Krebs**

Im Hinblick auf Krebs konnte die antitumorale Wirkungsweise von Quercetin durch eine Vielzahl von Forschungsergebnissen bestätigt werden. Lange glaubte man, dass die antitumoralen Eigenschaften von Quercetin hauptsächlich auf dessen Fähigkeit beruhte reaktive Sauerstoffspezies zu inaktivieren (Boly et al., 2011, Murakami et al., 2008). Neuere Erkenntnisse zeigten jedoch, dass die antiproliferativen und proapoptotischen Mechanismen von Quercetin nicht alleine auf dessen antioxidative Wirkungsweise zurückzuführen ist, sondern auch auf dessen direkte Interaktion mit Zellrezeptoren und dessen Fähigkeit Signaltransduktionswege zu beeinflussen (Murakami et al., 2008). Die meisten Ergebnisse beruhen auf *in-vitro*-Studien von Quercetin an Tumorzelllinien und wenigen *in-vivo*-Studien. Aus der Fülle von Studienergebnissen über die Effekte von Quercetin auf Krebs werden einige Mechanismen im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

Mutationen des Tumorsuppressors p53 gehören zu den weitverbreitetsten genetischen Veränderungen in humanen Tumorzellen und spielen einen zentralen

Faktor in der Entstehung von Tumoren (Nigro et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass Quercetin zu einer verminderten Expression von mutiertem p53 und somit zum Zellzyklusarrest in Brustkrebszellen führte (Avila et al., 1994, Lamson and Brignall, 2000). Der Zellzyklus stellt einen möglichen Angriffspunkt für die antitumorale Wirkungsweise von Quercetin dar. Quercetin blockiert an verschiedenen Stellen den Zellzyklus von Tumorzellen (Gibellini et al., 2011). In humanen Brustkrebszellen führte Quercetin sowohl zum Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (Choi et al., 2001), als auch zu einer Inhibition des Zellzyklus in der G1/S-Phase (Choi et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Quercetin seine antiproliferativen Effekte über die Modulation des Östrogenrezeptors II/Östrogenrezeptors  $\beta$  (ER $\beta$ ) hervorruft (Scambia et al., 1991). Quercetin führte zur Induktion der Östrogenrezeptor-II-Expression in Hormonrezeptor-positiven und Hormonrezeptor-negativen Brustkrebszellen, was Quercetin selbst wiederum eine stärkere Wachstumshemmung der Tumorzellen über die Bindung am Östrogenrezeptor II ermöglichte (Scambia et al., 1993). Neuere Studien zeigten, dass Quercetin über die Aktivierung des ER $\beta$  in ER $\beta$ -1 transfizierten HeLa-Zelllinien und ER $\beta$ -1 enthaltenden Kolonkarzinom-Zelllinien p38 hochregulierte und damit zur Apoptose der Tumorzellen führte (Bulzomi et al., 2012). Auch die Modulation von verschiedenen Kinasen in Signaltransduktionswegen sind Ziele der antitumoralen Wirkungsweise von Quercetin. Tyrosinkinase spielen eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von Wachstumssignalen zum Zellkern (Lamson and Brignall, 2000). Quercetin führt zu einer verminderten Expression von Her-2/neu, einer Transmembran-Tyrosinkinase, die zur EGFR-Familie (epithelial growth factor receptor) gezählt wird (Boly et al., 2011, Jeong et al., 2008). In 25% der primären Mammakarzinome findet man eine Überexpression der Rezeptortyrosinkinase Her-2/neu, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Kaufmann, 2006). Abhängig von Rezeptortyrosinase befindet sich der PI3K/Akt-Signalweg, der häufig in Tumoren überaktiviert ist. Der PI3K/Akt-Signalweg ist wichtig für die Zellproliferation und das Überleben von Tumorzellen und inhibiert bei Aktivierung die Apoptose (van der Heijden and Bernards, 2010). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Quercetin ein potenter Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist (Gulati et al., 2006, Matter et al., 1992) und somit das Überleben der Tumorzellen verhindern kann. Neben den genannten Kinasen inhibiert Quercetin auch eine Reihe andere

Kinasen, die an mitotischen Prozessen der Zelle beteiligt sind (Boly et al., 2011). Außerdem könnte Quercetin als Chemosensitizer und zur Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika eine Rolle spielen. Eine *in-vitro*-Studie untersuchte die Wirkungsweise von Quercetin auf Brustkrebszellen und gesunden Brustzellen in Kombination mit Doxorubicin. Die Ergebnisse zeigten, dass Quercetin die antitumoralen Effekte von Doxorubicin auf Brustkrebszellen verstärkte, aber gleichzeitig gesunde Zellen vor den Auswirkungen von Doxorubicin schützte (Staedler et al., 2011). Eine weitere Studie bestätigte die gleichen Effekte von Quercetin in Kombination mit Doxorubicin bei Leberkarzinomzellen und gesunden Leberzellen (Wang et al., 2012). Des Weiteren besitzt Quercetin die Fähigkeit, das Wiederansprechen von resistenten Tumorzellen auf Chemotherapeutika zu ermöglichen und somit als Chemosensitizer zu wirken (Chen et al., 2010, Kim et al., 1998).

Kohortenstudien und Fall-Kontroll-Studien haben den Bezug von Flavonidaufnahme und Krebserkrankungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aufnahme von Flavonoiden, insbesondere von Quercetin, zu einem geringeren Lungenkrebsrisiko beitragen kann (Neuhouser, 2004, Hirvonen et al., 2001). Weitere Studien bestätigen auch eine inverse Assoziation bei der Entstehung von Pankreaskarzinomen und Flavonidaufnahme bei männlichen Rauchern (Bobe et al., 2008), sowie eine inverse Korrelation von einem Kolonkarzinom-Auftreten und der Aufnahme von Quercetin (Kyle et al., 2010).

Die komplexen Mechanismen mit denen Quercetin seine antitumoralen Aktivitäten ausübt, sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Die vorliegende Arbeit soll zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise von Quercetin auf Krebszellen beitragen.

## **1.6 Der mTOR-Signalweg**

### **1.6.1 Begriffserklärung und Funktion**

mTOR (mammalian target of rapamycin), auch unter den Synonymen FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein), RAFT1 (rapamycin and FKBP12 target), RAPT1 (rapamycin target 1) oder SEP (sirolimus effector protein) bekannt, ist ein zentraler Regulator von Zellwachstum, Zellmetabolismus, Zellproliferation und

Zellüberleben. Das „Target of Rapamycin“ wurde ursprünglich in den 90er Jahren in der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Heitman et al., 1991). Es ist ein Protein, das sich in allen eukaryotischen Zellen von den Hefen bis zu den Säugetieren finden lässt. Das mTOR-Protein ist eine 289 kDa große Serin/Threoninkinase, die zur PI3K-verwandten Proteinkinasen-Familie (PIKK) gezählt wird, da ihr carboxyterminales Ende der katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) homolog ist (Populo et al., 2012, Keith and Schreiber, 1995, Kunz et al., 1993). In der PI3K/Akt-Signalkaskade ist mTOR ein dieser nachgeschalteter Faktor und dieser ist auch der Hauptsignalweg über den mTOR aktiviert wird (siehe Abbildung 2). mTOR kommt in zwei verschiedenen Komplexen vor, mTORC1, der auch als Rapamycin-empfindlicher Komplex bezeichnet wird und mTORC2, der Rapamycin-unempfindliche Komplex (Loewith et al., 2002). Der mTORC1-Komplex besteht aus mTOR, zwei positiv regulierenden Faktoren und zwei negativ regulierenden Faktoren. Zu den positiv regulierenden Faktoren gehört Raptor (regulatory associated protein of mTOR) (Hara et al., 2002) und mLST8/G $\beta$ L (mammalian lethal with SEC13 protein 8) (Kim et al., 2003). Zu den negativ regulierenden Faktoren zählt man PRAS40 (proline rich Akt substrate 40 kDa) (Sancak et al., 2007) und Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) (Peterson et al., 2009). mTORC2 besteht aus mTOR, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1), Protor (protein observed with Rictor), mLST8 und Deptor, welcher bis heute der einzige bekannte endogene negative Regulator von mTORC2 ist (Frias et al., 2006, Guertin et al., 2006, Pearce et al., 2007, Peterson et al., 2009, Sarbassov et al., 2004). Obwohl beide mTOR-Komplexe wichtig für Zellwachstum, Zellproliferation und Zellüberleben sind, ist die Rolle von mTORC1 wesentlich bekannter als die Rolle von mTORC2. Der Rapamycin-empfindliche mTORC1-Komplex aktiviert die Translation über seine Substrate 4E-BP1 (eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) und S6K1 (p70 ribosomal protein S6-kinase 1), der Rapamycin-unempfindliche mTORC2-Komplex aktiviert die Proteinkinase Akt und ist für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts der Zelle zuständig (Populo et al., 2012, Sarbassov et al., 2004, Sarbassov et al., 2005). Für die vorliegende Arbeit ist der mTORC1-Komplex und dessen Effekte von entscheidender Bedeutung. Deshalb wird im folgenden Abschnitt die Rolle von mTORC1 genauer erklärt.

### 1.6.2 Die Regulierung des mTORC1-Signalweges und dessen Effekte

mTOR wird über vier Hauptsignale reguliert. Zu diesen gehören Wachstumsfaktoren, der Energiestatus der Zelle, das Vorhandensein von Aminosäuren und der Sauerstofflevel der Zelle (Laplante and Sabatini, 2009). Bei positivem Energiestatus, ausreichend Sauerstoff und vorhandenen Aminosäuren wird der mTOR-Signalweg aktiviert, da mTOR für anabole Prozesse wichtig ist. Der Hauptsignalweg über den mTOR kontrolliert wird, ist der ihm vorgeschaltete PI3K/Akt-Signalweg, der über Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone aktiviert wird (siehe Abbildung 2).

Wachstumsfaktoren binden an Membranrezeptoren (Rezeptortyrosinkinasen), die IRS1 (insulin receptor substrate 1) aktivieren und IRS1 daraufhin PI3K zum Membranrezeptor rekrutiert. PI3K produziert den second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2). PIP3 rekrutiert PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), die den zentralen Faktor Akt phosphoryliert und dadurch aktiviert (Hall, 2008, Alessi et al., 1997). Der Gegenspieler von PI3K ist der Tumorsuppressor PTEN (phosphatase and tensin homolog), ein negativer Regulator der Akt-Aktivierung, da er PIP3 in seine inaktive PIP2 Form umwandelt und damit weniger Akt aktiviert wird (Stambolic et al., 1998). Die Kinase Akt, auch als Proteinkinase B bekannt (PKB), ist eine Serin/Threoninkinase, die einen wichtigen Bestandteil von Signalwegen der Zelle darstellt sowie ein bedeutsamer Regulator von Apoptose ist. Das aktivierte Akt phosphoryliert und inaktiviert zwei Proteine, die mTORC1 inhibieren (Hall, 2008). Zum einen den endogenen Faktor PRAS40, einen negativen Regulator im mTORC1-Komplex (Sancak et al., 2007), zum anderen den Tumorsuppressor TSC2 (Tuberin). Akt verhindert die Komplexbildung von TSC2 mit TSC1 (Hamartin) (Inoki et al., 2002) und damit die Inhibierung des positiven Regulators von mTORC1, das GTPase-Protein Rheb (Ras homolog enriched in brain) (Inoki et al., 2003). Der aktive TSC1/TSC2-Komplex wandelt Rheb in seine inaktive GDP-gebundene Form um (Inoki et al., 2003) und verhindert die Aktivierung von mTOR. Somit führt die Hemmung von TSC2 durch Akt zur Aktivierung von mTORC1 durch Rheb.



Ein weiterer Upstream-Regulator von mTOR ist die AMP-aktivierte-Proteinkinase (AMPK). AMPK wird über den AMP/ATP-Spiegel der Zelle reguliert (Hall, 2008). Bei negativer Energiebilanz, also bei einem hohen AMP-Spiegel, ist die AMPK aktiviert und hemmt mTORC1 (Hall, 2008). Auch die Kinase LKB1 (liver kinase B1) aktiviert und verstärkt die AMPK-Wirkung (Sebbagh et al., 2011). AMPK hemmt mTORC1 über einen direkten und indirekten Weg. Direkt durch Phosphorylierung und dadurch Inhibierung von Raptor, einem positiv regulierenden Partner von mTOR im mTORC1-Komplex sowie indirekt durch die Aktivierung von TSC2, der wiederum im Komplex mit TSC1 Rheb hemmt (Gwinn et al., 2008).

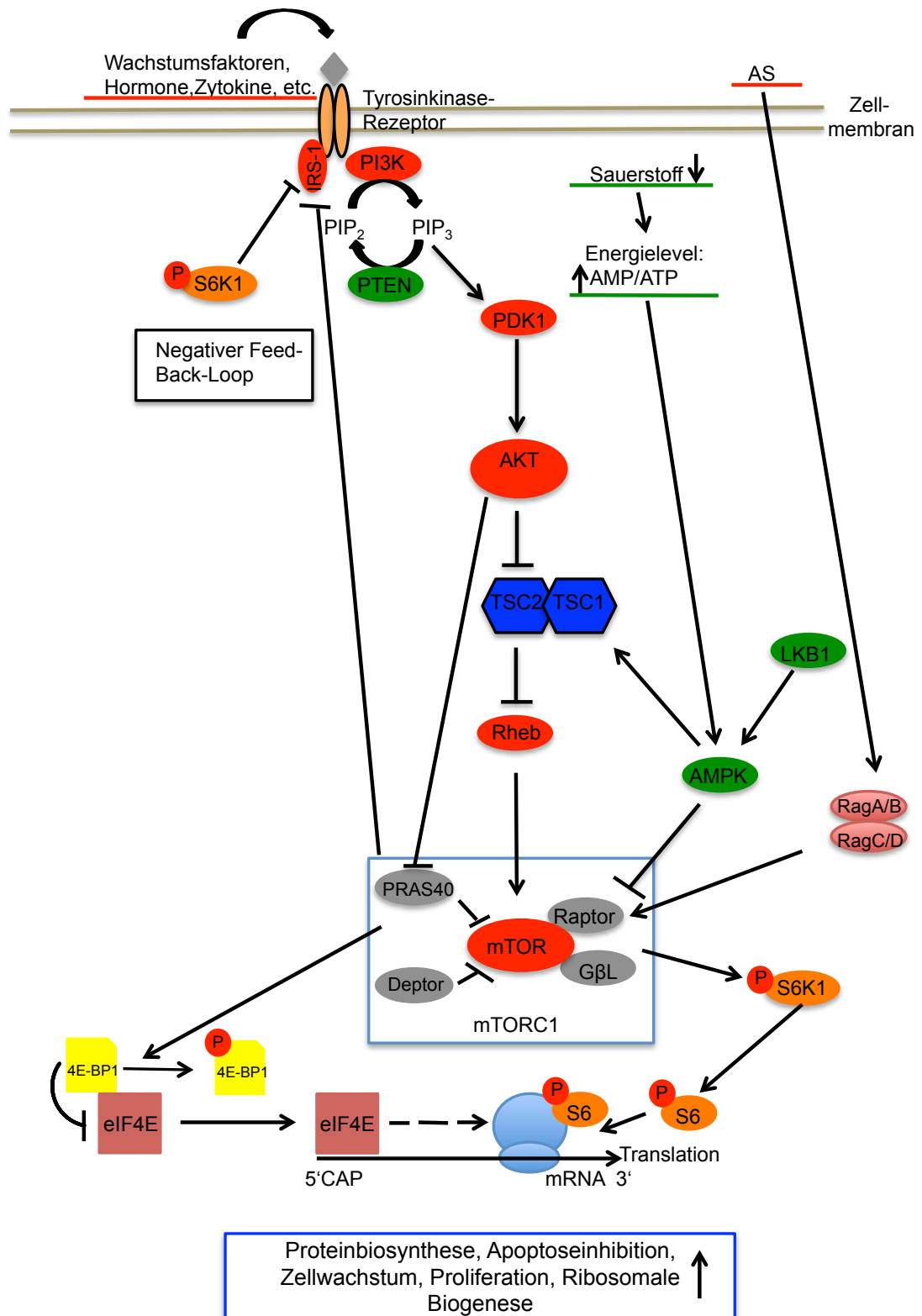
Da mTOR den anabolen Stoffwechsel fördert, bedarf es des Vorhandenseins von Nährstoffen. Wie bereits dargestellt, aktivieren Aminosäuren den mTOR-Signalweg. Lange war unklar, wie Aminosäuren zur Aktivierung des mTOR-Signalweges führen. Neuere Studien zeigten, dass eine Familie von vier kleinen GTPasen, sogenannte Rag-Proteine, in Anwesenheit von Aminosäuren mTORC1 direkt aktivieren (Kim et al., 2008).

Der aktivierte mTORC1-Komplex phosphoryliert Substrate, die wichtig sind für die Translation und somit für das Zellwachstum und die Zellproliferation. Die wohl bekanntesten Substrate von mTOR sind S6K1 und 4E-BP1. mTOR phosphoryliert und aktiviert die Serin-/Threoninkinase S6K1 an der Stelle Thr389, die wiederum das ribosomale Protein S6 phosphoryliert (Dennis et al., 1996, Populo et al., 2012). Das phosphorylierte und aktivierte ribosomale Protein S6 verstärkt die Translation von 5'-terminal-oligopyrimidine mRNAs (5'TOP mRNAs), die hauptsächlich für Komponenten des Translationsapparates wie z.B. ribosomale Proteine, Elongationsfaktoren, Poly-A-Bindungsproteine und insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) kodieren (Faivre et al., 2006, Ruvinsky and Meyuhas, 2006). Das andere wichtige Substrat von mTOR ist 4E-BP1. In seiner unphosphorylierten Form ist 4E-BP1 an eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) gebunden und verhindert dadurch die Initiation der Translation (Pause et al., 1994, Populo et al., 2012). Eukaryotische Ribosomen sind nicht fähig selbständig das 5'-Ende der mRNA zu binden um die Translation einzuleiten. Sie benötigen einen Translations-Initiationskomplex, den sogenannten eIF4F-Komplex, welcher aus den Komponenten eIF4E (CAP-bindendes Protein), eIF4G (Strukturprotein) und eIF4A (RNA-Helikase) besteht. mTOR phosphoryliert 4E-BP1

an verschiedenen Stellen und löst dadurch die Bindung von 4E-BP1 mit dem Initiationsfaktor eIF4E (Populo et al., 2012, Pause et al., 1994). Das frei gewordene eIF4E kann daraufhin den Initiationskomplex eIF4F bilden und somit die CAP-abhängige Translation beginnen (Faivre et al., 2006). Diese Kaskade induziert die Translation von mRNAs, welche regulierende Elemente in den 5'-untranslated terminal regions (5'-UTRs) haben, die für Proteine kodieren, welche für den G1/S-Phasen Übergang des Zellzyklus von Bedeutung sind (Faivre et al., 2006). Der aktivierte mTORC1-Komplex und dessen Substrat S6K1 bilden einen negativen Feedback-Loop zu IRS1 und hemmen dadurch die Aktivierung von PI3K/Akt (Harrington et al., 2004, Harrington et al., 2005, Shah et al., 2004). Somit ist die Aktivierung von mTORC1 auch selbstlimitierend. Abbildung 2 stellt vereinfacht die Signalkaskade PI3K/Akt/mTOR und die in diesem Abschnitt beschriebenen Effekte dar.

mTOR ist somit ein wichtiger zentraler Faktor, der Wachstumsfaktoren, Vorhandensein von Nährstoffen und den Energiestatus der Zelle mit Zellüberleben, Wachstum und Proliferation verbindet.

## Einleitung

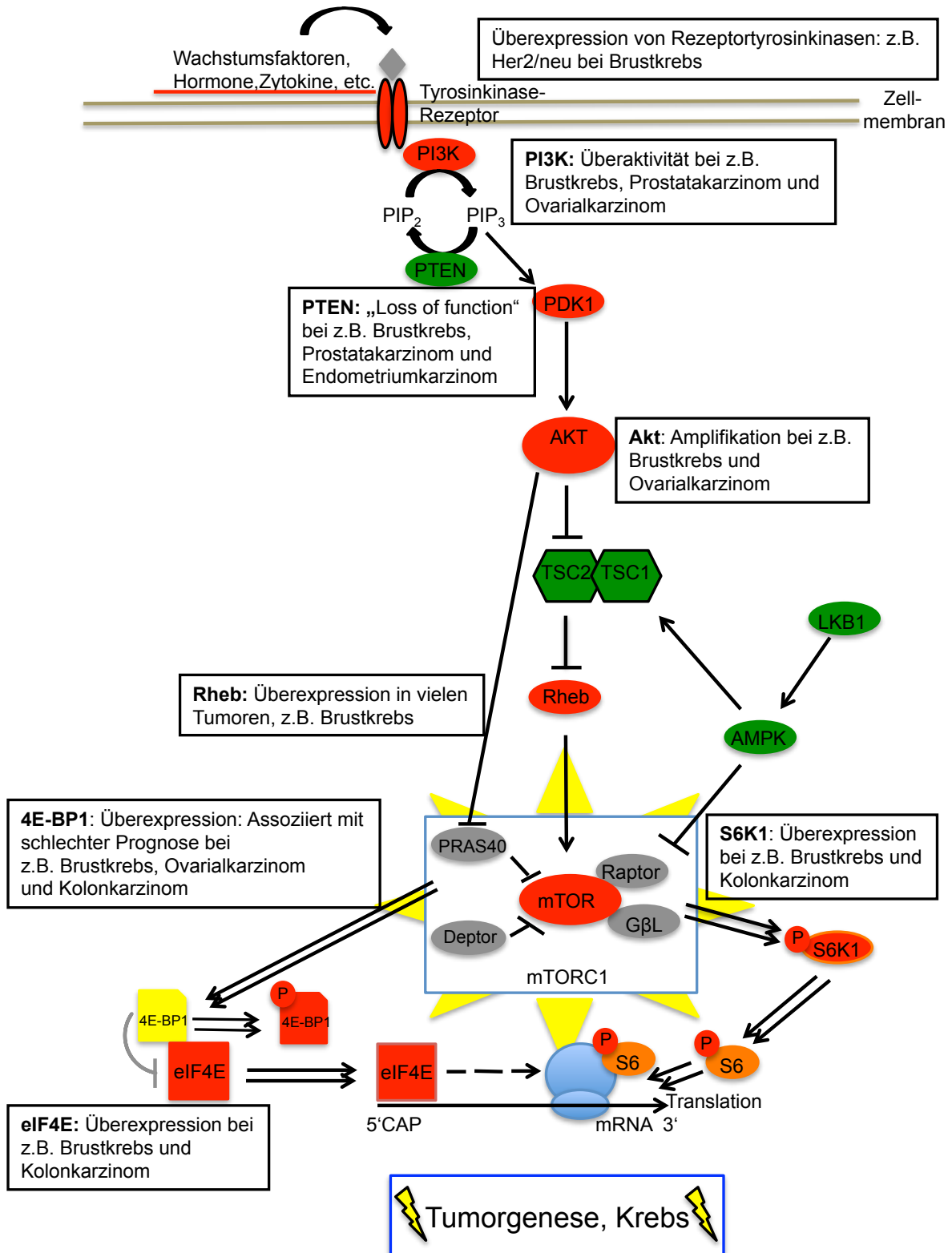


**Abbildung 2: Der mTOR-Signalweg.** mTOR ist ein zentraler Regulator von Zellwachstum und Zellproliferation. Er wird durch Wachstumsfaktoren, Aminosäuren, dem ATP- und Sauerstofflevel der Zelle reguliert. Die Grafik wurde auf der Basis folgender Quellen erstellt (Cell Signaling Technology, 2008, Hall, 2008, Laplante and Sabatini, 2009, Populo et al., 2012)

### 1.6.3 Die Rolle von mTOR bei Krebs

Da mTOR eine Schlüsselrolle in der Zellproliferation und dem Zellwachstum spielt, ist es nicht verwunderlich, dass die Aktivität des mTOR-Signalweges in vielen Tumoren dereguliert ist. Dabei können viele Elemente in der Signalkaskade, upstream und downstream von mTOR, verändert sein. Upstream von mTOR kann der PI3K/Akt-Signalweg durch verschiedene Mechanismen überaktiviert werden. Hierzu zählt die Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. Her-2/neu, aber auch Mutationen von PI3K oder Akt (Populo et al., 2012, Stemke-Hale et al., 2008). Auch der Gegenspieler von PI3K, der Tumorsuppressor PTEN, ist in vielen Tumoren herunterreguliert (Sansal and Sellers, 2004). Dieser Funktionsverlust (Loss of function) führt wiederum zur Hochregulierung von PI3K/Akt und damit auch von mTOR. Auch die Hauptsubstrate von mTOR, 4E-BP1, S6K1 und eIF4E können mitverantwortlich für zelluläre Transformation sein und dessen Überexpression in Tumoren ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Armengol et al., 2007, Barlund et al., 2000, De Benedetti and Graff, 2004). Die Dysregulation von verschiedenen Elementen des mTOR-Signalweges konnte in Tumoren wie z.B. Brustkrebs, Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom und Prostatakarzinom gefunden werden (Populo et al., 2012). Die besondere Rolle von mTOR in der Zellproliferation und dem Zellwachstum, die in vielen Tumoren zur Entstehung und Progression von Tumorzellen beiträgt, hat mTOR zu einem wichtigen Angriffsziel (sog. Target) in der modernen Krebstherapie gemacht. Dies hat die Entwicklung von spezifischen mTOR-Inhibitoren für die Therapie von Tumorerkrankungen angestoßen. Abbildung 3 stellt den mTOR-Signalweg in Tumorzellen dar und zeigt beispielhaft welche Elemente in verschiedenen Tumoren dereguliert sein können.

## Einleitung



**Abbildung 3: Der mTOR-Signalweg in Tumorzellen. Veränderungen von verschiedenen Elementen des mTOR-Signalweges und Tumorbeispiele. Rote Moleküle stellen Protoonkogene, grüne Moleküle Tumorsuppressoren da. Die Grafik wurde auf der Basis folgender Quellen erstellt (Cell Signaling Technology, 2008, Hall, 2008, Laplante and Sabatini, 2009, Populo et al., 2012)**

#### **1.6.4 mTOR-Inhibitoren und deren Rolle in der modernen Krebstherapie**

Die wichtigsten Erkenntnisse über mTOR haben wir dessen direkten Inhibitor und Namensgeber Rapamycin zu verdanken. Rapamycin ist ein Produkt des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus*, das 1975 im Erdboden der Osterinsel Rapa Nui entdeckt wurde (Vezina et al., 1975). Initial ist Rapamycin, dessen Name von Rapa Nui abgeleitet wurde, als Antimykotikum gegen *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus* eingesetzt worden (Faivre et al., 2006, Vezina et al., 1975). Aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung (Martel et al., 1977) wurde Rapamycin 1999 von der FDA (US Food and Drug Administration) und 2001 in Europa von der EMA (European Medicines Agency) zur Prävention von Organabstoßungen nach Nierentransplantationen zugelassen. Neben seinen immunsuppressiven Eigenschaften kann Rapamycin auch die Restenoserate nach koronarer Stentimplantation senken (Gallo et al., 1999), weshalb heutzutage mit Rapamycin (Sirolimus) beschichtete Stents (sog. Drug eluting Stents) in der interventionellen Kardiologie erfolgreich Anwendung finden.

In den Achtziger Jahren wurden auch die antitumoralen Eigenschaften von Rapamycin entdeckt (Eng et al., 1984). Viele Studien konnten die zytostatischen und wachstumshemmenden Effekte von Rapamycin auf verschiedene Tumorzelllinien, unter anderem auf Brustkrebszelllinien (Pang and Faber, 2001), Prostatakarzinomzelllinien (van der Poel et al., 2003) und Lungenkarzinomzelllinien (Seufferlein and Rozengurt, 1996) bestätigen. Aufgrund der ungünstigen Wasserlöslichkeit von Rapamycin wurden Analoga mit besserer Pharmakokinetik und geringerer immunsuppressiver Wirkung für die Tumortherapie entwickelt. Zu diesen Analoga, die auch als Rapaloge bezeichnet werden, gehören Temsirolimus (CCI-779, Torisel, Pfizer, New York, NY, USA), Everolimus (RAD001, Afinitor, Novartis, Basel, Schweiz) und Ridaforolimus/Deforolimus (AP23573, ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA). Rapamycin und seine Rapaloge haben den gleichen Wirkungsmechanismus und inhibieren sehr spezifisch mTORC1. Zuerst bilden diese einen Komplex mit dem intrazellulären Rezeptor FKBP12 (12 kDA großes FK506-bindendes Protein) und inhibieren anschließend mTOR indem sie an dessen FRB Domäne (FKBP12-Rapamycin-bindende Domäne) binden (Dumont and Su, 1996). Die Rapaloge Temsirolimus, Everolimus und Ridaforolimus werden derzeit in verschiedenen

Studien für die Behandlung von Krebserkrankungen untersucht. Klinische Erfolge in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms mit Temsirolimus führten zu dessen Zulassung durch die FDA und die EMA (EMA, 2007) im Jahre 2007. Everolimus ist neben der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms auch für die Therapie von Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas und für die Therapie des Subependymalen Riesenzellastrozytoms, das mit Tuberöser Sklerose assoziiert ist, zugelassen (FDA, 2012, EMA, 2009). Im Juli 2012 wurde Everolimus außerdem für die Behandlung von postmenopausalen Frauen mit fortgeschrittenem Hormonrezeptor-positivem, HER-2/neu-negativem Mammakarzinom in Kombination mit dem Aromatase-Inhibitor Exemestan zugelassen (EMA, 2007, FDA, 2012), da die Gabe von Everolimus zusammen mit Exemestan in klinischen Studien das progressionsfreie Überleben signifikant verlängern konnte.

Neben den Rapalogen wurde auch eine neue Generation an mTOR-Inhibitoren für die Tumorthherapie entwickelt. Die spezifische Inhibition von mTORC1 durch die Rapaloge kann in einigen Tumoren durch den vorhandenen mTOR-S6K1-IRS1-negativen Feedback-Loop (siehe Abbildung 2) zur Hochregulation des PI3K/Akt-Signalweges führen (O'Reilly et al., 2006). Die neuen mTOR-Inhibitoren, zu denen die spezifischen mTORC1/2-Inhibitoren und die Dualen PI3K-mTOR-Inhibitoren gezählt werden, sind Kinase-Inhibitoren, die den Vorteil haben, neben mTORC1 auch mTORC2 und Akt zu inhibieren. Somit kann die Hochregulation von Akt durch die neuen mTOR-Inhibitoren verhindert werden. Präklinische Studien zeigten, dass mTORC1/2-Inhibitoren im Vergleich zu Rapamycin und seinen Rapalogen eine stärkere antitumorale Aktivität aufweisen (Feldman et al., 2009, Thoreen et al., 2009). Allerdings muss die Verträglichkeit und Wirksamkeit der neuen mTOR-Inhibitoren, die sich derzeit in Phase I und II Studien befinden, noch für die Tumorthherapie überprüft werden.

Verschiedene Studien zeigten auch, dass pflanzliche Stoffe, wie z.B. Curcumin, Resveratrol und Genistein, den mTOR-Signalweg in Tumorzellen direkt oder indirekt inhibieren können (Anastasius et al., 2009, Beevers et al., 2009, Jiang et al., 2009). Damit könnten auch pflanzliche Stoffe als mögliche mTOR-Inhibitoren für die Tumorthherapie überprüft oder weiterentwickelt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt die Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin. Die mögliche

Anwendung von Quercetin als mTOR-Inhibitor in der Krebstherapie soll diskutiert werden.

### **1.6.5 Die Beziehung von mTOR und Autophagie**

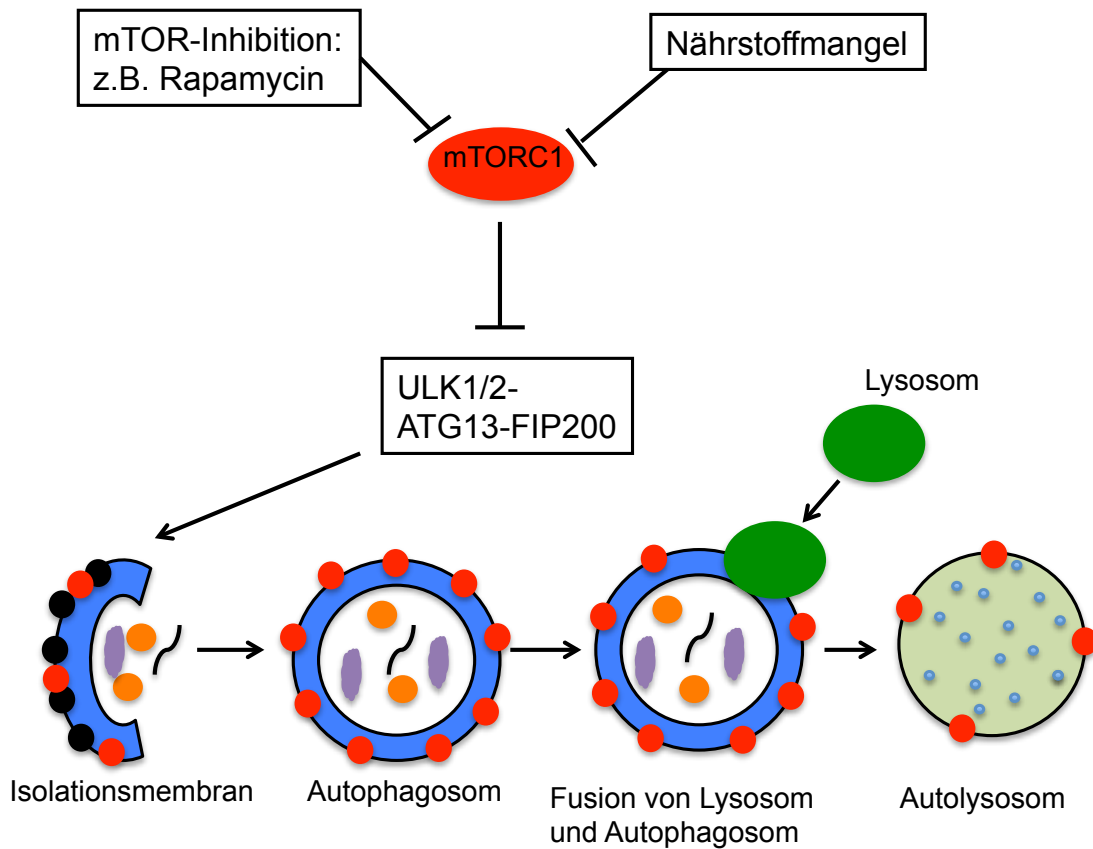
Autophagie leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „sich-selbst-fressen“. Es ist ein in der Evolution konservierter zellulärer Prozess, der für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase sehr wichtig ist. Bei dem Prozess der Autophagie werden zelleigene Komponenten, wie z.B. langlebige und beschädigte Proteine in ihr Grundgerüst abgebaut und die Grundbausteine der Zelle wieder zur Verfügung gestellt. Während Zeiten von Nährstoffmangel können Zellen dadurch ihr Überleben sicherstellen. Allerdings führt exzessive Autophagie auch zur Apoptose. Autophagie ist ein wichtiger Prozess, der zwischen Überleben und Tod der Zelle steht.

Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie. Allen gemeinsam ist der Abbau von zellulären Bestandteilen durch lysosomale Proteine. Am besten erforscht ist die Makroautophagie, die im Allgemeinen in Zusammenhang mit dem Begriff Autophagie gemeint ist und in diesem Abschnitt genauer erläutert wird. Autophagie beginnt mit der Formation einer Isolationsmembran oder Phagophore, dessen Bestandteile vermutlich aus dem endoplasmatischen Retikulum stammen (Axe et al., 2008). Dabei schließt die Isolationsmembran Zytoplasma und zelluläre Bestandteile in sich ein und bildet ein doppelmembraniges Vesikel, das sogenannte Autophagosom (Mizushima et al., 2010). Daraufhin fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, welches seinen proteolytischen Inhalt in das Autophagosom entleert und es entsteht ein Autolysosom in dem die Zellbestandteile in ihre Grundbausteine abgebaut werden (Mizushima et al., 2010).

Autophagie wird bei Nährstoffmangel und anderen Stresssituationen, wie Hypoxie und niedrigem Energielevel der Zelle induziert. Eine zentrale Rolle spielt dabei mTOR. Der phosphorylierte und aktivierte mTORC1-Komplex inhibiert Autophagie indem es den ULK1/2-ATG13-FIP200-Komplex reguliert, der für die Formation der Isolationsmembran und des Autophagosoms notwendig ist (Ganley et al., 2009, Hosokawa et al., 2009, Jung et al., 2009). mTORC1 unterdrückt Autophagie indem



es ULK1/2 und ATG13 phosphoryliert und dadurch den ULK1/2-ATG13-FIP200-Komplex hemmt (Jung et al., 2009). Kommt es allerdings zu Nährstoffmangel der Zelle oder wird mTOR durch z.B. Rapamycin inhibiert, wird Autophagie induziert. ULK1/2, ATG13 und FIP200 gehören zur Gruppe der ATG-Proteine (autophagy related gene), welche für die Bildung der Isolationsmembran und somit für die Initiation von Autophagie entscheidend sind (Mizushima et al., 2010). Die ATG-Proteine sind Genprodukte, die evolutionär hoch konserviert sind und in der Hefe entdeckt wurden (Tsukada and Ohsumi, 1993). Heute kennt man über 30 verschiedene ATG-Proteine, von denen die meisten in Säugetierzellen auf der Isolationsmembran, jedoch nicht auf dem kompletten Autophagosom gefunden werden können (Longatti and Tooze, 2009, Mizushima et al., 2010). Bis heute ist LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) das einzige ATG-Protein, das sich auf der Isolationsmembran bis hin zum vollständigen Autolysosom finden lässt und daher zum Nachweis von Autophagie eingesetzt wird (Kabeya et al., 2000, Mizushima, 2004). Der Zusammenhang zwischen mTOR und Autophagie wird in Abbildung 4 dargestellt.



Markerproteine:

- Die meisten ATG-Proteine, wie z.B.: ULK1, ULK2, ATG13, FIP200, etc.
- LC3 ist bis heute das einzige ATG-Protein, das von der Isolationsmembran bis hin zum fertigen Autolysosom zu finden ist

**Abbildung 4: Darstellung von Autophagie. Ein inaktivierter mTORC1-Komplex führt zur Induktion von Autophagie. mTOR kann ULK1/2 und ATG13 nicht mehr inaktivieren. Autophagie beginnt mit der Bildung einer Isolationsmembran. Zellbestandteile werden in einem Autophagosom eingeschlossen und nach der Fusion mit einem Lysosom durch proteolytische Proteine im Autolysosom abgebaut. LC3 dient als Marker für Autophagie. Die Abbildung wurde auf der Basis folgender Quellen erstellt (Glick et al., 2010, Mizushima et al., 2010, Laplante and Sabatini, 2009)**

### **1.7 Fragestellung**

Quercetin ist seit langem für seine antitumoralen Eigenschaften bekannt. Die vorliegende Arbeit soll zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise von Quercetin auf humane Tumorzelllinien beitragen und die zellmorphologischen Veränderungen sowie die molekularen Mechanismen, die bis zum Zelltod der Tumorzelllinien führten, weiter untersuchen. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass das HIV-Medikament Nelfinavir oxidativen Stress in humanen Tumorzelllinien auslöste, der durch Antioxidantien wie Glutathion abgeschwächt werden konnte. Als erstes wird daher die Wirkungsweise des Antioxidans Quercetin auf humane Tumorzelllinien mit und ohne Nelfinavir-Gabe beschrieben. Die zellmorphologischen Veränderungen von Tumorzellen durch die Quercetin-Behandlung werden mittels Phasenkontrastuntersuchungen und Fluoreszenzfärbungen weiter untersucht. Der molekulare Mechanismus, der hinter der Wirkungsweise von Quercetin zu vermuten ist, soll ebenfalls genauer beschrieben werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

#### Geräte:

- Accu-jet® Pipettierhelfer (Brand, Wertheim)
- Brutschrank, HERAcell 150i CO2 Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Dänemark)
- Elektrobloiting-Apparat, Mini Trans Blot® cell (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Elektrophoresestromquelle, Consort 1200V-500mA E815 (Consort, Parklaan Belgien)
- ELISA-Gerät, Universal Microplate Reader ELx 800 NB (BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall)
- Filterpapier, Mini-Trans Blot® Filter Paper (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Gelkassettenhalter, Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Kühlschrank (LIEBHERR, Ochsenhausen)
- Mikroskop, Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss, Jena)
- Mini Gel Holder Casette (BioRad Laboratories GmbH, München)
- PVDF Membran, Immobilon™ Transfer Membranes (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- Schüttler, Vibrax Serono Shaker (Serono, Rockland, USA)
- Sterilbank, Laminar Air Flow Sterilbank HERA Safe (Heraeus Instruments, Hanau)

- Stickstofftank (Linde, Unterschleißheim)
- Stromquelle (Consort, Parklaan, Belgien)
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge (Thermo Scientific Inc., Roskilde, Dänemark)

### **Verbrauchsmaterial:**

- 96-Well-Platten (VWR, Ismaning)
- Deckgläser für Mikroskopie 24x24 mm (Menzelgläser, Gerhard Menzel, Braunschweig)
- Gefriercontainer, 5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty" (Nalgene<sup>®</sup>, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark)
- Gelkassetten, Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Long Shelf Precast Gels, 10-well comb. (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Kryoröhrchen (1,5 ml) (Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold)
- Kulturflaschen, IWAKI<sup>®</sup> 25cm<sup>2</sup> /canted neck tissue culture flask with vent cap (IWAKI brand Scitech Div. Asahi Techno Glass, Tokyo, Japan)
- Objektträger 76x26x1 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
- Objektträger, Lab-Tek II Chamber Slide<sup>™</sup> System 4 Well Glass Slide (nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Dänemark)
- Petrischalen, Greiner Bio-One Cellstar tissue culture dishes (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Pipetten (1000 µl, 200 µl, 10 µl) (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, SafeSeal Tips Premium (Biozym, Hessisch Oldendorf)
- Röhrchen (15 ml, 50 ml), Falcon Blue Max (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Safe-Lock-Gefäß (1,5 ml) (Eppendorf, Hamburg)

- Schwämme, Mini-Trans-Blot Fiber Pads (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml) (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)
- Spritze (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Zellkulturgefäß, quadriPERM<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

### 2.2 Chemikalien und Biochemikalien

- 10x Tris/Glycin-Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München)
- 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Auftragspuffer, Roti Load-1 Auftragspuffer, reduzierend (4-fach Konz.) (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- BCIP/NBT Color Development Substrate (Promega GmbH, Mannheim)
- Destilliertes Wasser (Noll, München)
- DMSO (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- HBSS mit Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup> (Invitrogen, Karlsruhe)
- Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat, ≥ 99% Zellkulturqualität (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Methanol, ≥ 99,98% Ultra LC-MS Methylalkohol (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Milchpulver Blotting Grade (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich-Laborchemikalien GmbH, Seelze)
- Natriumazid (Sigma-Aldrich-Laborchemikalien GmbH, Seelze)
- Natriumchlorid zur Analyse (Merck KGaA, Darmstadt)

- PBS, Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg (PAA, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA, Pasching, Österreich)
- Pferdeserum (PAA, Pasching, Österreich)
- Proteinmarker, peqGold Protein-Marker IV (PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen)
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, München)
- Trypsin-EDTA (1x) (PAA, Pasching, Österreich)
- Tumorzellmedium, Quantum Tumor 263 for Tumor cells with L-Glutamine (PAA, Pasching, Österreich)
- Tween<sup>®</sup> 20 (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Tris PUFFERAN<sup>®</sup> ≥99,3%, Buffer Grade (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)

### 2.3 Verwendete Puffer

- Auftragspuffer, Roti Load-1 Auftragspuffer, reduzierend (4-fach Konz.) (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Blockingpuffer (4% Milchpulver in PBS mit 0,05% Azid und 0,01% Tween)
- Entwicklungspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> mit 50 µl BCIP und 100 µl NBT)
- Gelelektrophoresepuffer (10x Tris/Glycin/SDS Puffer in eine Konzentration von 1/10 in destilliertem Wasser verdünnt)
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, München)
- Transferpuffer (10% von 10x Tris/Glycin Puffer und 10% Methanol in destilliertem Wasser)

## 2.4 Medikamente

- Quercetin (MP Biomedicals, Straßburg, Frankreich) wurde in einer Stammlösung von 100 mM in DMSO bei -20°C gelagert. Für die Versuche wurde Quercetin je nach gewünschter Konzentration mit Zellkulturmedium verdünnt.
- Nelfinavir Mesylat (Viracept<sup>®</sup>, Pfizer, Groton, USA) wurde in einer Stammlösung von 100 mg/ml in DMSO bei -20°C gelagert

## 2.5 Zellfarbstoffe für Fluoreszenzuntersuchungen

Die für die Versuche verwendeten Zellfarbstoffe wurden bei -20°C unter lichtgeschützten Bedingungen gelagert. Alle Farbstoffe wurden vor der Erstanwendung zentrifugiert.

- Cyto-ID<sup>®</sup> Autophagy detection kit (Enzo Life Sciences, Lörrach) ist ein Farbstoff zur Sichtbarmachung von Autophagie in Zellen
- ER-Tracker<sup>™</sup> Green (BODIPY<sup>®</sup> FL glibenclamide) \*for live-cell imaging\* (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 128 µl DMSO vermischt zur Herstellung einer 1 mM Stammlösung. Der ER-Tracker<sup>™</sup> Green bindet sehr selektiv an das Endoplasmatische Retikulum
- LysoTracker<sup>®</sup> Green DND-26 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) besteht aus 1 mM Stammlösung und bindet an saure Kompartimente (Lysosomen) der Zelle



## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Verwendete Antikörper für den Western-Blot

#### Erstantikörper:

- 4E-BP1 Antibody #9452 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- Caspase-6 Antibody #9762 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- LC3B Antibody #2775 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- Phospho-4E-BP1 (Ser65) Antibody #9451 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- Phospho-HSP 27 (Ser15) Antibody #2404 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb #9234 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Antibody (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb #2217 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)

#### Zweitantikörper:

- Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (Dianova GmbH, Hamburg)
- Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG (Dianova GmbH, Hamburg)

## **2.6.2 Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz**

### **Erstantikörper:**

- Ubiquitin (P4D1) Mouse mAb #3936 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- LC3B Antibody #2775 (Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)

### **Zweitantikörper:**

- Cy<sup>TM</sup> 3-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (Dianova GmbH, Hamburg)

## **2.7 Zellkultur und Zelllinien**

### **2.7.1 Verwendete Zelllinien**

- Humane Mammakarzinomzelllinie MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7): es handelt sich um ein Adenokarzinom der Brustdrüse, dessen maligne Zellen aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau isoliert wurden (ATCC HTB-22, ATCC/LGC Standards, Wesel)
- Metastasierte Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453: isoliert 1976 von R. Cailleau et al. vom malignen Perikarderguss einer 48-jährigen Frau (ATCC HTB-131 ATCC/LGC Standards, Wesel)
- Zervixkarzinomzelllinie HeLa: isoliert aus dem Zervixgewebe einer 31-jährigen afro-amerikanischen Frau (ATCC CCL-2, ATCC/LGC Standards, Wesel, Deutschland)
- Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR3: isoliert 1982 von T.C. Hamilton et al. aus dem Aszites einer 60-jährigen Frau (ATCC HTB-161, ATCC/LGC Standards, Wesel)

### **2.7.2 Zellkultur**

Die Zellkultur diente zur Kultivierung verschiedener immortalisierter Zelllinien in Nährmedium. Das Arbeiten mit den oben genannten Zelllinien wurde ausschließlich auf einer Laminar Air Flow/Sterilbank durchgeführt.

Die gewünschten Zellen wurden zuerst aus dem mit Stickstoff gekühlten Vorratsbehälter entnommen, aufgetaut und in 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen pipettiert und mit jeweils 10 ml Medium versetzt. Alle Zellen erhielten Quantum 263 Medium und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin). Unter optimalen Zellkulturbedingungen von 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach ein bis zwei Tagen wurde das Wachstum sowie die Viabilität der Zellen mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops überprüft und gegebenenfalls das alte Medium durch 10 ml neues Medium ersetzt. Bei einer Zellkonfluenz von mehr als 80% wurden die Zellen trypsinisiert.

Zuerst wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen für ca. eine Minute mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Entfernung von PBS wurden diese mit jeweils 1 ml Trypsin, das den Boden der Zellkulturflasche komplett bedeckte, für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Dadurch konnten sich die Zell-Zell-Verbände und die Anheftung der Zellen an die Kulturflaschenböden durch Abschlagen leicht lösen. Um den Trypsinisierungsvorgang, nach ausreichender Lösung der Zellen, zu stoppen, wurde Medium hinzugegeben. Danach wurde ca. 1,5 ml dieser Zellsuspension in ein Safe-Lock-Gefäß gegeben und bei 1000 rpm bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mithilfe einer Pipette abgesaugt. Je nach Wachstumsverhalten der verschiedenen Zelllinien wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 oder 1:10 mit Medium verdünnt und in jeweils neuen Kulturflaschen bebrütet.

### **2.7.3 Kryokonservierung der Zelllinien**

Um die Vitalität der Zellen zu bewahren, wurden die Zelllinien, welche für aktuelle Versuche nicht gebraucht wurden, kryokonserviert.

Im ersten Schritt wurde die gewünschte Zelllinie, wie oben beschrieben, trypsinisiert. Die trypsinisierten Zellen wurden mit 1 ml Medium vermischt und in ein Safe-Lock-Gefäß pipettiert. Bei 1000 rpm und 4°C wurde die Zellsuspension zentrifugiert. Danach wurde mit Hilfe einer Pipette der Überstand vorsichtig abgenommen und das übriggebliebene Zellpellet mit 1,5 ml Einfriermedium (Quantum 263 mit 20% Kälberserum und 10% DMSO) versetzt.

Damit eine gute Zellsuspension entsteht, wurde mit der Pipette mehrmals auf- und abpipettiert. Diese Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Kryogefrierkontainer über Nacht eingefroren, der gewährleistet, dass die Zellsuspension gleichmäßig und langsam (-1°C/min) abkühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen mit den enthaltenen Zelllinien zur Kryokonservierung in einen Stickstofftank überführt.

### **2.8 MTT-Assay**

Der MTT-Assay diente dazu, die Überlebensrate der Zellen unter Zugabe von Quercetin und Nelfinavir zu bestimmen. Zur Versuchsdurchführung wurden Zellen der Zelllinien MCF7, HeLa und OVCAR3 in 96-Well-Platten in Triplikaten angesetzt und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit Quercetin (in einer Konzentration von 30 µM, 60 µM oder 90 µM) oder mit Quercetin (in einer Konzentration von 30 µM oder 60 µM) und Nelfinavir (in einer Konzentration von 10 µg/ml oder 15 µg/ml) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen unbehandelt mit frischem Medium inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium bzw. das Medium mit den Medikamenten entfernt und durch 200 µl frisches Medium pro Well ersetzt. Danach wurden jeweils 20 µl von MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS verdünnt pro Well hinzugegeben und für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Der lösliche MTT-Farbstoff wurde dabei von den lebenden Zellen in unlösliche violette Farbkristalle umgewandelt. Nach Zugabe von 100 µl DMSO wurde die Überlebensrate der Zellen mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt.

## 2.9 Phasenkontrastuntersuchungen und Zellfärbung

Einen Tag vor der Versuchsdurchführung wurden die Zellen der Zelllinien HeLa und MCF7, die eine ausreichende Zellkonfluenz erreicht hatten, trypsinisiert und anschließend mit Medium verdünnt. Jeweils 500 µl der Zellsuspensionen wurden gleichmäßig auf Deckgläser pipettiert und in einem sterilen Zellkulturgefäß für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde das Wachstum der Zellen auf den Deckgläsern mit Hilfe eines Mikroskops überprüft. Wenn die Zellen, die für die Untersuchungen erforderliche Konfluenz von ca. 70% erreicht hatten, konnte Quercetin hinzugegeben werden. Dabei wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette vorsichtig und vollständig von den Deckgläsern entfernt. Die angesetzte Quercetin-Stammlösung wurde aufgetaut und mit Zellkulturmedium in einem Blue-Cap-Röhrchen zu einer 90 µM Konzentration verdünnt. Anschließend wurde die Hälfte der angesetzten Zellen für sechs Stunden mit Quercetin und die Kontrollen mit frischem Medium im Brutschrank inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde das Medium erneut ersetzt und die Deckgläser mit den lebenden Zellen auf einem Objektträger unter einem Phasenkontrastmikroskop in 40-facher Vergrößerung fotografiert. Bei einer Inkubation der Zellen mit 60 µM Quercetin, wurden die Tumorzellen nach 24 Stunden im Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

Erfolgte die Untersuchung mit den oben genannten Zellfarbstoffen, so wurde nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden, mit oder ohne Quercetin, das Medium vorsichtig von den Deckgläsern entfernt. Danach wurde der gewünschte Zellfarbstoff aufgetaut und zu 1:1000 mit Medium verdünnt. Dieser wurde zu jeweils 500 µl auf die Proben pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank wurde der Farbstoff entfernt und die Zellen mit HBSS für ca. eine Minute gewaschen. Die lebenden Zellen wurden mit Medium versetzt und die Deckgläser mit Hilfe einer Pinzette auf einen Objektträger überführt. Die Analyse der lebenden Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zeiss-Axiophot-Fluoreszenz-Mikroskops.

## **2.10 Western-Blot-Analyse**

### **2.10.1 Methodik zur Herstellung der Zelllysate**

Um die zu untersuchenden Proteine für die Western-Blot-Analysen bereitzustellen, sind Lysate der Zelllinien MCF7, MDA-MB-453 und HeLa hergestellt worden. Die für die Proteinlysate benötigten Zellen wurden jeweils trypsinisiert. Die Zellsuspensionen wurden gleichmäßig auf Petrischalen verteilt und in jeweils 5 ml Medium im Brutschrank inkubiert.

Wenn die Zellen eine ausreichende Konfluenz von 70% erreicht hatten, konnten diese für die Versuche bereitgestellt werden. Dabei wurden die Zellen der Zelllinie MCF7 für 0 h, 6 h, 12 h und 24 h und für 0 h, 1,5 h, 3 h und 4,5 h mit Quercetin in einer Konzentration von 90  $\mu$ M im Brutschrank inkubiert. Die Zellen der Zelllinien HeLa und MDA-MB-453 wurden als Positiv- und Negativkontrolle für 0 h und 2 h mit Quercetin in der gleichen Konzentration unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen und der Zellrasen mit 300  $\mu$ l RIPA-Puffer benetzt und anschließend für zehn Minuten eingefroren. Die lysierten Zellen wurden nach dem Wiederauftauen jeweils in ein Safe-Lock-Gefäß pipettiert und bei 12000 rpm bei 4°C für drei Minuten zentrifugiert. Die entstandene Proteinsuspension wurde daraufhin abpipettiert und mit 100  $\mu$ l 4x Probenpuffer in ein neues Gefäß überführt. Alle Proben wurden für spätere Western-Blot-Versuche eingefroren.

### **2.10.2 Methodik der Gelelektrophorese**

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden vor der Erstanwendung auf 80°C erhitzt und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Zwei Gelkassetten mit vorgefertigten Polyacrylamidgelen (BioRad) und mit jeweils zehn Kammern wurden aus dem Kühlschrank genommen und mit 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer in einer Konzentration von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt in den dazugehörigen Kassettenhalter gebracht. Um die einzelnen Kammern mit den Proben oder den Proteinmarkern füllen zu können, wurden diese mit Hilfe einer Spritze gespült. Danach wurden acht Kammern langsam mit jeweils 20  $\mu$ l der Proben und zwei Kammern mit jeweils 10  $\mu$ l Proteinmarker beladen.

Die Aufspaltung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels Gelelektrophorese. Der Kassettenhalter mit den beladenen Gelen wurde an eine Stromquelle mit 90 mA angeschlossen und für ca. 30 Minuten laufen gelassen. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Proteinmarker, der zur Überwachung des Elektrophoreselaufes herangezogen wurde, die Referenzlinie der Gelkassette erreicht hatte und demnach die Proteine nach Molekulargewicht aufgeteilt waren.

### **2.10.3 Methodik des Western-Blots**

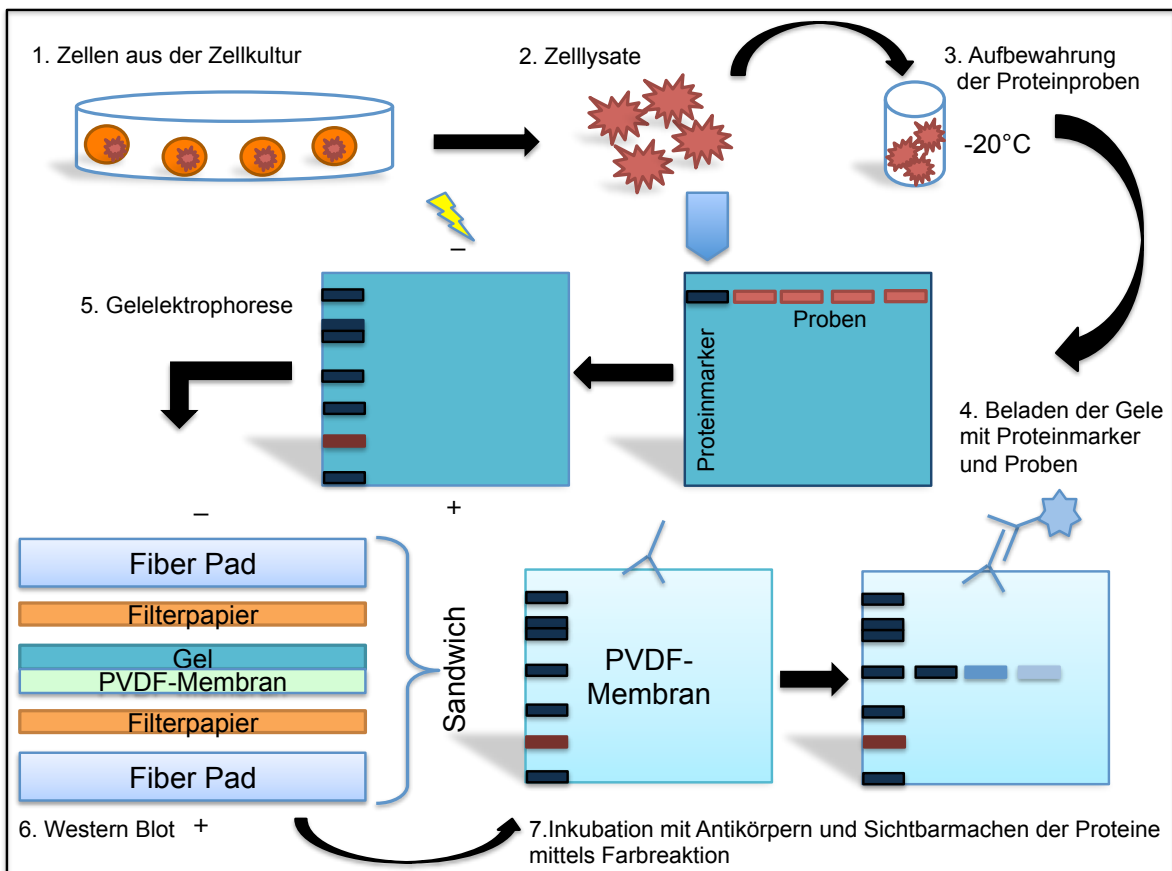
Die Gele mit den negativ geladenen Proteinen wurden vorsichtig aus der Gelkassette genommen und in Transferpuffer (10% von 10x Tris/Glycin-Puffer und 10% Methanol in destilliertem Wasser) im Sandwich-Verfahren (Schwamm, Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier, Schwamm) auf eine PVDF-Membran gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und der Membran befanden. Zuvor wurde die PVDF-Membran auf die richtige Größe zugeschnitten und für ca. 30 Sekunden in Methanol getränkt. Der „Sandwich“ wurde in eine vorgefertigte Kassette gespannt und in Transferpuffer zusammen mit einem Eisblock in einem Elektroblothing-Apparat bei 200 mA für eine Stunde geblohtet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Gel mit den negativ geladenen Proteinen in Richtung der Kathode und die Membran in Richtung der Anode ausgerichtet war. Bei diesem Blottingvorgang wanderten die Proteine vom Gel auf die Membran.

Die geblohtete Membran wurde daraufhin in Blockingpuffer (4% Milchpulver in PBS mit 0,05% Azid und 0,01% Tween) für drei Stunden auf einem Schüttler geblockt. Nach der Blockung wurde mit PBS für 3x5 Minuten gewaschen. Der Erstantikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 in Blockingpuffer verdünnt zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt und es erfolgte eine weitere Waschung mit PBS für 3x5 Minuten. Danach wurde der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:1000 in Blockingpuffer verdünnt zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Zweitantikörper entfernt, mit PBS für 3x5 Minuten gewaschen und die Proteine auf der Membran mittels Farbreaktion sichtbar gemacht. Um die Proteinbanden

sichtbar zu machen wurde der PVDF-Membran 15 ml Entwicklungspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) mit 50 µl BCIP und 100 µl NBT zugegeben. Durch leichtes Schwenken konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Die entwickelten Membranen mit den detektierten Proteinen wurden mit destilliertem Wasser gespült und daraufhin in lichtgeschützter Atmosphäre getrocknet. Nachdem die Membranen trocken waren, wurden diese eingescannt. Abbildung 5 zeigt schematisch die wichtigsten Schritte der Western-Blot-Analyse.



**Abbildung 5: Schaubild der Western-Blot-Analyse. Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte der Western-Blot-Untersuchungen.**



## 2.11 Immunfluoreszenzanalysen

Die Zellen der Zelllinie MCF7 wurden einen Tag vor der Versuchsdurchführung trypsinisiert, in Medium auf Deckgläsern angesetzt und unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die eine Hälfte der angesetzten Zellen mit 90  $\mu\text{M}$  Quercetin und die andere Hälfte mit frischem Medium für sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen für fünf Minuten in Methanol, das auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurde, fixiert.

Die Zellen wurden für 3x5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor der Erstantikörper in einer Konzentration von 1:200 (in PBS und 10% Pferdeserum verdünnt) dazugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde erneut für 3x5 Minuten mit PBS gespült. Danach wurde der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:500 (in PBS und 10% Pferdeserum verdünnt) dazu pipettiert und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Waschung mit PBS wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Filter von 460 nm Wellenlänge.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumshemmung von Tumorzellen durch Quercetin

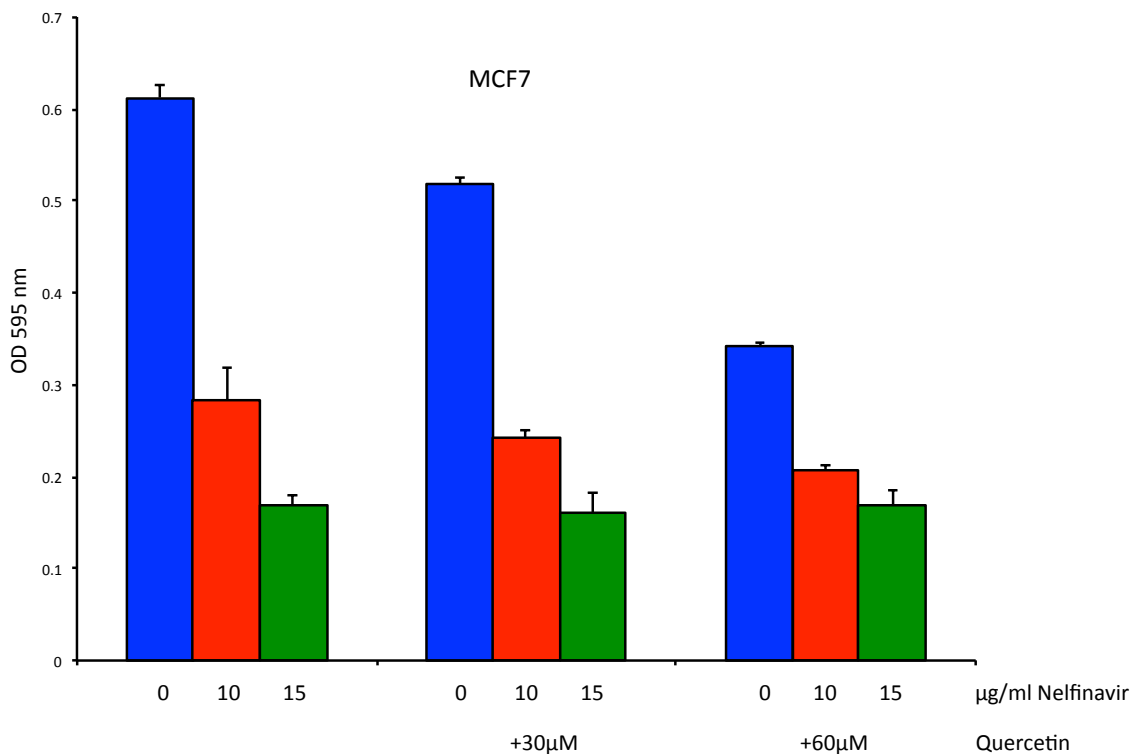
Der Protease-Inhibitor Nelfinavir wurde lange Zeit im Rahmen der HAART (Hochaktive antiretroviral Therapie) bei HIV-positiven Patienten eingesetzt. *In-vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Nelfinavir nicht nur eine antivirale Wirkung aufwies, sondern auch oxidativen Stress und ER-Stress induzierte sowie zum Zelltod in humanen Brustkrebszellen führte (Brüning et al., 2010). Die zusätzliche Gabe der Antioxidantien Glutathion und N-Acetyl-Cystein verringerte die Zytotoxizität von Nelfinavir auf die Brustkrebszellen (Brüning et al., 2010).

Da Quercetin ein bekanntes Antioxidans ist, wurde zunächst der Anteil lebender Zellen unter der Gabe von Nelfinavir und Quercetin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mittels MTT-Assay bestimmt. MCF7-Zellen wurden unter Zellkulturbedingungen mit Nelfinavir oder mit Quercetin alleine oder mit beiden zusammen für 48 Stunden inkubiert.

Die Ergebnisse des MTT-Assay zeigten, dass die Überlebensrate der Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 unter Inkubation mit 10 µg/ml und 15 µg/ml Nelfinavir im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert wurde. Quercetin zeigte jedoch als Antioxidans keinen zytoprotektiven Effekt auf die mit Nelfinavir behandelten MCF7-Zellen, sondern Quercetin verringerte ebenfalls, unabhängig von Nelfinavir, die Überlebensrate der Tumorzellen. Dabei zeigten steigende Konzentrationen von Quercetin (30 µM, 60 µM) eine stärkere Wachstumshemmung der MCF7-Tumorzellen. In Abbildung 6 erkennt man, dass Quercetin bereits alleine Wirkungen auf das Überleben der Tumorzellen hat (blaue Balken).

Quercetin wirkte somit als Antioxidans nicht zytoprotektiv, sondern hemmte wie Nelfinavir das Wachstum der Tumorzellen unter alleiniger Inkubation.

## Ergebnisse



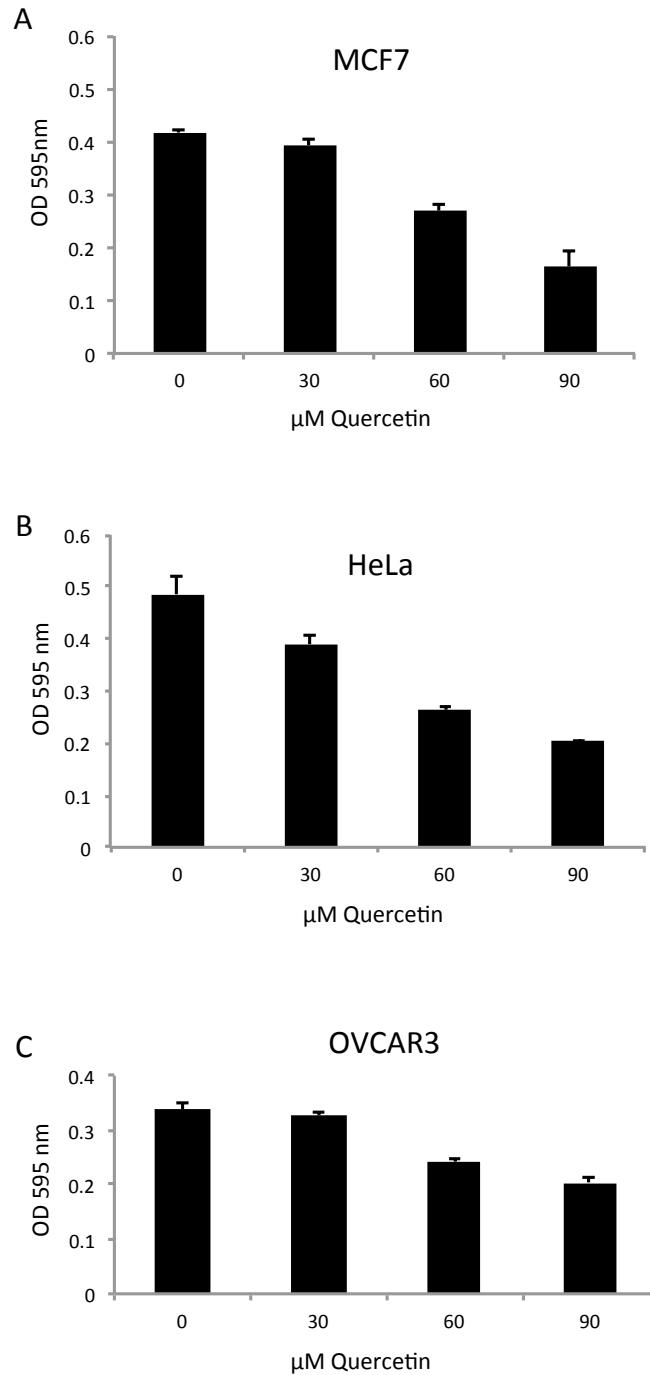
**Abbildung 6: Wachstumshemmung von MCF7-Tumorzellen durch Nelfinavir und Quercetin.** Die MCF7-Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Quercetin und Nelfinavir für 48 h inkubiert und anschließend mittels MTT-Assay analysiert. Steigende Konzentrationen von Nelfinavir oder Quercetin führten zu einer verringerten Zellviabilität der MCF7-Tumorzellen. Quercetin zeigte keine zytoprotektiven Effekte unter Nelfinavir Behandlung. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Reader.

Um die Wirkung ansteigender Konzentrationen von Quercetin auf humane Tumorzelllinien zu bestimmen, wurden neben Zellen der Brustkrebszelllinie MCF7 auch Zellen der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR3 für den MTT-Assay verwendet. Die Tumorzellen wurden für 48 Stunden mit steigenden Konzentrationen Quercetin (30 µM, 60 µM oder 90 µM) unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend die Überlebensrate mittels ELISA-Reader analysiert.

Steigende Konzentrationen von Quercetin waren mit einer höheren Zytotoxizität auf MCF7-, HeLa- und OVCAR3-Tumorzellen assoziiert. Abbildung 7 zeigt die

## Ergebnisse

Ergebnisse des konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effektes von Quercetin auf die Tumorzellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.



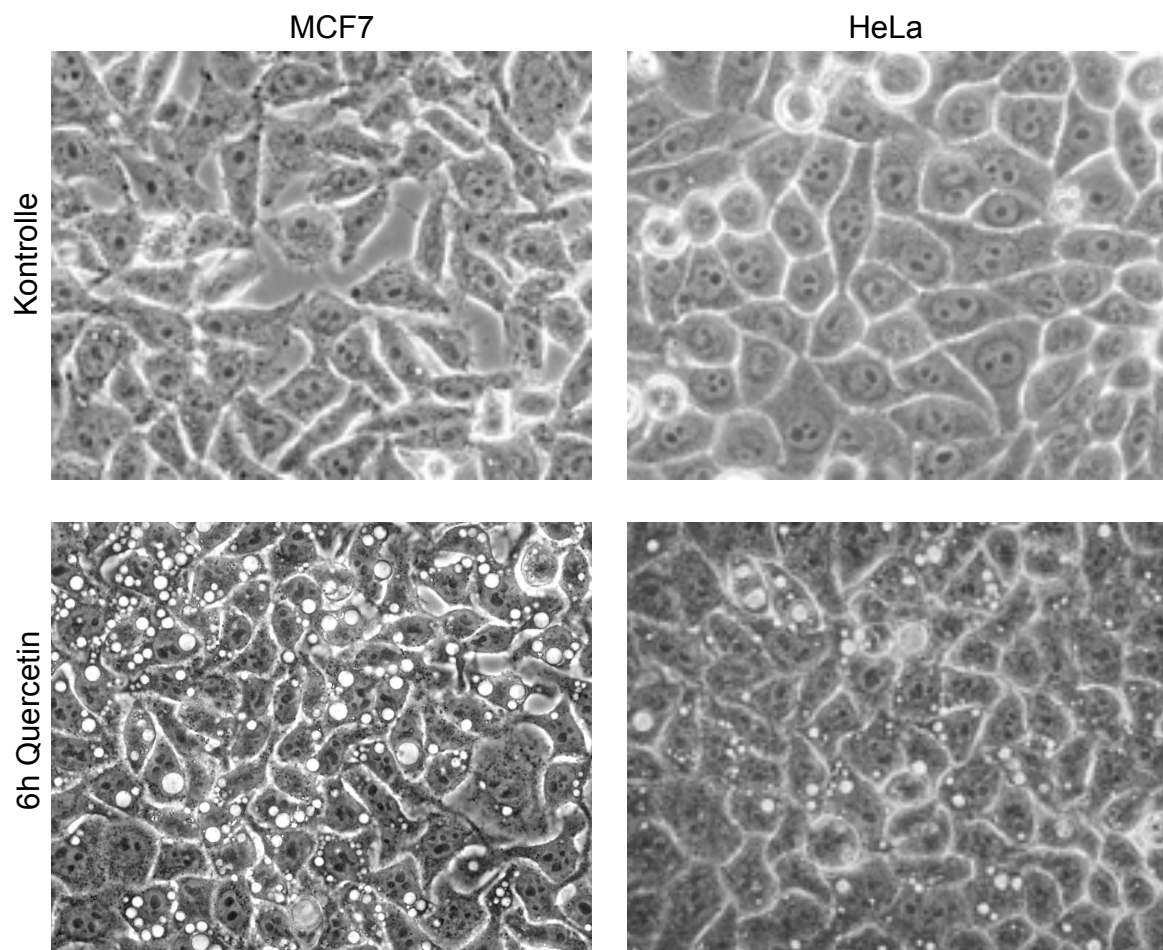
**Abbildung 7: Wachstumshemmung von MCF7-, HeLa- und OVCAR3-Tumorzellen durch Quercetin.** MCF7-, HeLa- und OVCAR3-Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Quercetin für 48 h inkubiert und anschließend mittels MTT-Assay analysiert. Steigende Konzentrationen von Quercetin führten zu einer verringerten Zellviabilität der Tumorzellen.

### 3.2 Zellmorphologische Veränderungen durch Quercetin

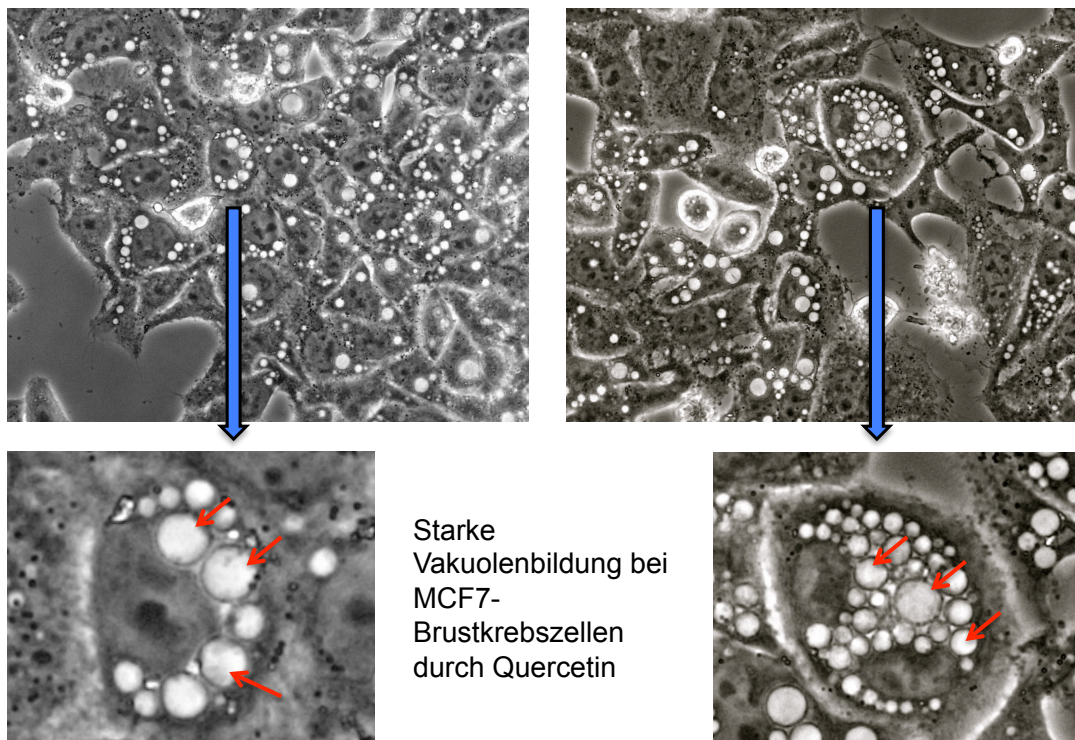
Insbesondere bei höheren Quercetin-Konzentrationen wurden auffallende morphologische Veränderungen in den Tumorzellen festgestellt. Um diese morphologische Veränderung durch Quercetin auf die Tumorzellen genauer zu bestimmen wurden zunächst Phasenkontrastuntersuchungen durchgeführt. Zellen der Brustkrebszelllinie MCF7 und Zellen der Zervixkarzinomzelllinie HeLa wurden für sechs Stunden mit 90  $\mu\text{M}$  Quercetin oder für 24 Stunden mit 60  $\mu\text{M}$  Quercetin unter Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend im Phasenkontrastmikroskop untersucht.

In beiden Fällen wurde eine starke Vakuolenbildung festgestellt. Dabei zeigte sich schon nach wenigen Stunden Inkubationszeit eine Vakuolenbildung, die sich durch längere Inkubationszeiten noch verstärkte. Längere Inkubationszeiten mit steigenden Konzentrationen von Quercetin (60  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$ ) führten bis hin zum Ablösen der epithelialen Zellen und zu Apoptose. Die Bildung der Vakuolen war dabei konzentrations- und zeitabhängig. Im Gegensatz zu den behandelten Zellen zeigten die unbehandelten Zellen keine ausgeprägte Vakuolenbildung. In Voruntersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe konnten ähnliche morphologische Veränderungen durch Nelfinavir festgestellt werden (Brüning et al. 2009).

Die Ätiologie der Vakuolen durch die Quercetin-Behandlung wurde in weiteren Versuchen genauer untersucht. Morphologische Veränderungen von MCF7- und HeLa-Tumorzellen, die mit 90  $\mu\text{M}$  Quercetin bei einer Inkubationszeit von sechs Stunden fotografiert wurden, sind in Abbildung 8 und 9 dargestellt.



**Abbildung 8: Phasenkontrastuntersuchungen von MCF7- und HeLa-Tumorzellen mit oder ohne Quercetin. Die Zellen der Zelllinien MCF7 und HeLa wurden mit 90  $\mu$ M Quercetin für 6 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Morphologisch zeigte sich eine deutliche Vakuolenbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Zellen wurden mit dem 40er-Objektiv fotografiert.**



**Abbildung 9: Vakuolenbildung bei MCF7-Brustkrebszellen durch Quercetin. Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt bei einer Inkubationszeit von 6 h mit 90  $\mu$ M Quercetin eine deutliche Vakuolenbildung (beispielhaft durch rote Pfeile markiert) bei MCF7-Brustkrebszellen. Die Zellen wurden mit dem 40er-Objektiv fotografiert.**

### 3.3 Induktion von Autophagie durch Quercetin

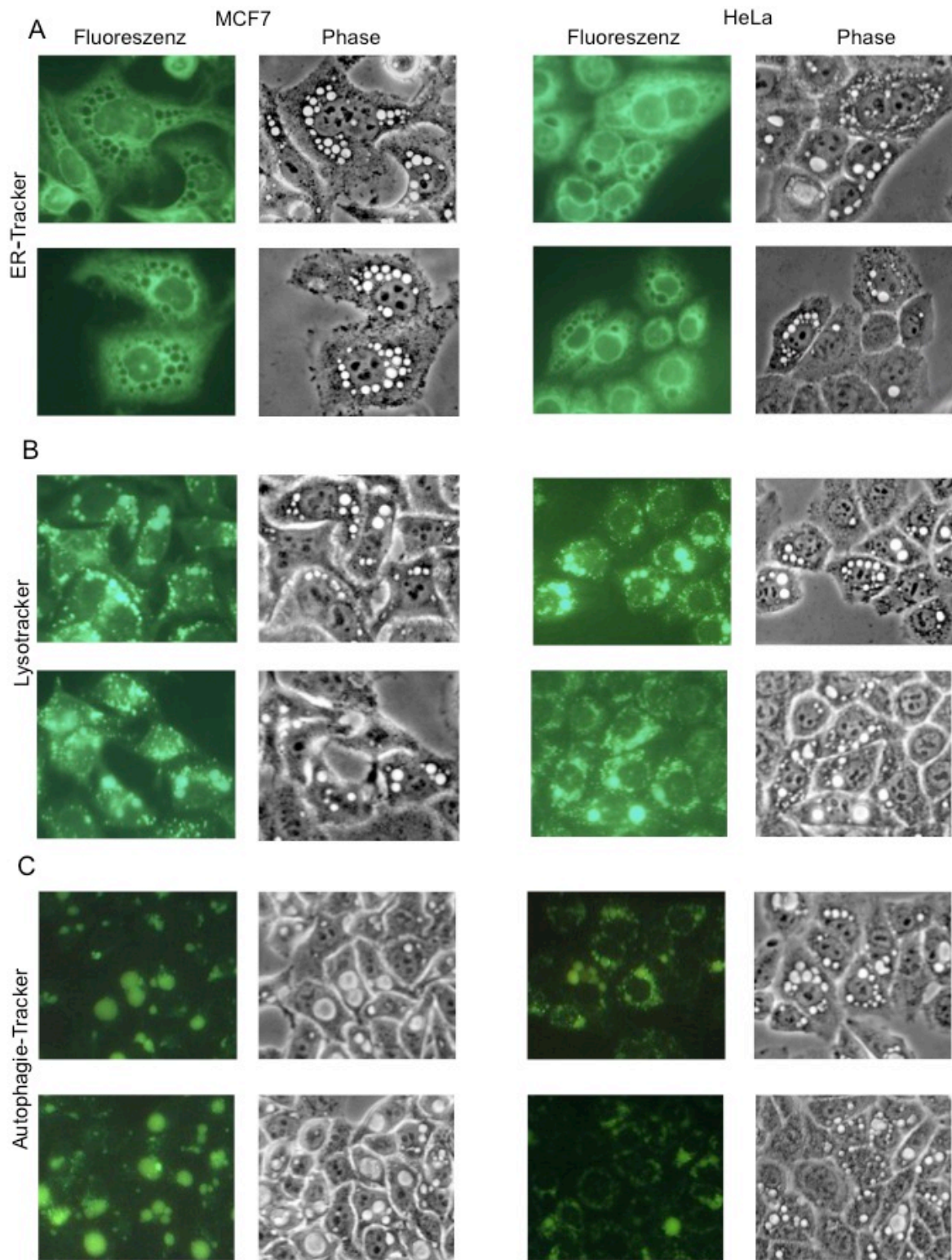
Die bei dem Protease-Inhibitor Nelfinavir gefundene Vakuolenbildung in Tumorzellen konnten von der gleichen Arbeitsgruppe als Schwellung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beschrieben werden (Brüning et al., 2009). Um die Ätiologie der Vakuolenbildung durch Quercetin genauer zu bestimmen, wurden gegen spezifische Zellorganellen gerichtete Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Die Färbung erfolgte mittels ER-Tracker, LysoTracker und Autophagie-Tracker. MCF7- und HeLa-Tumorzellen wurden für sechs Stunden mit 90  $\mu$ M Quercetin inkubiert und anschließend mit den Fluoreszenzfarbstoffen in einer Konzentration von 1:1000 für weitere 30 Minuten unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen alleine für

ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

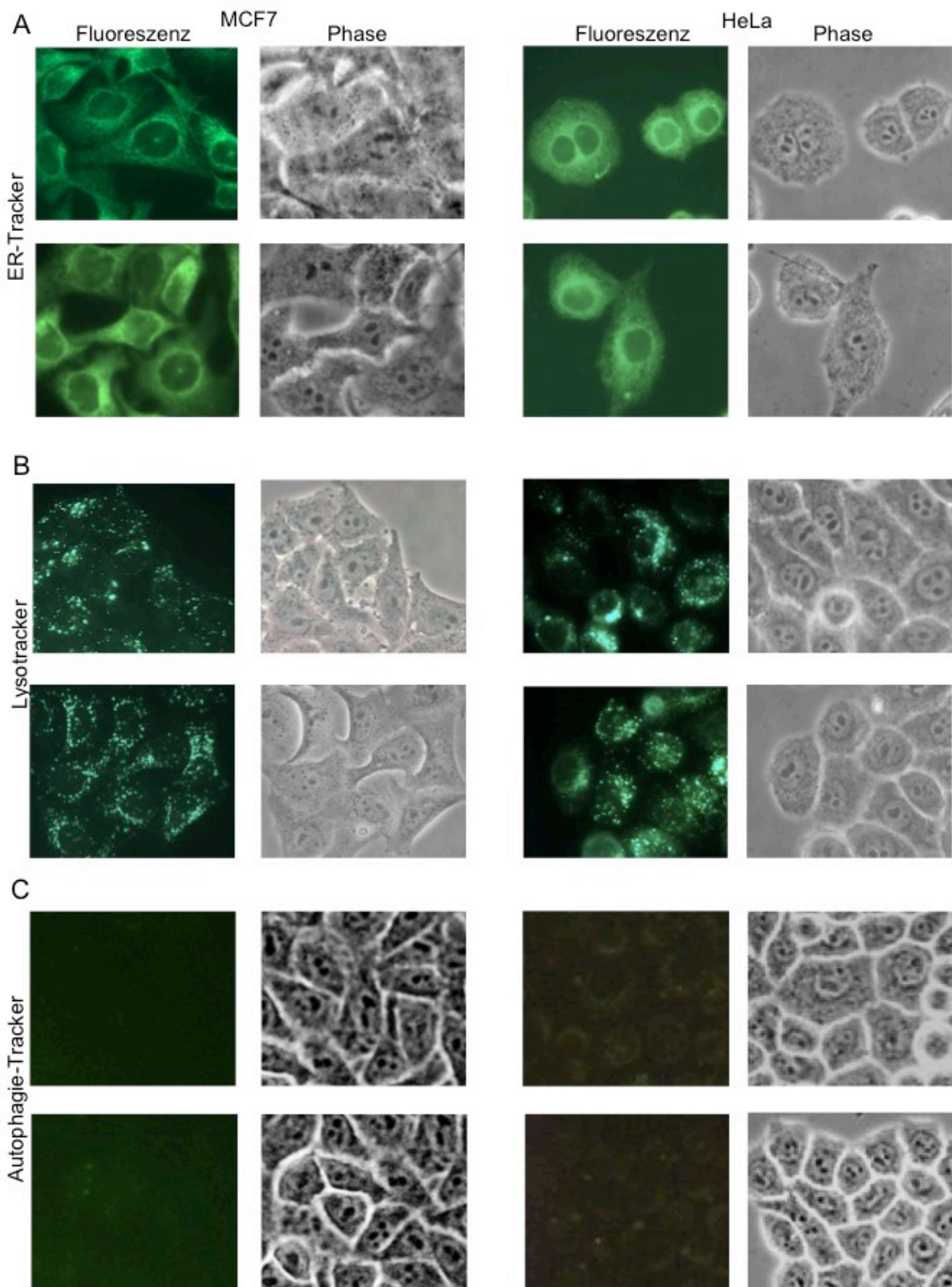
Da ER-Membranen sowohl von ER-Stress als auch von Autophagie beeinflusst werden, wurde zunächst ein Farbstoff verwendet, der spezifisch an einen Ionenkanal des Endoplasmatischen Retikulums bindet. Die mit Quercetin behandelten Tumorzellen zeigten neben normalen ER-Strukturen eine zirkuläre Färbung um die Vakuolen herum (siehe Abbildung 10A). Daraus konnte man schließen, dass die Membranen der Vakuolen wohl aus dem ER stammten. Um den möglichen Inhalt der Vakuolen weiter zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem LysoTracker gefärbt, der spezifisch Lysosomen und daher saure Kompartimente darstellt. Dabei zeigte sich eine starke Fluoreszenzfärbung des Vakuoleninhaltes, ein Hinweis darauf, dass der Inhalt proteolytische Enzyme aus Lysosomen enthielt (siehe Abbildung 10B). Da Autophagie mit der Formation von Autolysosomen einhergeht, wobei Lysosomen mit Autophagosomen verschmelzen, war die Färbung der Vakuolen mittels LysoTracker ein starker Hinweis auf die Induktion von Autophagie durch Quercetin. Um den Prozess der Autophagie weiter zu untersuchen, wurde ein Autophagie-Tracker für die Fluoreszenzuntersuchungen verwendet. Dabei zeigte sich ebenfalls eine starke Fluoreszenzreaktion des Vakuoleninhaltes bei mit Quercetin behandelten Tumorzellen (siehe Abbildung 10C). Alle Fluoreszenzversuche deuten daher auf die Induktion von Autophagie bei Tumorzellen durch Quercetin hin.

Im Vergleich zu den mit Quercetin behandelten Tumorzellen zeigten sowohl die unbehandelten MCF7-Zellen, als auch die unbehandelten HeLa-Zellen normale ER-Strukturen. Bei beiden Tumorzelllinien stellten sich die Lysosomen regelrecht als kleine Pünktchen im Zytoplasma dar und Autophagie konnte bei den Kontrollen nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11).





**Abbildung 10: Induktion von Autophagie durch Quercetin bei HeLa- und MCF7-Tumorzellen.** Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 6 h mit Quercetin für weitere 30 min mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Die Zellen wurden mit dem 40er-Objektiv fotografiert. Genauere Erläuterungen siehe Fließtext.



**Abbildung 11: Fluoreszenzfärbung der Kontrollzellen. Sowohl HeLa-, als auch MCF7-Tumorzellen zeigten normale ER-Strukturen, regelrechte lysosomale Strukturen und keine Autophagie. Die Zellen wurden mit dem 40er-Objektiv fotografiert. Genauere Erläuterungen siehe Fließtext.**

### **3.4 Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin in Tumorzellen**

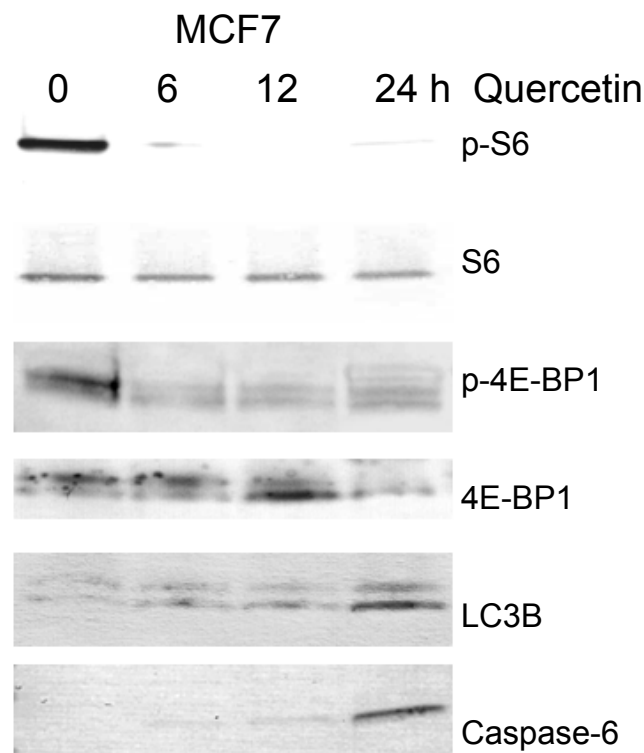
Quercetin zeigte eine starke Induktion von Autophagie bei den Tumorzelllinien MCF7 und HeLa, was durch die Fluoreszenzfärbungen genauer identifiziert wurde. mTOR ist ein zentraler Regulator von Zellwachstum, Zellmetabolismus, Zellproliferation und Zellüberleben. Dabei kontrolliert mTOR neben der Proteinbiosynthese auch Autophagie. Um die Ursache der starken Autophagie in den Tumorzellen durch Quercetin zu erklären, wurden diese hinsichtlich mTOR-Inhibition genauer untersucht. Die Aktivität des mTOR-Signalweges lässt sich durch den Phosphorylierungsstatus seiner Substrate 4E-BP1, p70S6-Kinase (auch kurz S6-Kinase) und S6 mittels Western-Blot-Technik bestimmen.

MCF7-, HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen wurden für die Western-Blot-Untersuchungen verwendet. Die Tumorzellen wurden entweder in einer Zeitkinetik von 0 h, 6 h, 12 h und 24 h (MCF7), in einer Kurzzeitkinetik von 0 h, 1.5 h, 3 h, 4.5 h (MCF7) oder als Negativ- und Positivkontrolle für 0 h und 2 h (HeLa und MDA-MB-453) mit 90 µM Quercetin inkubiert und anschließend auf die Expression von Proteinen des mTOR-Signalweges, Autophagie und Apoptose untersucht.

Die mit Quercetin behandelten Tumorzellen zeigten eine fast vollständige Inhibition des mTOR-Signalweges (siehe Abbildung 13 und 15). Diese Inhibition hielt für mehrere Stunden an und resultierte in der Induktion von Autophagie und schließlich von Apoptose. Die mTOR-Inhibition konnte in den Tumorzellen anhand der Dephosphorylierung der mTOR-Hauptsubstrate 4E-BP1, p70S6-Kinase und dem ribosomalen Protein S6 festgestellt werden. Die Inhibition des mTOR-Signalweges war ein früh-auftretender Effekt in den mit Quercetin behandelten Tumorzellen. Schon nach wenigen Stunden (6 h) zeigte sich eine Inhibition des mTOR-Signalweges in MCF7-Brustkrebszellen (siehe Abbildung 13). Dieser frühe Effekt der Inhibition des mTOR-Signalweges konnte in der Kurzzeitkinetik von MCF7-Brustkrebszellen und bei HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen nach 1.5 h bzw. 2 h Inkubationszeit mit Quercetin bestätigt werden (siehe Abbildungen 14-15). Aufgrund der Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin kam es auch zur Induktion von Autophagie, wie bereits in den Voruntersuchungen beschrieben wurde. Die Induktion von Autophagie durch Quercetin konnte nochmals auf molekularer Ebene durch die Western-Blot-Untersuchungen in MCF7-Tumorzellen

## Ergebnisse

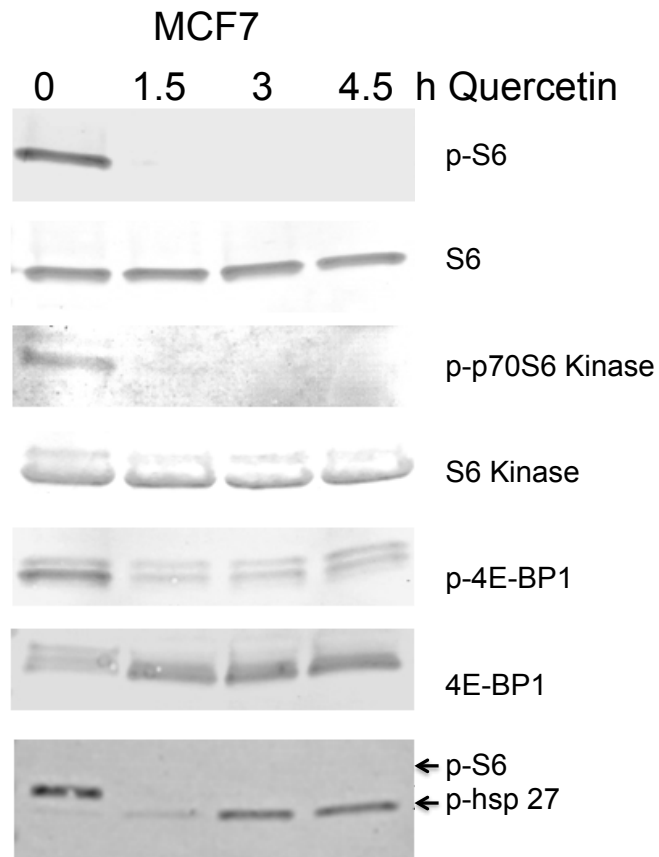
anhand des Nachweises von LC3B bestätigt werden (siehe Abbildung 13). Das LC3B-Protein ist eine lipidmodifizierte Isoform von LC3, das als Marker für Autophagie eingesetzt wird (Mizushima, 2004). Eine längere Behandlung mit Quercetin resultierte schließlich in der Induktion von Apoptose von MCF7-Tumorzellen. Dies konnte anhand des Auftretens eines enzymatisch aktiven Spaltproduktes von Caspase 6 gezeigt werden (siehe Abbildung 13). Neben den genannten Proteinen wurden MCF7-, HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen auch auf die Expression des kleinen Hitzeschockproteins hsp27 untersucht. Hsp27-Proteine helfen falschgefaltete Proteine in ihre richtige Struktur zu bringen und schützen vor programmiertem Zelltod (Jakob et al., 1993). Dabei zeigte sich, dass die mit Quercetin behandelten Tumorzellen hsp27 phosphorylierten und somit aktivierten (siehe Abbildung 14 und 15). Dies konnte als indirekter Indikator für Zellschädigung durch Quercetin und als Marker für falschgefaltete Proteine gesehen werden.



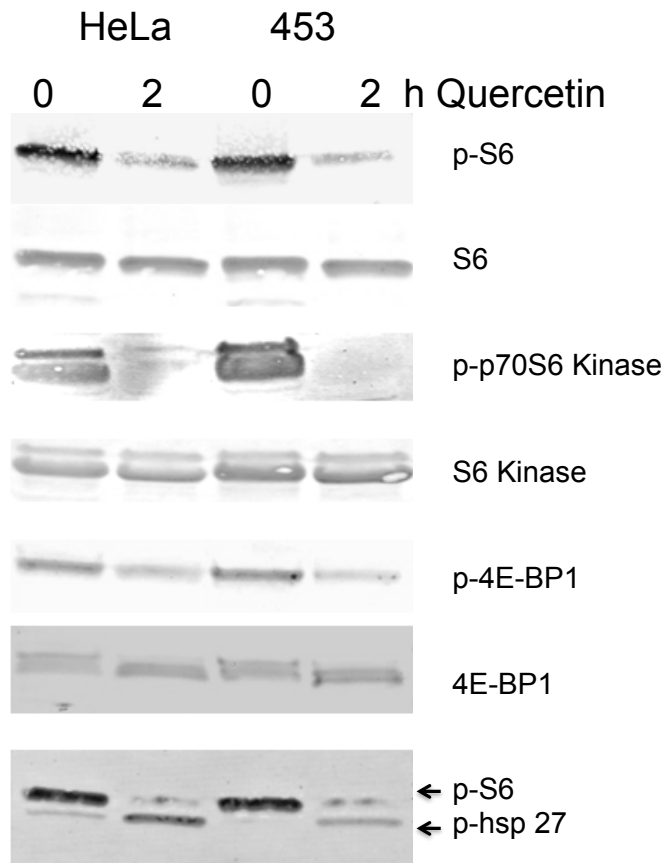
**Abbildung 12:** Inhibition des mTOR-Signalweges und Induktion von Apoptose bei MCF7-Tumorzellen durch Quercetin. Die Western-Blot-Untersuchung (Zeitkinetik) wurde mit 90  $\mu$ M Quercetin für die angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt. Quercetin führt zur Inhibition des mTOR-Signalweges. Dies war an der Dephosphorylierung seiner Substrate S6

## Ergebnisse

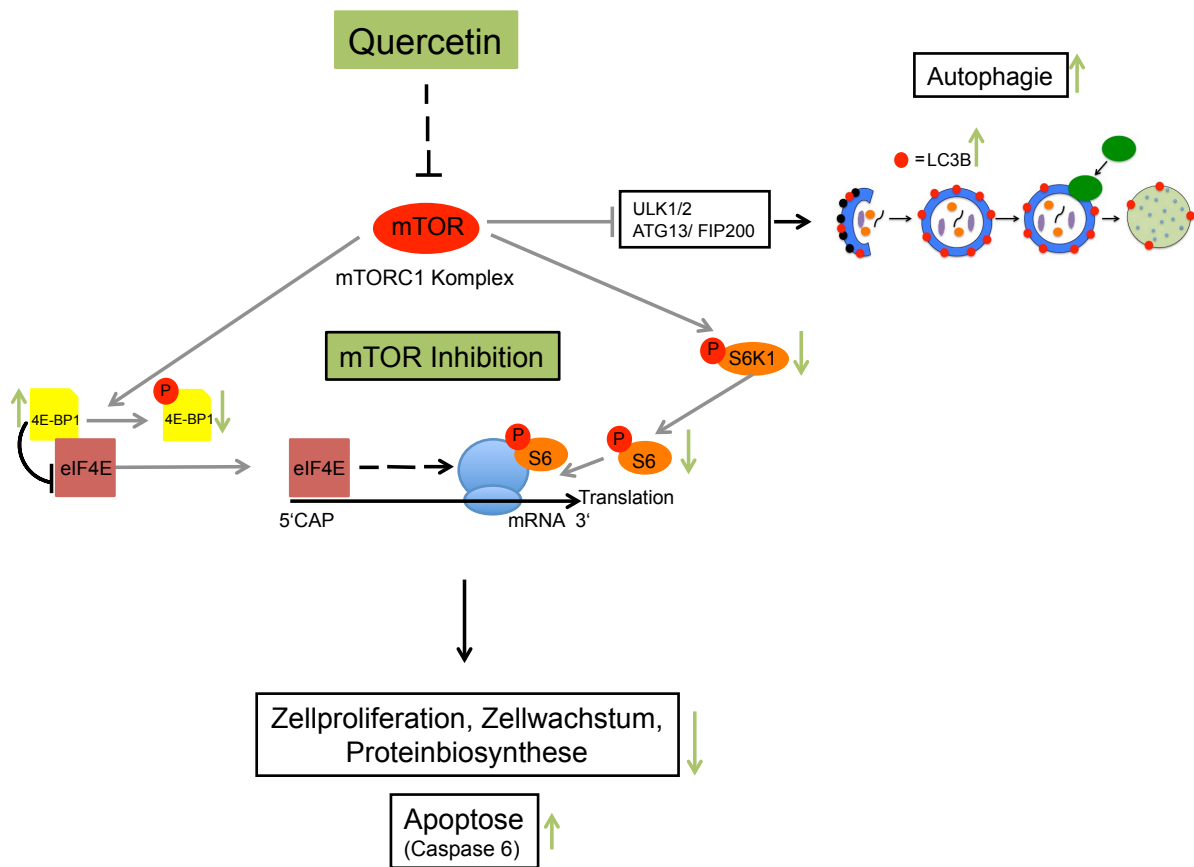
und 4E-BP1 zu erkennen. Auf molekularer Ebene konnte die Induktion von Autophagie anhand der Hochregulation von LC3B, einem Marker für Autophagie, bestätigt werden. Längere Inkubationszeiten (24h) mit Quercetin führten zur Induktion von Apoptose (Auftreten eines enzymatisch aktiven Spaltproduktes von Caspase 6).



**Abbildung 13: Inhibition des mTOR-Signalweges bei MCF7-Tumorzellen durch Quercetin.** Die Western-Blot-Untersuchung (Kurzzeitkinetik) wurden mit 90  $\mu\text{M}$  Quercetin für die angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt. Quercetin führt zur Inhibition des mTOR-Signalweges. Dies zeigte sich an der Dephosphorylierung seiner Substrate p70S6-Kinase, S6 und 4E-BP1. Außerdem konnte als Marker für falschgefaltete Proteine und als indirekter Indikator für Zellschädigung eine Phosphorylierung des hsp27-Proteins durch Quercetin gezeigt werden.



**Abbildung 14: Inhibition des mTOR-Signalweges bei HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen durch Quercetin. Die Western-Blot-Untersuchungen (Positiv- und Negativkontrolle) wurden mit 90  $\mu$ M Quercetin für die angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt. Quercetin führt zur Inhibition des mTOR-Signalweges. Wie bei MCF7-Tumorzellen zeigte sich ebenfalls eine Dephosphorylierung von p70S6-Kinase, S6 und 4E-BP1. Außerdem konnte als Marker für falschgefaltete Proteine und als indirekter Indikator für Zellschädigung, eine Phosphorylierung des hsp27-Proteins durch Quercetin gezeigt werden.**



**Abbildung 15: Wirkungsweise von Quercetin auf Tumorzellen.** Die Übersicht zeigt, dass Quercetin zur Inhibition des mTOR-Signalweges führt sowie Autophagie und Apoptose induziert. Die grünen Pfeile zeigen die einzelnen Auswirkungen von Quercetin auf den mTOR-Signalweg und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Tumorzellen an, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten. Dephosphorylierung von 4E-BP1, S6-Kinase und S6. Hochregulation von LC3B als Autophagie-Marker. Auftreten eines enzymatisch aktiven Spaltproduktes von Caspase 6 als Indikator für Apoptose.



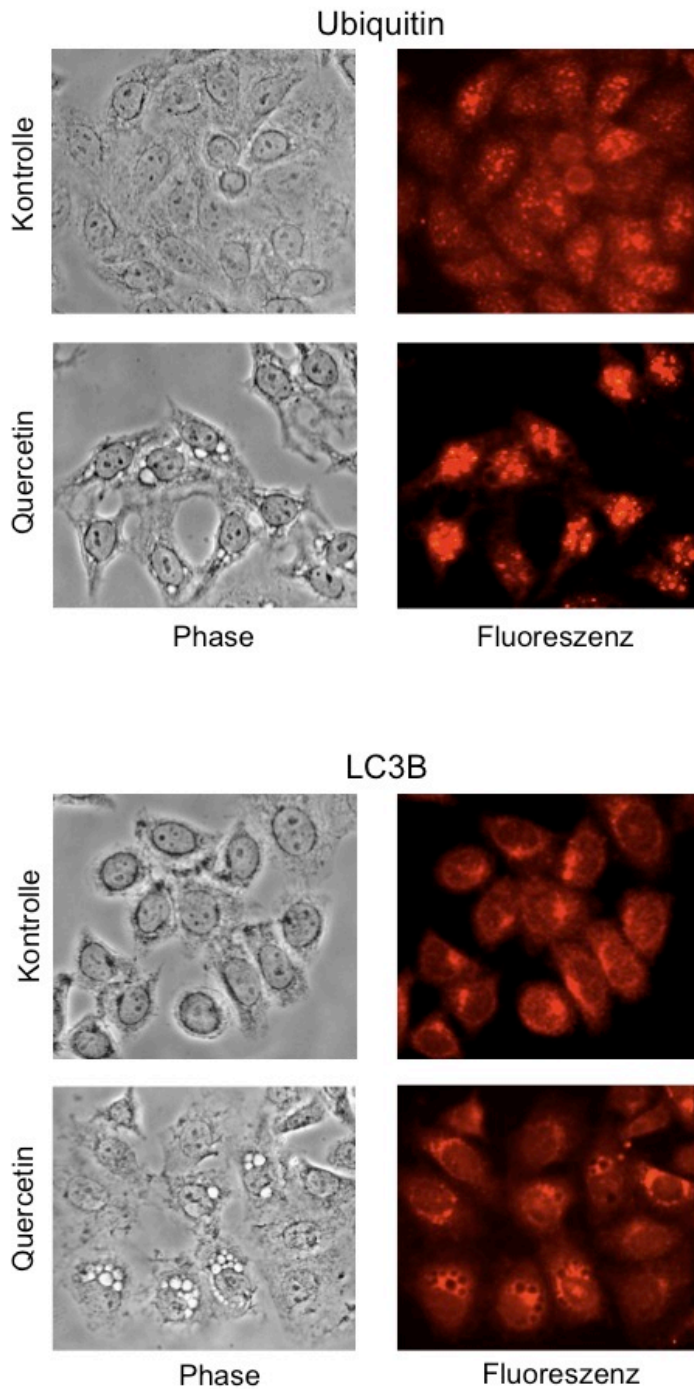
### **3.5 Bildung von Aggresomen durch Quercetin in MCF7-Tumorzellen**

Die Bildung von Aggresomen ist eine zelluläre Möglichkeit zur Inaktivierung falschgefalteter und möglicherweise toxischer Proteine in der Zelle (Johnston et al., 1998). Proteine werden normalerweise über das Ubiquitin-Proteasom-System oder durch Autophagie abgebaut. In der gleichen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Quercetin in Tumorzellen auch zur Inhibition des Proteasoms führte (Klappan et al., 2012). Die Inhibition des Proteasoms führt zur Induktion von Proteinaggregaten in der Zelle, die mittels Immunfluoreszenz analysiert werden können (Zhou et al., 2009).

MCF7-Tumorzellen wurden für sechs Stunden mit und ohne Quercetin (60  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurden diese in Methanol fixiert und entweder mit einem monoklonalen Erstantikörper gegen Ubiquitin oder LC3B inkubiert, gefolgt von einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper. Die Tumorzellen wurden daraufhin mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von Ubiquitin (um Proteinaggregate nachzuweisen) und LC3B (um Autophagie nachzuweisen) untersucht.

Die mit Quercetin behandelten Tumorzellen zeigten neben der Induktion von Autophagie auch die Bildung von Proteinaggregaten, sogenannten Aggresomen. Die Bildung von Aggresomen ließ sich auf die Inhibition des Proteasoms durch Quercetin zurückführen. Die falschgefalteten Proteine konnten daher nur noch durch Autophagie abgebaut werden. Aus der massiven Aggresomen-Bildung ließ sich allerdings schließen, dass die Kapazität der Zelle Proteine durch Autophagie abzubauen, überstiegen wurde. Im Gegensatz dazu konnte in den unbehandelten MCF7-Tumorzellen keine Autophagie und ebenfalls keine Proteinaggregate nachgewiesen werden. Die Färbung der unbehandelten MCF7-Zellen mit dem Ubiquitin-Antikörper zeigte eine feine Punktierung und keine Aggregate. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind in Abbildung 16 dargestellt.





**Abbildung 16: Quercetin induziert neben Autophagie (LC3B) auch die Bildung von Aggresomen (Akkumulation ubiquitinerter Proteine) in MCF7-Brustkrebszellen. MCF7-Brustkrebszellen wurden mit oder ohne Quercetin (60  $\mu$ M) für 6 h behandelt, anschließend in Methanol fixiert und entweder mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ubiquitin oder LC3B inkubiert, gefolgt von einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper. Die mit Quercetin behandelten Zellen zeigten sowohl eine Bildung von Aggresomen sowie die Induktion von Autophagie im Vergleich zur Kontrolle.**

## 4 Diskussion

In der modernen Krebstherapie werden neben den drei Säulen chirurgische Behandlung, Strahlentherapie und Chemotherapie immer häufiger sog. „targeted therapies“ (zielgerichtete Krebstherapien) eingesetzt. Ein bekanntes Beispiel für eine erfolgreiche „targeted therapy“ ist das Medikament Trastuzumab, das sich gegen die Rezeptortyrosinkinase Her-2/neu richtet und die Therapie bei Frauen mit Her-2/neu-positivem Mammakarzinom revolutioniert hat. Es wird daher intensiv an möglichen Angriffszielen (sog. Targets) für die Krebstherapie geforscht. Eines dieser Targets ist die Proteinkinase mTOR, die eine Schlüsselrolle in Zellproliferation und Zellüberleben spielt und häufig in Tumoren dereguliert ist. mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin und seine Rapaloge finden derzeit erfolgreich Anwendung in der Therapie einiger Tumorerkrankungen und neuere mTOR-Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien. Auch pflanzliche Stoffe spielen schon lange eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von Krebserkrankungen. Viele Chemotherapeutika wie z.B. Vinblastin und Paclitaxel sind sehr wirkungsvolle, aber auch nebenwirkungsstarke Substanzen pflanzlichen Ursprungs. Daher wird viel daran gesetzt auch natürliche Stoffe zu finden, dessen Wirkungsweise gegen bestimmte Targets, wie z.B. mTOR, gerichtet ist und die bessere Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Naturstoff Quercetin, ein Bioflavonoid, antitumorale Wirkungsweisen gegen MCF7-, HeLa- und OVCAR3-Tumorzellen hat. Um die Mechanismen dieser antitumoralen Wirkungsweise zu erklären, wurden Phasenkontrastuntersuchungen, Fluoreszenzfärbungen und, auf molekularer Ebene, biochemische Untersuchungen durchgeführt. Morphologisch zeigte sich eine starke Vakuolenbildung in den mit Quercetin behandelten MCF7- und HeLa-Tumorzellen. Weitere Untersuchungen identifizierten diese Vakuolen als Autophagosomen/Autolysosomen, die im Prozess der Autophagie vorkommen. Um die Ursache dieser starken Autophagie-Induktion in den Tumorzellen zu erklären, wurde auf molekularer Ebene der Autophagie-kontrollierende mTOR-Signalweg untersucht. Dabei zeigte sich, dass Quercetin ein potenter Inhibitor des mTOR-Signalweges in MCF7-, HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen ist. Dies wurde anhand der verminderten

Phosphorylierung der mTOR-Substrate 4E-BP1, p70S6-Kinase und dem ribosomalen Protein S6 gezeigt. Die Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin war ein sehr früher Effekt und ereignete sich schon kurze Zeit nach der Inkubation. Längere Inkubationszeiten mit Quercetin führten zur Autophagie und schließlich zur Induktion von Apoptose. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Quercetin seine proapoptotischen und antiproliferativen Effekte über die Inhibition des mTOR-Signalweges auslösen könnte. In diesem Abschnitt soll Quercetin als potentieller mTOR-Inhibitor in der Tumorthherapie diskutiert werden.

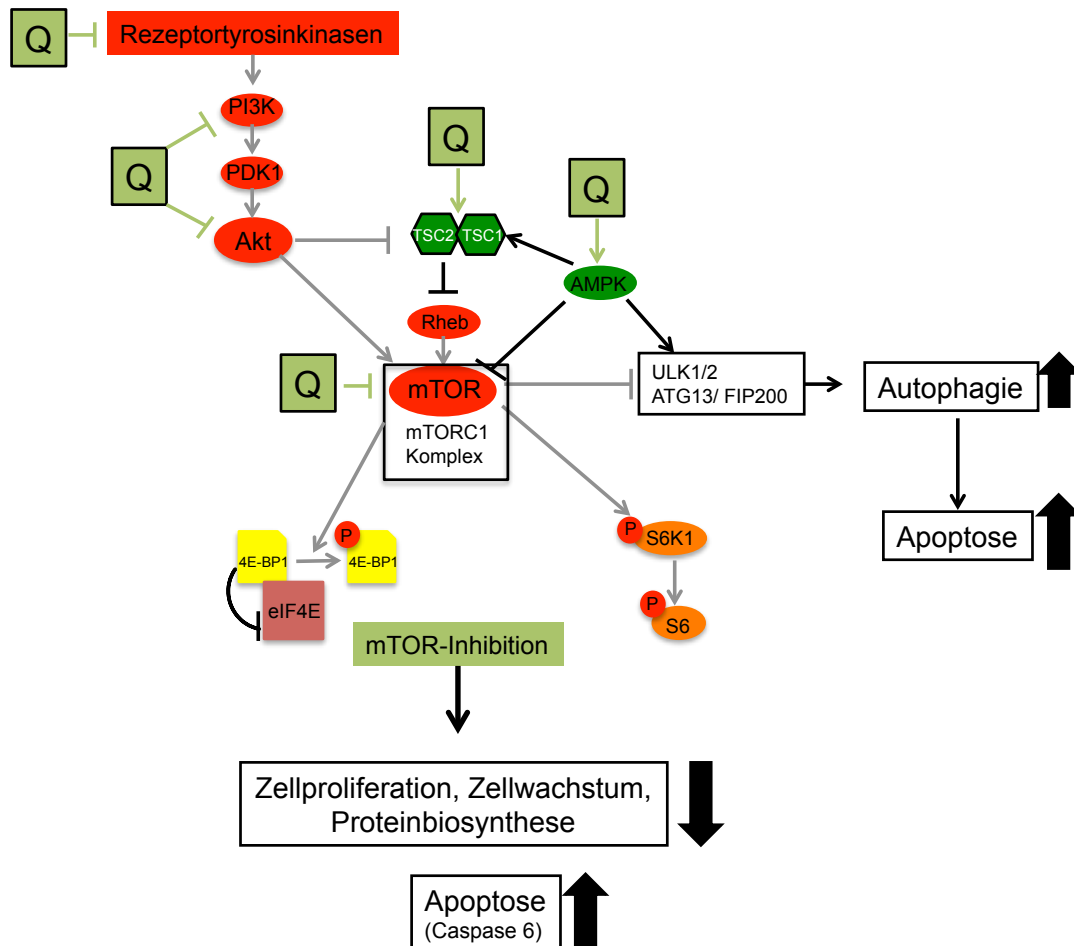
Der mTOR-Signalweg als Target für Quercetin in Tumorzellen scheint für dessen antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften verantwortlich zu sein, da mTOR ein zentraler Regulator von Zellwachstum, Zellproliferation und Zellüberleben ist. Zwei weitere Arbeitsgruppen unterstützen die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit. So konnte die eine Arbeitsgruppe eine verminderte Phosphorylierung von mTOR und dessen Substrat p70S6-Kinase durch Quercetin in Prostatakarzinomzelllinien zeigen (Pratheeshkumar et al., 2012). Die andere Arbeitsgruppe identifizierte die Hemmung von mTOR, p70S6-Kinase und 4E-BP1 durch Quercetin in Magenkarzinomzelllinien (Wang et al., 2011). Die Kinase mTOR wird über upstream gelegene Faktoren reguliert (siehe 1.6.2). Eine Inhibition bzw. Hochregulation von verschiedenen Faktoren im mTOR-Signalweg kann daher entscheidend zur mTOR-Aktivität beitragen. Eine der wichtigsten Aktivatoren von mTOR ist die ihm vorgeschaltete Kinase Akt (vgl. Abbildung 2), die ein zentraler Faktor in der Regulation von Apoptose und ein wichtiger Teil zellulärer Signalwege ist. Akt vorgeschaltet ist PI3K und der PI3K/Akt-Signalweg ist der Hauptsignalweg über den mTORC1 aktiviert wird. So beeinflusst eine Hemmung dieser beiden Faktoren auch die Aktivität von mTOR und diese kann zur mTOR-Inhibition positiv beitragen. Schon im Jahre 1992 konnte Matter et al. Quercetin als potenten PI3K-Inhibitor identifizieren (Matter et al., 1992). Weitere Studien bestätigten, dass Quercetin neben der Inhibition von PI3K auch Akt dephosphoryliert und damit hemmt (Gulati et al., 2006, Walker et al., 2000, Yuan et al., 2012). Eine spezifische Inhibition von mTORC1 durch z.B. Rapamycin und dessen Rapaloge kann in einigen Tumoren durch den vorhandenen mTOR-S6K1-IRS1 negativen Feedback-Loop (siehe Abbildung 2) zur Hochregulation des PI3K/Akt-Signalweges führen

und dadurch zur Resistenzentwicklung von Tumorzellen beitragen (O'Reilly et al., 2006). Somit besitzt Quercetin aufgrund seiner zusätzlichen Hemmung von PI3K und Akt den Vorteil als Dualer-PI3K-mTOR-Inhibitor zu fungieren und möglichen Resistenzentwicklungen von Tumorzellen entgegenzuwirken.

Ein weiterer wichtiger Regulator von mTOR ist die AMPK, die über den AMP/ATP-Spiegel der Zelle reguliert wird. Sie ist der wichtigste negative Regulator von mTOR und hemmt mTORC1 auf direktem und indirektem Weg (siehe 1.6.2.). So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass Quercetin seine proapoptotische Wirkung über die Hochregulation von AMPK ausübt (Jung et al., 2010, Kim et al., 2010). Als negativer Regulator von mTOR stellt die Aktivierung von AMPK durch Quercetin einen weiteren Faktor dar, der zur mTOR-Inhibition beiträgt. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Autophagie-Induktion in Tumorzellen konnte auf die Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin zurückgeführt werden. Der ULK1/2-ATG13-FIP200-Komplex ist für die Initiation von Autophagie notwendig und wird durch mTOR gehemmt (siehe 1.6.5). Da AMPK ULK1 direkt phosphoryliert und damit den ULK1/2-ATG13-FIP200-Komplex stabilisiert (Inoki et al., 2012, Kim et al., 2011), trägt die Hochregulation von AMPK durch Quercetin zusätzlich zur starken Autophagie-Induktion in Tumorzellen bei. Neben AMPK sind TSC1 und TSC2 zwei weitere negative Regulatoren von mTOR, deren Expression durch Quercetin hochreguliert werden konnte (Nair et al., 2004) und somit, ähnlich wie die Aktivierung von AMPK durch Quercetin, zur Inhibition des mTOR-Signalweges positiv beiträgt.

Die Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges ist abhängig von Membranrezeptoren, sogenannten Rezeptortyrosinkinasen, die über Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Zu diesen Rezeptoren zählen z.B. EGFR und Her-2/neu, die häufig in Tumoren hochreguliert sind und Targets für die moderne Krebstherapie darstellen. Nach Quercetin-Gabe zeigten HeLa-Tumorzellen eine verminderte Expression von EGFR (Jung et al., 2010) und Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien eine verminderte Expression von Her-2/neu (Jeong et al., 2008). Durch die verminderte Expression von Rezeptortyrosinkinasen durch Quercetin wird die Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges zusätzlich negativ beeinflusst. Die hier zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass der mTOR-Signalweg als mögliches Ziel für Quercetin in der Tumorthherapie in Betracht

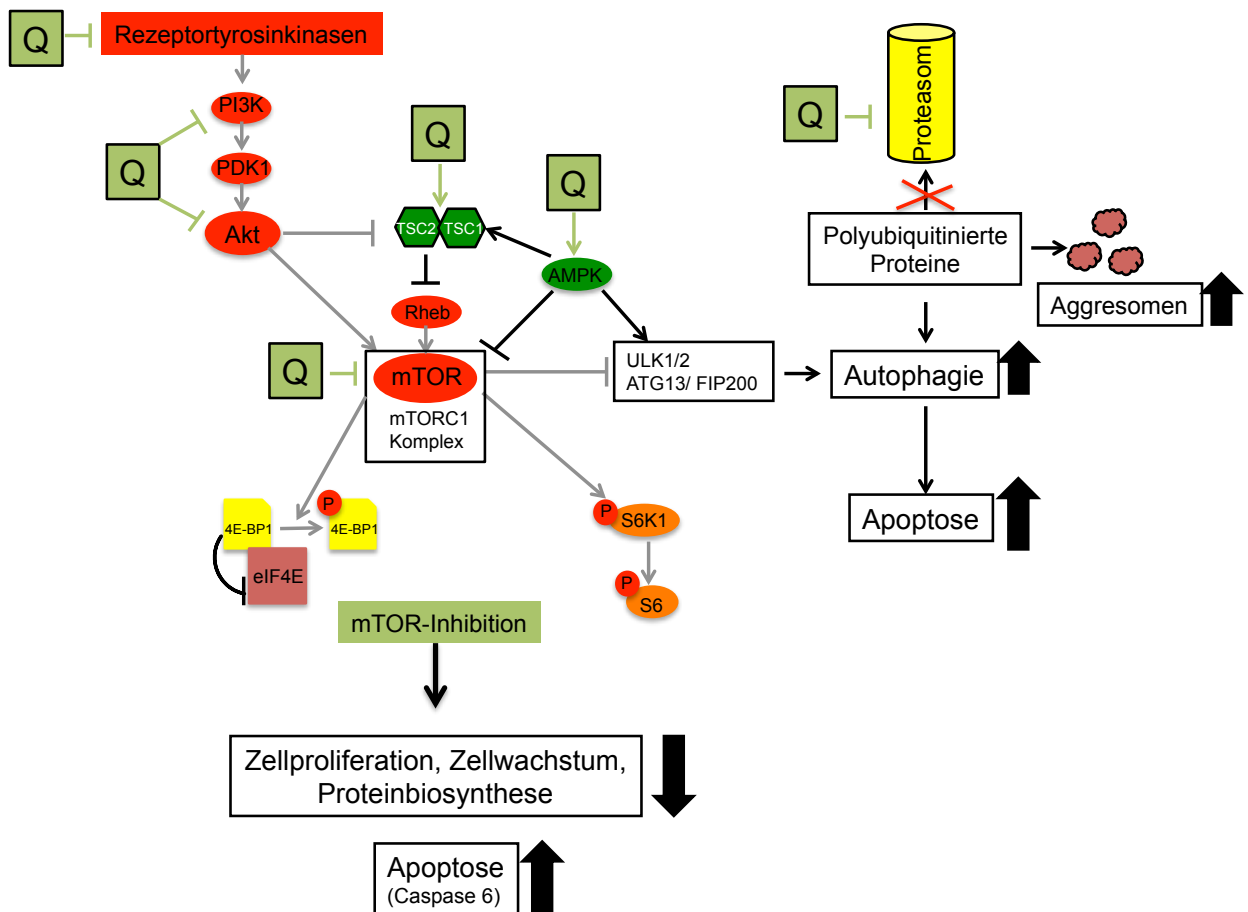
gezogen werden kann und dass dessen Hemmung zu den antiproliferativen und proapoptotischen Mechanismen von Quercetin entscheidend beiträgt. Abbildung 17 fasst die verschiedenen Angriffspunkte von Quercetin auf den mTOR-Signalweg, die in der vorliegenden Arbeit und in der aktuellen Literatur gezeigt werden konnten, vereinfacht zusammen.



**Abbildung 17: Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin (Q). Vereinfachte Darstellung der Auswirkungen von Quercetin auf den mTOR-Signalweg in Tumorzellen. Die dicken schwarzen Pfeile sollen die Auswirkungen von Quercetin durch die mTOR-Inhibition auf die Tumorzellen verdeutlichen. Die Grafik wurde auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und auf Basis folgender Quellen erstellt (Brüning, 2013, Gulati et al., 2006, Jeong et al., 2008, Jung et al., 2010, Kim et al., 2010, Matter et al., 1992, Nair et al., 2004, Pratheeshkumar et al., 2012, Wang et al., 2011, Yuan et al., 2012)**

Neben der Inhibition des mTOR-Signalweges und der daraus resultierenden starken Autophagie-Induktion durch Quercetin in Tumorzellen, konnte in der vorliegenden Arbeit auch die Bildung von polyubiquitinierten Proteinaggregaten, sogenannten Aggresomen, unter Quercetin-Behandlung mittels Immunfluoreszenz in MCF7-Tumorzellen identifiziert werden. Unter normalen Bedingungen werden falschgefaltete und beschädigte Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System oder durch Autophagie abgebaut. Da wir in unserer Arbeitsgruppe außerdem eine Inhibition der Proteasomaktivität durch Quercetin in Tumorzellen identifizieren konnten (Klappan et al., 2012), stellte Autophagie den einzigen Mechanismus dar, durch den die anfallenden Proteine abgebaut werden konnten. Allerdings zeigte die massive Bildung von Aggresomen unter der Quercetin-Behandlung auch, dass die Kapazität der Zelle diese Proteine durch Autophagie abzubauen überstiegen wurde (Zhou et al., 2009) und dies womöglich zusätzlich zur Induktion von Apoptose beitrug.

Das Proteasom spielt eine große Rolle in der Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und stellt daher ein wichtiges Target in der modernen Krebstherapie dar (Navon and Ciechanover, 2009). Bortezomib war der erste Proteasom-Inhibitor, der von der FDA für die Therapie des Multiplen Myeloms sowie des Mantellzellymphoms zugelassen wurde (Kane et al., 2003, Kane et al., 2007) und sich derzeit für die Therapie solider Tumore in klinischen Studien befindet. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir Quercetin als potenten Proteasom-Inhibitor identifizieren (Klappan et al., 2012). Dabei zeigte sich, dass Quercetin sehr effektiv alle drei katalytischen Einheiten des Proteasoms in Tumorzellen inhibierte, wohingegen Bortezomib im Vergleich dazu eine Präferenz zu einer bestimmten katalytischen Einheit aufwies (Klappan et al., 2012). Die Fähigkeit Quercetins neben der Inhibition des mTOR-Signalweges auch das Proteasom in Tumorzellen zu inhibieren, ermöglichen neue Einblicke in die antitumorale Wirkungsweise dieses Flavonoids und machen es interessant für die mögliche Anwendung in der Krebstherapie. In Abbildung 18 soll der Zusammenhang der mTOR- und Proteasom-Inhibition durch Quercetin und deren Auswirkungen auf Tumorzellen veranschaulicht werden.



**Abbildung 18: Zusammenhang zwischen der mTOR-Inhibition und der Proteasom-Inhibition durch Quercetin und deren Auswirkungen auf Tumorzellen. Die Grafik wurde auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und auf Basis folgender Quellen erstellt (Brüning, 2013, Gulati et al., 2006, Jeong et al., 2008, Jung et al., 2010, Kim et al., 2010, Klappan et al., 2012, Matter et al., 1992, Nair et al., 2004, Pratheeshkumar et al., 2012, Wang et al., 2011, Yuan et al., 2012)**

Viele präklinische Studien sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Quercetin eine vielversprechende Substanz für die Krebstherapie ist. Interessanterweise gibt es für die Substanz Quercetin, die antitumorale Wirkungsweisen gegen eine Vielzahl von Tumorzelllinien aufweist, relativ wenige klinische Studien, die die Anwendung von Quercetin in der Krebstherapie untersuchten. Eine Phase I Studie, die schon mehr als 15 Jahre zurückliegt, untersuchte die Wirkungsweise von Quercetin an 51 Krebspatienten, die nicht mehr auf eine Standardtherapie ansprachen (Ferry et al., 1996). Quercetin wurde intravenös in eskalierten Dosierungen in wöchentlichen oder dreiwöchentlichen Intervallen verabreicht (Ferry et al., 1996). Die erste Dosis lag bei 60 mg/m<sup>2</sup> und

die zehnte bei  $1700 \text{ mg/m}^2$  (Ferry et al., 1996). Dabei konnte bei einer Dosierung von  $945 \text{ mg/m}^2$  maximale Plasmakonzentrationen von 200-400  $\mu\text{M}$  erreicht werden, jedoch kam es sehr schnell zur Clearance von Quercetin und der Plasmaspiegel sank auf eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Ferry et al., 1996). Als Nebenwirkungen wurden Schmerzen an der Einstichstelle nach Injektion sowie Flushing angegeben (Ferry et al., 1996). Schwerwiegende und dosislimitierende Nebenwirkungen waren das Auftreten von schwerer Dyspnoe und Nephrotoxizität (Ferry et al., 1996). Eine hämatologische oder neurologische Toxizität konnte nicht festgestellt werden (Ferry et al., 1996). Zwei Patienten sprachen auf die Therapie mit Quercetin an (Ferry et al., 1996). Eine Ovarialkarzinompatientin zeigte eine Reduktion des Tumormarkers CA-125 und ein Leberkarzinompatient zeigte eine Reduktion des Tumormarkers  $\alpha$ -Fetoprotein (Ferry et al., 1996). Diese sehr vielversprechende Phase I Studie zeigte, dass maximale Plasmakonzentrationen von 200-400  $\mu\text{M}$  Quercetin erreicht werden konnten, die sogar über den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration von Quercetin lagen. Allerdings reduzierte sich die Plasmakonzentration von Quercetin sehr schnell auf eine nicht-wirksame Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Brüning, 2013, Ferry et al., 1996). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man jedoch deutlich schließen, dass die Induktion von Apoptose in Tumorzellen einer kontinuierlichen Inkubation von Quercetin in hohen Konzentrationen (60-90  $\mu\text{M}$ ) über einen langen Zeitraum (24 h) bedarf. Wenn dies wie in der oben genannten Studie nicht erreicht werden kann, könnten sich Tumorzellen sehr schnell an eine Quercetin-Behandlung adaptieren und erneut proliferieren (Brüning, 2013). Daneben stellen mTOR-Inhibition und Autophagie zellprotektive Mechanismen dar, die zunächst einen zytostatischen Effekt auf die Tumorzellen haben und sich diese dadurch schnell an eine Quercetin-Behandlung gewöhnen könnten (Brüning, 2013). Da die zytostatisch wirkenden mTOR-Inhibitoren (wie z.B. Everolimus) in Studien auch in Kombination mit anderen Therapieregimes vielversprechende Ergebnisse zeigten (Meric-Bernstam and Gonzalez-Angulo, 2009), könnte die Fähigkeit von Quercetin, den mTOR-Signalweg auf mehreren Ebenen zu inhibieren auch in Kombinationstherapie mit etablierten Krebstherapeutika genutzt werden. In verschiedenen *in-vitro*-Studien konnte sogar gezeigt werden, dass Quercetin als Chemosensitizer wirkte und den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika auf Tumorzellen verstärkte (Akbas et al., 2005, Chen et al., 2010, Chuang-Xin et al.,



2012, Jakubowicz-Gil et al., 2005, Kim et al., 1998, Scambia et al., 1990, Staedler et al., 2011, Wang et al., 2012). Somit sollte in zukünftigen Studien auch die Kombinationstherapie von Quercetin mit anderen Krebstherapeutika auf ihre Wirksamkeit geprüft werden (Brüning, 2013). Ein weiteres Problem in der Anwendbarkeit von Quercetin in der Krebstherapie stellt dessen schlechte Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit *in vivo* dar (Brüning, 2013, Gibellini et al., 2011). Im Körper wird Quercetin wohl in seiner wasserlöslichen und stabileren glucuronidierten Form transportiert, allerdings ist diese auch weniger zugänglich für Tumorzellen (Brüning, 2013). Um dieses Problem zu umgehen, wurden verschiedene Quercetin-Derivate hergestellt oder aus Pflanzen isoliert, die Quercetin schützen, dessen Aktivität, Bioverfügbarkeit, Wasserlöslichkeit und/oder Stabilität erhöhen (Brüning, 2013, Hirpara et al., 2009, Puoci et al., 2012). Eines diese Derivate, ein Aminosäuren-Derivat namens Q12, wurde bereits erfolgreich in einer Phase I Studie untersucht (Mulholland et al., 2001). Weiteren Derivate von Quercetin wurden bis dato nicht in klinischen Studien getestet. Eine andere Möglichkeit, die Anwendbarkeit von Quercetin zu verbessern, besteht in der Herstellung einer auf Quercetin basierenden chemischen Substanz, die als inaktive Prodrug gegeben wird, in Tumorzellen akkumuliert und dort durch überexprimierte Enzyme zu seiner aktiven Form gespalten werden könnte (Brüning, 2013).

Der mTOR-Signalweg und das Proteasom stellen wichtige Targets für die moderne Krebstherapie dar. Die Inhibition des mTOR-Signalweges sowie des Proteasoms durch Quercetin in Tumorzellen, ermöglichen nicht nur neue Einblicke in die Wirkungsweise dieser Substanz, sondern machen es auch sehr interessant für die mögliche Anwendung in der Krebstherapie. Besonders Tumoren, die eine Deregulierung im mTOR-Signalweg und Proteasom aufweisen, könnten für eine Behandlung mit Quercetin in Betracht gezogen werden. Eine erfolgreiche Tumorthherapie mit Quercetin bedarf allerdings einer ausreichend langen Inkubation in hohen Konzentrationen. Die biologischen und pharmakologischen Eigenschaften von Quercetin erfüllen derzeit nicht die Kriterien für die Anwendung in der Tumorthherapie. Neue Derivate sowie die Kombination von Quercetin mit anderen etablierten Krebsmedikamenten könnten in Zukunft die Anwendbarkeit von Quercetin in der Krebstherapie entscheidend verbessern und etablieren.

### 5 Zusammenfassung

Quercetin ist ein Bioflavonoid, das in vielen Pflanzen und pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommt. Schon seit langem ist es für seinen positiven gesundheitlichen Nutzen bekannt und wird für die Prävention und Therapie von Krebserkrankungen erforscht. Viele *in-vitro*-Studien belegen die antitumorale Wirkungsweise von Quercetin. Die genauen Mechanismen, die hinter dieser Wirkungsweise stecken, sind allerdings bis heute noch nicht vollständig verstanden.

Die Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin) ist ein zentraler Regulator von Zellproliferation und Zellwachstum. Viele Tumoren weisen eine Deregulierung im mTOR-Signalweg auf. Daher gewinnt mTOR als Target in der moderne Krebstherapie stetig an Bedeutung. mTOR-Inhibitoren wie z.B. Rapamycin und seine Rapaloge finden derzeit erfolgreich Anwendung in der Therapie einiger Tumore und neuere mTOR-Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien. Auch pflanzliche Stoffe spielen schon lange eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von Krebserkrankungen. Viele Chemotherapeutika wie z.B. Vinblastin und Paclitaxel sind sehr wirkungsvolle, leider aber auch sehr nebenwirkungsreiche Substanzen pflanzlichen Ursprungs. Daher wird viel daran gesetzt, auch natürliche Stoffe zu finden, deren Wirkungsweise gegen bestimmte Angriffsziele (sog. Targets), wie z.B. mTOR, gerichtet ist und die bessere Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von zellbiologischen, zellmorphologischen und molekularbiologischen Untersuchungen die Wirkungsweise von Quercetin auf Tumorzelllinien untersucht. Dabei konnte mittels MTT-Proliferationsassay gezeigt werden, dass Quercetin antitumorale Wirkungsweisen gegen MCF7-, HeLa- und OVCAR3-Tumorzelllinien hat. Um die Ursache dieser antitumoralen Wirkungsweise zu erklären, wurden Phasenkontrastuntersuchungen, Fluoreszenzfärbungen und, auf molekularer Ebene, Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Morphologisch zeigte sich eine starke Vakuolenbildung in den mit Quercetin behandelten MCF7- und HeLa-Tumorzellen. Weitere Untersuchungen identifizierten diese Vakuolenbildung als

Teil des Autophagie-Prozesses. Um die Ursache dieser starken Autophagie-Induktion in den Tumorzellen zu erklären, wurde auf molekularer Ebene der Autophagie-kontrollierende mTOR-Signalweg untersucht. Dabei zeigte sich, dass Quercetin ein potenter Inhibitor des mTOR-Signalweges in MCF7-, HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen ist. Dies wurde anhand der verminderten Phosphorylierung der mTOR-Substrate 4E-BP1, p70S6-Kinase und dem ribosomalen Protein S6 nachgewiesen. Die Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin war ein sehr früher Effekt und ereignete sich schon kurze Zeit nach Inkubationsbeginn. Längere Inkubationszeiten mit Quercetin führten zur Autophagie und schließlich zur Induktion von Apoptose. Neben der Induktion von Autophagie konnte mittels Immunfluoreszenz auch die Bildung von polyubiquitinierten Proteinaggregaten (sog. Aggresomen) unter Quercetin-Behandlung in MCF7-Tumorzellen nachgewiesen werden. Dies ließ sich auf die Inhibition des Proteasoms durch Quercetin erklären, ein weiterer Mechanismus von Quercetin, der in unserer Arbeitsgruppe identifiziert werden konnte.

Übereinstimmend mit anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Quercetin den mTOR-Signalweg auf mehreren Ebenen negativ beeinflusst. Diese Fähigkeit trägt entscheidend zu den antiproliferativen und antitumoralen Wirkungsweisen von Quercetin in Tumorzellen bei. Die Inhibition des mTOR-Signalweges und des Proteasoms durch Quercetin ermöglichen nicht nur neue Einblicke in die Wirkungsweise von Quercetin, sondern machen es auch interessant für die mögliche Anwendbarkeit in der Tumorthherapie. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit sowie Bioverfügbarkeit von Quercetin *in vivo* ist Quercetin-Aglykon derzeit für die Krebstherapie nicht geeignet. Allerdings könnten neue Derivate sowie die Kombination von Quercetin mit anderen etablierten Krebsmedikamenten oder die Herstellung einer auf Quercetin basierenden chemischen Substanz, die Anwendbarkeit von Quercetin in der Krebstherapie in Zukunft entscheidend verbessern und etablieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- AKBAS, S. H., TIMUR, M. & OZBEN, T. 2005. The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. *J Surg Res*, 125, 49-55.
- ALESSI, D. R., JAMES, S. R., DOWNES, C. P., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B. & COHEN, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr Biol*, 7, 261-9.
- ANASTASIUS, N., BOSTON, S., LACEY, M., STORING, N. & WHITEHEAD, S. A. 2009. Evidence that low-dose, long-term genistein treatment inhibits oestradiol-stimulated growth in MCF-7 cells by down-regulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116, 50-5.
- ARMENGOL, G., ROJO, F., CASTELLVI, J., IGLESIAS, C., CUATRECASAS, M., PONS, B., BASELGA, J. & RAMON Y CAJAL, S. 2007. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res*, 67, 7551-5.
- AVILA, M. A., VELASCO, J. A., CANSADO, J. & NOTARIO, V. 1994. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*, 54, 2424-8.
- AXE, E. L., WALKER, S. A., MANIFAVA, M., CHANDRA, P., RODERICK, H. L., HABERMANN, A., GRIFFITHS, G. & KTISTAKIS, N. T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182, 685-701.
- BARLUND, M., FOROZAN, F., KONONEN, J., BUBENDORF, L., CHEN, Y., BITTNER, M. L., TORHORST, J., HAAS, P., BUCHER, C., SAUTER, G., KALLIONIEMI, O. P. & KALLIONIEMI, A. 2000. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1252-9.
- BEEVERS, C. S., CHEN, L., LIU, L., LUO, Y., WEBSTER, N. J. & HUANG, S. 2009. Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer Res*, 69, 1000-8.
- BISCHOFF, S. C. 2008. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 733-40.
- BOBE, G., WEINSTEIN, S. J., ALBANES, D., HIRVONEN, T., ASHBY, J., TAYLOR, P. R., VIRTAMO, J. & STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z. 2008. Flavonoid intake and risk of pancreatic cancer in male smokers (Finland). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 553-62.

- BOLY, R., GRAS, T., LAMKAMI, T., GUISSOU, P., SERTEYN, D., KISS, R. & DUBOIS, J. 2011. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol*, 38, 833-42.
- BOOTS, A. W., HAENEN, G. R. & BAST, A. 2008. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585, 325-37.
- BRÜNING, A. 2013. Inhibition of mTOR signaling by quercetin in cancer treatment and prevention. *Anticancer Agents Med Chem*, 13, 1025-31.
- BRÜNING, A., BURGER, P., VOGEL, M., RAHMEH, M., GINGELMAIERS, A., FRIESE, K., LENHARD, M. & BURGESS, A. 2009. Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis. *Cancer Biol Ther*, 8, 226-32.
- BRÜNING, A., FRIESE, K., BURGESS, A. & MYLONAS, I. 2010. Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 12, R45.
- BULZOMI, P., GALLUZZO, P., BOLLI, A., LEONE, S., ACCONCIA, F. & MARINO, M. 2012. The pro-apoptotic effect of quercetin in cancer cell lines requires ERbeta-dependent signals. *J Cell Physiol*, 227, 1891-8.
- CELL SIGNALING TECHNOLOGY, I. 2008. *mTOR Signaling* [Online]. Cell Signaling Technology, Inc. Available: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/mTor.html> [Accessed 03/01 2013].
- CHEN, C., ZHOU, J. & JI, C. 2010. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sci*, 87, 333-8.
- CHIRUMBOLO, S. 2010. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 9, 263-85.
- CHIRUMBOLO, S. 2012. Role of quercetin in vascular physiology. *Can J Physiol Pharmacol*, 90, 1652-7.
- CHOI, E. J., BAE, S. M. & AHN, W. S. 2008. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res*, 31, 1281-5.
- CHOI, J. A., KIM, J. Y., LEE, J. Y., KANG, C. M., KWON, H. J., YOO, Y. D., KIM, T. W., LEE, Y. S. & LEE, S. J. 2001. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol*, 19, 837-44.
- CHUANG-XIN, L., WEN-YU, W., YAO, C., XIAO-YAN, L. & YUN, Z. 2012. Quercetin enhances the effects of 5-fluorouracil-mediated growth inhibition and apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting NF-kappaB. *Oncol Lett*, 4, 775-778.

- CROFT, K. D. 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 435-42.
- DE BENEDETTI, A. & GRAFF, J. R. 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*, 23, 3189-99.
- DENNIS, P. B., PULLEN, N., KOZMA, S. C. & THOMAS, G. 1996. The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases. *Mol Cell Biol*, 16, 6242-51.
- DUARTE, J., PEREZ-PALENCIA, R., VARGAS, F., OCETE, M. A., PEREZ-VIZCAINO, F., ZARZUELO, A. & TAMARGO, J. 2001. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 133, 117-24.
- DUMONT, F. J. & SU, Q. 1996. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci*, 58, 373-95.
- EDWARDS, R. L., LYON, T., LITWIN, S. E., RABOVSKY, A., SYMONS, J. D. & JALILI, T. 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr*, 137, 2405-11.
- EMA. 2007. *TORISEL* [Online]. European Medicines Agency. Available: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000799/human\\_med\\_001098.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000799/human_med_001098.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) [Accessed 04/04 2013].
- EMA. 2009. *AFINITOR* [Online]. European Medicines Agency. Available: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001038/human\\_med\\_000633.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001038/human_med_000633.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) [Accessed 04/04 2013].
- ENG, C. P., SEHGAL, S. N. & VEZINA, C. 1984. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*, 37, 1231-7.
- FAIVRE, S., KROEMER, G. & RAYMOND, E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 671-88.
- FDA. 2012. *AFINITOR* [Online]. FDA. Available: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/022334s016lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/022334s016lbl.pdf) [Accessed 04/04 2013].
- FELDMAN, M. E., APSEL, B., UOTILA, A., LOEWITH, R., KNIGHT, Z. A., RUGGERO, D. & SHOKAT, K. M. 2009. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, 7, e38.
- FERRY, D. R., SMITH, A., MALKHANDI, J., FYFE, D. W., DETAKATS, P. G., ANDERSON, D., BAKER, J. & KERR, D. J. 1996. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res*, 2, 659-68.

- FORMICA, J. V. & REGELSON, W. 1995. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 33, 1061-80.
- FRIAS, M. A., THOREEN, C. C., JAFFE, J. D., SCHRODER, W., SCULLEY, T., CARR, S. A. & SABATINI, D. M. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 16, 1865-70.
- GALLO, R., PADUREAN, A., JAYARAMAN, T., MARX, S., ROQUE, M., ADELMAN, S., CHESEBRO, J., FALLON, J., FUSTER, V., MARKS, A. & BADIMON, J. J. 1999. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*, 99, 2164-70.
- GANLEY, I. G., LAM DU, H., WANG, J., DING, X., CHEN, S. & JIANG, X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284, 12297-305.
- GIBELLINI, L., PINTI, M., NASI, M., MONTAGNA, J. P., DE BIASI, S., ROAT, E., BERTONCELLI, L., COOPER, E. L. & COSSARIZZA, A. 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 591356.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.
- GUERTIN, D. A., STEVENS, D. M., THOREEN, C. C., BURDS, A. A., KALAANY, N. Y., MOFFAT, J., BROWN, M., FITZGERALD, K. J. & SABATINI, D. M. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*, 11, 859-71.
- GULATI, N., LAUDET, B., ZOHRABIAN, V. M., MURALI, R. & JHANWAR-UNIYAL, M. 2006. The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer Res*, 26, 1177-81.
- GWINN, D. M., SHACKELFORD, D. B., EGAN, D. F., MIHAYLOVA, M. M., MERY, A., VASQUEZ, D. S., TURK, B. E. & SHAW, R. J. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-26.
- HALL, M. N. 2008. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*, 40, S5-8.
- HARA, K., MARUKI, Y., LONG, X., YOSHINO, K., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., TOKUNAGA, C., AVRUCH, J. & YONEZAWA, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177-89.
- HARRINGTON, L. S., FINDLAY, G. M., GRAY, A., TOLKACHEVA, T., WIGFIELD, S., REBHOLZ, H., BARNETT, J., LESLIE, N. R., CHENG, S., SHEPHERD, P. R., GOUT, I., DOWNES, C. P. & LAMB, R. F. 2004. The TSC1-2 tumor

- suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*, 166, 213-23.
- HARRINGTON, L. S., FINDLAY, G. M. & LAMB, R. F. 2005. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci*, 30, 35-42.
- HEITMAN, J., MOVVA, N. R. & HALL, M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905-9.
- HEROLD, G. 2010. *Innere Medizin unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis ; eine vorlesungsorientierte Darstellung*, Köln, -G. Herold.
- HERTOG, M. G., FESKENS, E. J., HOLLMAN, P. C., KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. 1993a. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-11.
- HERTOG, M. G., HOLLMAN, P. C., KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. 1993b. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*, 20, 21-9.
- HIRPARA, K. V., AGGARWAL, P., MUKHERJEE, A. J., JOSHI, N. & BURMAN, A. C. 2009. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability. *Anticancer Agents Med Chem*, 9, 138-61.
- HIRVONEN, T., VIRTAMO, J., KORHONEN, P., ALBANES, D. & PIETINEN, P. 2001. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control*, 12, 789-96.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J. L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20, 1981-91.
- INOKI, K., KIM, J. & GUAN, K. L. 2012. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 381-400.
- INOKI, K., LI, Y., XU, T. & GUAN, K. L. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17, 1829-34.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J. & GUAN, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 648-57.
- JAKOB, U., GAESTEL, M., ENGEL, K. & BUCHNER, J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268, 1517-20.
- JAKUBOWICZ-GIL, J., PADUCH, R., PIERSIAK, T., GLOWNIAK, K., GAWRON, A. & KANDEFER-SZERSZEN, M. 2005. The effect of quercetin on pro-



- apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochem Pharmacol*, 69, 1343-50.
- JEONG, J. H., AN, J. Y., KWON, Y. T., LI, L. Y. & LEE, Y. J. 2008. Quercetin-induced ubiquitination and down-regulation of Her-2/neu. *J Cell Biochem*, 105, 585-95.
- JIANG, H., SHANG, X., WU, H., GAUTAM, S. C., AL-HOLOU, S., LI, C., KUO, J., ZHANG, L. & CHOPP, M. 2009. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*, 8, 25-33.
- JOHNSTON, J. A., WARD, C. L. & KOPITO, R. R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143, 1883-98.
- JOSKOVA, M., FRANOVA, S. & SADLONOVA, V. 2011. Acute bronchodilator effect of quercetin in experimental allergic asthma. *Bratisl Lek Listy*, 112, 9-12.
- JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KUNDU, M. & KIM, D. H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20, 1992-2003.
- JUNG, J. H., LEE, J. O., KIM, J. H., LEE, S. K., YOU, G. Y., PARK, S. H., PARK, J. M., KIM, E. K., SUH, P. G., AN, J. K. & KIM, H. S. 2010. Quercetin suppresses HeLa cell viability via AMPK-induced HSP70 and EGFR down-regulation. *J Cell Physiol*, 223, 408-14.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., YAMAMOTO, A., KIRISAKO, T., NODA, T., KOMINAMI, E., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19, 5720-8.
- KANE, R. C., BROSS, P. F., FARRELL, A. T. & PAZDUR, R. 2003. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*, 8, 508-13.
- KANE, R. C., DAGHER, R., FARRELL, A., KO, C. W., SRIDHARA, R., JUSTICE, R. & PAZDUR, R. 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 13, 5291-4.
- KAUFMANN, M. 2006. *Die Gynäkologie mit 197 Tabellen*, Heidelberg, Springer.
- KEITH, C. T. & SCHREIBER, S. L. 1995. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science*, 270, 50-1.
- KELLY, G. S. 2011. Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev*, 16, 172-94.
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., LATEK, R. R., GUNTUR, K. V., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 11, 895-904.

- KIM, E., GORAKSHA-HICKS, P., LI, L., NEUFELD, T. P. & GUAN, K. L. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10, 935-45.
- KIM, H. J., KIM, S. K., KIM, B. S., LEE, S. H., PARK, Y. S., PARK, B. K., KIM, S. J., KIM, J., CHOI, C., KIM, J. S., CHO, S. D., JUNG, J. W., ROH, K. H., KANG, K. S. & JUNG, J. Y. 2010. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 58, 8643-50.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KIM, S. H., YEO, G. S., LIM, Y. S., KANG, C. D., KIM, C. M. & CHUNG, B. S. 1998. Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells. *Exp Mol Med*, 30, 87-92.
- KLAPPAN, A. K., HONES, S., MYLONAS, I. & BRÜNING, A. 2012. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol*, 137, 25-36.
- KNEKT, P., KUMPULAINEN, J., JARVINEN, R., RISSANEN, H., HELIOVAARA, M., REUNANEN, A., HAKULINEN, T. & AROMAA, A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, 76, 560-8.
- KUMAZAWA, Y., KAWAGUCHI, K. & TAKIMOTO, H. 2006. Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor alpha. *Curr Pharm Des*, 12, 4271-9.
- KUNZ, J., HENRIQUEZ, R., SCHNEIDER, U., DEUTER-REINHARD, M., MOVVA, N. R. & HALL, M. N. 1993. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*, 73, 585-96.
- KYLE, J. A., SHARP, L., LITTLE, J., DUTHIE, G. G. & MCNEILL, G. 2010. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. *Br J Nutr*, 103, 429-36.
- LAKHANPAL, P. & RAI, D. K. 2007. Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet J Med Update*, 2.
- LAMSON, D. W. & BRIGNALL, M. S. 2000. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev*, 5, 196-208.
- LAPLANTE, M. & SABATINI, D. M. 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122, 3589-94.
- LARSON, A. J., SYMONS, J. D. & JALILI, T. 2012. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr*, 3, 39-46.
- LOEWITH, R., JACINTO, E., WULLSCHLEGER, S., LORBERG, A., CRESPO, J. L., BONENFANT, D., OPPLIGER, W., JENOE, P. & HALL, M. N. 2002. Two

- TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 10, 457-68.
- LONGATTI, A. & TOOZE, S. A. 2009. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ*, 16, 956-65.
- LU, N., KHACHATOORIAN, R. & FRENCH, S. W. 2012. Quercetin: bioflavonoids as part of interferon-free hepatitis C therapy? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10, 619-21.
- MARTEL, R. R., KLICIUS, J. & GALET, S. 1977. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*, 55, 48-51.
- MATTER, W. F., BROWN, R. F. & VLAHOS, C. J. 1992. The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. *Biochem Biophys Res Commun*, 186, 624-31.
- MERIC-BERNSTAM, F. & GONZALEZ-ANGULO, A. M. 2009. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 27, 2278-87.
- MIZUSHIMA, N. 2004. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2491-502.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140, 313-26.
- MULHOLLAND, P. J., FERRY, D. R., ANDERSON, D., HUSSAIN, S. A., YOUNG, A. M., COOK, J. E., HODGKIN, E., SEYMOUR, L. W. & KERR, D. J. 2001. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. *Ann Oncol*, 12, 245-8.
- MURAKAMI, A., ASHIDA, H. & TERAOKA, J. 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett*, 269, 315-25.
- NAIR, H. K., RAO, K. V. K., AALINKEEL, R., MAHAJAN, S., CHAWDA, R. & SCHWARTZ, S. A. 2004. Inhibition of Prostate Cancer Cell Colony Formation by the Flavonoid Quercetin Correlates with Modulation of Specific Regulatory Genes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 11, 63-69.
- NAVON, A. & CIECHANOVER, A. 2009. The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem*, 284, 33713-8.
- NEUHOUSER, M. L. 2004. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer*, 50, 1-7.
- NIGRO, J. M., BAKER, S. J., PREISINGER, A. C., JESSUP, J. M., HOSTETTER, R., CLEARY, K., BIGNER, S. H., DAVIDSON, N., BAYLIN, S., DEVILEE, P. & ET AL. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342, 705-8.
- O'REILLY, K. E., ROJO, F., SHE, Q. B., SOLIT, D., MILLS, G. B., SMITH, D., LANE, H., HOFMANN, F., HICKLIN, D. J., LUDWIG, D. L., BASELGA, J. &

- ROSEN, N. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 66, 1500-8.
- OSSOLA, B., KAARIAINEN, T. M. & MANNISTO, P. T. 2009. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opin Drug Saf*, 8, 397-409.
- PANG, H. & FABER, L. E. 2001. Estrogen and rapamycin effects on cell cycle progression in T47D breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 70, 21-6.
- PAUSE, A., BELSHAM, G. J., GINGRAS, A. C., DONZE, O., LIN, T. A., LAWRENCE, J. C., JR. & SONENBERG, N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, 371, 762-7.
- PEARCE, L. R., HUANG, X., BOUDEAU, J., PAWLOWSKI, R., WULLSCHLEGER, S., DEAK, M., IBRAHIM, A. F., GOURLAY, R., MAGNUSON, M. A. & ALESSI, D. R. 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 405, 513-22.
- PETERSON, T. R., LAPLANTE, M., THOREEN, C. C., SANCAK, Y., KANG, S. A., KUEHL, W. M., GRAY, N. S. & SABATINI, D. M. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137, 873-86.
- POPULO, H., LOPES, J. M. & SOARES, P. 2012. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci*, 13, 1886-918.
- PRATHEESHKUMAR, P., BUDHRAJA, A., SON, Y. O., WANG, X., ZHANG, Z., DING, S., WANG, L., HITRON, A., LEE, J. C., XU, M., CHEN, G., LUO, J. & SHI, X. 2012. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PLoS One*, 7, e47516.
- PUOCI, F., MORELLI, C., CIRILLO, G., CURCIO, M., PARISI, O. I., MARIS, P., SISI, D. & PICCI, N. 2012. Anticancer activity of a quercetin-based polymer towards HeLa cancer cells. *Anticancer Res*, 32, 2843-7.
- READ, M. A. 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *Am J Pathol*, 147, 235-7.
- RUVINSKY, I. & MEYUHAS, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, 31, 342-8.
- SANCAK, Y., THOREEN, C. C., PETERSON, T. R., LINDQUIST, R. A., KANG, S. A., SPOONER, E., CARR, S. A. & SABATINI, D. M. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25, 903-15.
- SANSAL, I. & SELLERS, W. R. 2004. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*, 22, 2954-63.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004.

- Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SCAMBIA, G., RANELLETTI, F. O., BENEDETTI PANICI, P., BONANNO, G., DE VINCENZO, R., PIANTELLI, M. & MANCUSO, S. 1990. Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth. *Anticancer Drugs*, 1, 45-8.
- SCAMBIA, G., RANELLETTI, F. O., BENEDETTI PANICI, P., PIANTELLI, M., BONANNO, G., DE VINCENZO, R., FERRANDINA, G., PIERELLI, L., CAPELLI, A. & MANCUSO, S. 1991. Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen-receptor-negative MCF-7 human breast-cancer cell line expressing type II estrogen-binding sites. *Cancer Chemother Pharmacol*, 28, 255-8.
- SCAMBIA, G., RANELLETTI, F. O., PANICI, P. B., PIANTELLI, M., DE VINCENZO, R., FERRANDINA, G., BONANNO, G., CAPELLI, A. & MANCUSO, S. 1993. Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer*, 54, 462-6.
- SEBBAGH, M., OLSCHWANG, S., SANTONI, M. J. & BORG, J. P. 2011. The LKB1 complex-AMPK pathway: the tree that hides the forest. *Fam Cancer*, 10, 415-24.
- SEUFFERLEIN, T. & ROZENGURT, E. 1996. Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 56, 3895-7.
- SHAH, O. J., WANG, Z. & HUNTER, T. 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol*, 14, 1650-6.
- SHOSKES, D. A. & NICKEL, J. C. 2011. Quercetin for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urol Clin North Am*, 38, 279-84.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62, 10-29.
- STAEDLER, D., IDRIZI, E., KENZAOU, B. H. & JUILLERAT-JEANNERET, L. 2011. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68, 1161-72.
- STAMBOLIC, V., SUZUKI, A., DE LA POMPA, J. L., BROTHERS, G. M., MIRTSOS, C., SASAKI, T., RULAND, J., PENNINGER, J. M., SIDEROVSKI, D. P. & MAK, T. W. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95, 29-39.

- STEMKE-HALE, K., GONZALEZ-ANGULO, A. M., LLUCH, A., NEVE, R. M., KUO, W. L., DAVIES, M., CAREY, M., HU, Z., GUAN, Y., SAHIN, A., SYMMANS, W. F., PUSZTAI, L., NOLDEN, L. K., HORLINGS, H., BERNIS, K., HUNG, M. C., VAN DE VIJVER, M. J., VALERO, V., GRAY, J. W., BERNARDS, R., MILLS, G. B. & HENNESSY, B. T. 2008. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 68, 6084-91.
- THOREEN, C. C., KANG, S. A., CHANG, J. W., LIU, Q., ZHANG, J., GAO, Y., REICHLING, L. J., SIM, T., SABATINI, D. M. & GRAY, N. S. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, 284, 8023-32.
- TSUKADA, M. & OHSUMI, Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 333, 169-74.
- USDA. 2003. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods* [Online]. USDA. Available: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/flav.pdf> [Accessed 02/01 2013].
- VAN DER HEIJDEN, M. S. & BERNARDS, R. 2010. Inhibition of the PI3K pathway: hope we can believe in? *Clin Cancer Res*, 16, 3094-9.
- VAN DER POEL, H. G., HANRAHAN, C., ZHONG, H. & SIMONS, J. W. 2003. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res*, 30, 380-6.
- VEZINA, C., KUDELSKI, A. & SEHGAL, S. N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28, 721-6.
- WALKER, E. H., PACOLD, M. E., PERISIC, O., STEPHENS, L., HAWKINS, P. T., WYMAN, M. P. & WILLIAMS, R. L. 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell*, 6, 909-19.
- WANG, G., ZHANG, J., LIU, L., SHARMA, S. & DONG, Q. 2012. Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl. *PLoS One*, 7, e51764.
- WANG, K., LIU, R., LI, J., MAO, J., LEI, Y., WU, J., ZENG, J., ZHANG, T., WU, H., CHEN, L., HUANG, C. & WEI, Y. 2011. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1alpha-mediated signaling. *Autophagy*, 7, 966-78.
- WATZL, B. & RECHKEMMER, G. 2001. Basiswissen aktualisiert Flavonoide. *Ernährungs-Umschau*. UMSCHAU ZEITSCHRIFTENVERLAG GmbH.
- WHO. 2012. WHO. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Accessed 19/12 2012].

YUAN, Z., LONG, C., JUNMING, T., QIHUAN, L., YOUSHUN, Z. & CHAN, Z. 2012. Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. *Mol Biol Rep*, 39, 7785-93.

ZHOU, X., IKENOUE, T., CHEN, X., LI, L., INOKI, K. & GUAN, K. L. 2009. Rheb controls misfolded protein metabolism by inhibiting aggresome formation and autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8923-8.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
5'TOP mRNAs	5'-terminal-oligopyrimidine mRNAs
5'-UTRs	5'-untranslated terminal regions
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte-Proteinkinase
ATG	autophagy related gene
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Deptor	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epithelial growth factor receptor
eIF4A	eukaryotic initiation factor-4A
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4G	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER $\beta$	Östrogenrezeptor II/Östrogenrezeptor $\beta$
FKBP12	12 kDA großes FK506-bindendes Protein
FRAP	FKBP12-rapamycin-associated protein
FRB	FKBP12-Rapamycin-bindende Domäne
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HAART	Hochaktive antiretroviral Therapie
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
IGF	insulin-like growth factors/insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IgG	Immunglobulin G
IRS1	insulin receptor substrate 1
LC3	microtubule-associated protein light chain 3
LKB1	liver kinase B1
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mRNA	messenger RNA



## Abkürzungsverzeichnis

---

mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
p53	Tumorsuppressor p53
PBS	phosphate buffered saline
PKD1	phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIKK	PI3K-verwandte Proteinkinasen-Familie
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PRAS40	proline rich Akt substrate 40 kDa
Protor	protein observed with Rictor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAFT1	rapamycin and FKBP12 target
RAPT1	rapamycin target 1
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
rpm	rounds per minute
S6K1	p70 ribosomal protein S6-kinase 1
SEP	sirolimus effector protein
Thr	Threonin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Quercetin. ....	10
Abbildung 2: Der mTOR-Signalweg. ....	19
Abbildung 3: Der mTOR-Signalweg in Tumorzellen.....	21
Abbildung 4: Darstellung von Autophagie. ....	26
Abbildung 5: Schaubild der Western-Blot-Analyse.....	40
Abbildung 6: Wachstumshemmung von MCF7-Tumorzellen durch Nelfinavir und Quercetin.....	43
Abbildung 7: Wachstumshemmung von MCF7-, HeLa- und OVCAR3-Tumorzellen durch Quercetin.....	44
Abbildung 8: Phasenkontrastuntersuchungen von MCF7- und HeLa-Tumorzellen mit oder ohne Quercetin.....	46
Abbildung 9: Vakuolenbildung bei MCF7-Brustkrebszellen durch Quercetin.....	47
Abbildung 10: Induktion von Autophagie durch Quercetin bei HeLa- und MCF7-Tumorzellen. ....	49
Abbildung 11: Fluoreszenzfärbung der Kontrollzellen.....	50
Abbildung 12: Inhibition des mTOR-Signalweges und Induktion von Apoptose bei MCF7-Tumorzellen durch Quercetin.....	52
Abbildung 13: Inhibition des mTOR-Signalweges bei MCF7-Tumorzellen durch Quercetin.....	53
Abbildung 14: Inhibition des mTOR-Signalweges bei HeLa- und MDA-MB-453-Tumorzellen durch Quercetin.....	54
Abbildung 15: Wirkungsweise von Quercetin auf Tumorzellen.....	55

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 16: Quercetin induziert neben Autophagie (LC3B) auch die Bildung von Aggresomen (Akkumulation ubiquitinerter Proteine) in MCF7-Brustkrebszellen.....	57
Abbildung 17: Inhibition des mTOR-Signalweges durch Quercetin (Q). .....	61
Abbildung 18: Zusammenhang zwischen der mTOR-Inhibition und der Proteasom-Inhibition durch Quercetin und deren Auswirkungen auf Tumorzellen.....	63

## **9 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Die Flavonoide und ihre Subklassen mit Beispielen.....	8
Tabelle 2: Nahrungsmittel mit hohen Konzentrationen an Quercetin in aufsteigender Reihenfolge. ....	11

## 10 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

01/2012

**A. K. Klappan**, S. Hones, I. Mylonas, A. Bruning. 2012. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol*, 137, 25-36

Posterpräsentation:

10/2011

**A. K. Klappan**, A. Bruning, I. Mylonas, K. Friese. Autophagosome formation by quercetin. 53rd Symposium of the Society for Histochemistry, Current role of Histochemistry in Preclinical and Clinical Research, 2011, München

## 11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. K. Friese, Direktor der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung erstellen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. I. Mylonas für die freundliche Überlassung des Themas, seine Unterstützung sowie die Möglichkeit der Teilnahme und Posterpräsentation am Histochemiekongress 2011 in München.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. A. Brüning, für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit sowie für die fachkundige und unermüdliche Unterstützung bedanken. Mit seiner Begeisterung und seinem hohen Engagement hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen und mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitdoktoranden unserer Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit im Labor bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen lieben Eltern für deren Unterstützung während des Studiums und somit für das Gelingen meiner Doktorarbeit danken.