



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Identifizierung von bioaktiven
Verbindungen eines anthocyanreichen
Heidelbeerextraktes“

Verfasserin

Brunner Melanie-Andrea

Angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin/Betreuer: Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

„Das Wissen beruht auf der Erkenntnis des zu Unterscheidenden,
die Wissenschaft auf der Anerkennung des nicht zu Unterscheidenden.
Das Wissen wird durch das Gewahr werden seiner Lücken, durch das Gefühl seiner
Mängel zur Wissenschaft geführt,
welche vor, mit und nach allem Wissen besteht.“

Johann Wolfgang von Goethe

(1749 – 1832)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei denjenigen Personen bedanken, die zur Beendigung dieser Arbeit beigetragen haben:

- Bei Prof. Doris Marko für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die Korrektur meiner Arbeit sowie die gute Zusammenarbeit mit Frau Prof. Brigitte Kopp.
- Bei Christopher, für die gute Betreuung im Labor sowie für die konstruktiven Kritiken und das gute Zureden.
- Beim gesamten Arbeitskreis für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.
- An dieser Stelle möchte ich auch mich herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich während meiner gesamten Studienzeit so tatkräftig unterstützt hat.
- Bei Martina und Katharina für die sehr lehrreichen Diskussionen und die aufmunternden Gespräche.
- Und bei meinem Freund Harald, der immer für mich da war.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	2
2.1	Kanzerogenese.....	2
2.2	Signalweiterleitung durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)	4
2.3	Die ErbB-Familie.....	6
2.3.1	Struktur der ErbB-Rezeptoren.....	6
2.3.2	Liganden der ErbB-Rezeptoren	7
2.3.3	Aktivierung der ErbB-Rezeptoren	8
2.3.4	Effektorproteine der ErbB-Rezeptoren.....	10
2.4	Nachgeschaltete Signalwege.....	11
2.4.1	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase- (MAPK) Signalweg.....	11
2.5	Zusammenhang der ErbB-Rezeptoren mit der Kanzerogenese	13
2.5.1	Mechanismus der Fehlregulation der ErbB-Rezeptoren und ihre Folgen	13
2.5.2	ErbB-Rezeptoren als Target der Tumorthherapie	15
2.6	Polyphenole	17
2.6.1	Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate	18
2.6.2	Flavonoide	19
2.6.3	Biologische Effekte der Flavonoide	24
2.6.4	Anthocyane	26
2.6.5	Heidelbeerextrakt und dessen Fraktionierungsschema	33
2.7	Bildung von Wasserstoffperoxid unter Zellkulturbedingungen durch Polyphenole	36
3	Problemstellung	37
4	Ergebnisse und Diskussion	38
4.1	Einfluss diverser Subfraktionen des HBE auf die Aktivität des EGF-Rezeptors.....	38
4.1.1	Anthocyanfraktion	39
4.1.2	Filtratfraktion	41
4.1.3	Polymerfraktion	43
4.1.4	Copigmentfraktion.....	45
4.1.5	Polare Copigmentfraktion.....	47
4.1.6	Unpolare Copigmentfraktion	48
4.2	Einfluss von Cyanidin bzw. Cyanidin-3-O-glucosid auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors.....	49
4.3	Einfluss von Chlorogensäure auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors ..	50

4.4	Einfluss von Coinkubaten auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors	51
4.5	Beeinflussung des Zellwachstum diverser Subfraktionen des Heidelbeerextraktes	53
4.5.1	<i>Anthocyanfraktion</i>	54
4.5.2	<i>Filtratfraktion</i>	55
4.5.3	<i>Polymerfraktion</i>	57
4.5.4	<i>Copigmentfraktion und ihre beiden Subfraktionen</i>	58
4.6	Gesamtdiskussion	63
5	Zusammenfassung	71
	English summary	73
6	Material und Methoden	75
6.1	Zellkultur	75
6.1.1	<i>Verwendete Zelllinie</i>	75
6.1.2	<i>Mediumwechsel</i>	75
6.1.3	<i>Passagieren von Monolayerkulturen</i>	75
6.1.4	<i>Einfrieren von Zellen</i>	77
6.1.5	<i>Auftauen von Zellen</i>	77
6.1.6	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	78
6.1.7	<i>Ausstreuen von Zellen</i>	79
6.1.8	<i>Substanzinkubation</i>	79
6.1.9	<i>Mycoplasmascreening</i>	80
6.2	Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von EGFR mittels Western-Blot-Analyse	81
6.2.1	<i>Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation</i>	81
6.2.2	<i>Gewinnung der Proteine</i>	81
6.2.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	82
6.2.4	<i>Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE</i>	84
6.2.5	<i>Proteintransfer</i>	88
6.2.6	<i>Quantifizierung der Rezeptoraktivität</i>	89
6.3	SRB-Assay: Test auf Wachstums hemmung	91
6.4	Materialien	94
6.5	Geräte	96
7	Literaturverzeichnis	98
8	Curriculum Vitae	111
9	Anhang	112

Abkürzungsverzeichnis

A431	humane Vulvakarzinomzelllinie
AF	anthocyanreiche Fraktion (Subfraktion des Heidelbeer-extraktes)
AP	apolare Polymerfraktion (Subfraktion des Heidelbeer-extraktes)
AP-1	<u>A</u> ktivator <u>p</u> rotein-1
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> eroxodisulfat
AR	<u>A</u> mphiregulin
Asn	Asparaginsäure
Äquivalentkonzentration	ÄK
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
BTC	<u>B</u> etacellulin
C	C-terminale Schleife
CBG	zytosolische β -Glucosidase
CGA	Chlorogensäure
CO ₂	Kohlendioxid
COMT	<u>C</u> atechol- <u>O</u> - <u>m</u> ethyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CF	Copigment-Fraktion (Subfraktion des Heidelbeerextraktes)
CFp	polare Copigment-Fraktion (Subfraktion des Heidelbeer-extraktes)
CFu	unpolare Copigment-Fraktion (Subfraktion des Heidelbeerextraktes)
CR1, 2	cysteinreiche Domäne
CSF1R/Fms	Human colony stimulating factor 1 receptor
Cy	Cyanidin
Cy-3-gal	Cyanidin-3-O-galactosid
Cy-3-glc	Cyanidin-3-O-glucosid
DAPI	4', 6'- <u>D</u> iamidino-2- <u>p</u> henylindol-dihydrochlorid
Del	Delphinidin
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor

Elk-1	Ets ähnliche Kinase 1
Ephs	Ephrin Rezeptoren
EPR	Epiregulin
ErbB2, -3, -4	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, 3, 4
ErbB2/Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
ErbB3/Her3	Human epidermal growth factor receptor 3
ErbB4/Her4	Human epidermal growth factor receptor 4
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
EtOAc	Ethylacetat
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration
FF	Filtratfraktion (Subfraktion des Heidelbeerextraktes)
FGFR	Fibroblast Wachstumsfaktorrezeptor
FKS	fötales <u>K</u> älbers <u>s</u> erum
Flt1, -3, -4	fms-like tyrosine kinase-1, -3, -4
GDP	<u>G</u> uanosind <u>i</u> phosphat
GIT	<u>G</u> astrointestinal <u>t</u> rakt
Grb2	<u>g</u> rowth factor <u>r</u> eceptor <u>b</u> ound protein
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>t</u> ransferase
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBE	<u>H</u> eidel <u>b</u> eer <u>e</u> xtrakt
HB-EGF	<u>h</u> eparin- <u>b</u> inding EGF
HRP	<u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie
HUVEC	humane Endothelzellen
IGF1R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 Rezeptor
InsR	Insulinrezeptor
JAK/STAT	c-Jun-N-terminale Kinase, stress-induzierbare MAPK
kDa	<u>K</u> ilod <u>a</u> lton
L1, 2	Ligandenbindungsstellen
LDL	<u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
LPH	<u>L</u> actase- <u>P</u> hlorizin <u>h</u> ydrolase
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
Mab	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase

MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEK1/2	MAPK/ERK-Kinasen
MeOH	Methanol
Min	Multiple intestinal adenoma
Mv	<u>M</u> alv <u>i</u> din
Mv-3-glc	Malvidin-3-O-glucosid
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<u>N</u> uclear <u>E</u> actor κB
NRG	<u>N</u> euregulin
P/S	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
p53/HOG	Stress-aktivierte Proteinkinase
PAE	Schweineaorten-Endothelzellen
PAPS	3'- <u>P</u> hospha <u>a</u> denosin-5'- <u>p</u> hospha <u>s</u> ulfat
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PDGFR	Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktorrezeptor
pEGFR	phosphorylierter EGFR
PF	Polymerfraktion (Subfraktion des Heidelbeerextraktes)
PG	<u>P</u> rostaglandin
PI3K	<u>P</u> hosphatidy <u>l</u> inositol-3- <u>K</u> inasen
PKB	<u>P</u> roteink <u>i</u> nade <u>B</u>
PKC	<u>P</u> roteink <u>i</u> nade <u>C</u>
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonylfluorid
PP	polare Polymerfraktion (Subfraktion des Heidelbeerextraktes)
Pro	<u>P</u> ro <u>l</u> in
PTB	<u>p</u> rotein tyrosin <u>b</u> inding
PTPB1	Proteintyrosinkinase-Phosphatase B1
pTyr	Phosphotyrosin
Ras	<u>R</u> at <u>s</u> arcoma
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	<u>R</u> ezeptor <u>t</u> yrosin <u>k</u> inase
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>m</u> ethionin
SCFR	Stammzell-Faktor-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat- <u>P</u> olyacryl <u>a</u> mid- <u>G</u> ele <u>e</u> lektrophorese

SGLT-1	natriumabhängiger Glucosetransporter-1
SH2	<u>S</u> rc- <u>h</u> omologe Domäne <u>2</u>
Shc	<u>S</u> rc/ <u>h</u> omology/ <u>c</u> ollagen
Sos	<u>S</u> on of <u>S</u> evenless
SRB	<u>S</u> ulfor <u>h</u> odamin- <u>B</u>
Src	humanes Homolog des Rous-Sarcoma Virusonkogens
STAT5	<u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription <u>5</u>
SULT	zytosolische Sulfotransferase
T/C	<u>T</u> est-over- <u>C</u> ontrol, Ergebnis bezogen auf Negativkontrolle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF α	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- α
TKI	<u>T</u> yrosin <u>k</u> inase <u>n</u> i <u>n</u> hibitor
Tyr	<u>T</u> yrphostin
UDP	<u>U</u> ridin <u>d</u> iphosphat
UGT	<u>U</u> DP- <u>G</u> lucuronosyl <u>t</u> ransferase
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
X	beliebige Aminosäure

1 Einleitung

Krebs ist neben den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Männer sind davon häufiger betroffen als Frauen. Jährlich wird in Österreich bei etwa 36.000 Menschen eine Tumorerkrankung diagnostiziert, wobei mehr als die Hälfte der Diagnosen auf Darm-, Lungen-, Brust- oder Prostatakrebs fallen (Statistik-Austria, 2011).

Faktoren der Umwelt, des Lebensstils und der Ernährung sind neben genetischer Prädisposition für die Entstehung von Krebserkrankungen verantwortlich. Wegen ihrer komplexen Interaktion mit vielen Stoffwechselprozessen spielen Ernährungsfaktoren eine wichtige Rolle. Gerade bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen scheint die Ernährung sowohl eine ursächliche als auch eine präventive Rolle einzunehmen. Aus diesem Grund rückt einerseits ein bewusstes Ernährungsverhalten in den Fokus des öffentlichen Interesses und andererseits resultiert ein enormer Aufklärungsbedarf über bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe und deren Wechselwirkungen untereinander. Dabei besteht noch erheblicher Forschungsbedarf an der Identifizierung und Funktionsaufklärung potenziell chemopräventiver Substanzen in Nahrungsmitteln.

Die Entstehung von Tumoren geht einher mit der Veränderung spezifischer Signaltransduktionswege, die verantwortlich sind für Proliferation, Differenzierung und Apoptoseregulation. Die konzertierte Hemmung proliferationsassoziierter Signalwege ist eines der Ziele der Chemoprävention. Polyphenole können zum Teil Schlüsselenzyme der Signaltransduktion beeinflussen sowie zentrale Zellfunktionen modulieren (Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007b; Teller et al. 2009a).

In verschiedenen Untersuchungen wurden bereits Beeren- und Apfelextrakte sowie charakteristische Inhaltsstoffe auf deren chemopräventives Potential getestet und als Hemmstoffe verschiedener Rezeptortyrosinkinasen identifiziert (Meiers et al. 2001, Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007b; Fridrich et al. 2007a; Teller et al. 2009a).

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit soll die Wirkung eines polyphenolreichen Heidelbeerextraktes und diverser Subfraktionen, die von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) extrahiert wurden, sowie spezifischer Inhaltsstoffe auf verschiedene proliferationsassoziierte biologische Endpunkte untersucht werden. Es soll die Frage geklärt werden, ob die Anthocyane einen wesentlichen Beitrag zur hemmenden Wirkung des Heidelbeerextraktes (HBE) auf den EGF-Rezeptor leisten oder ob andere Inhaltsstoffe dafür verantwortlich sind.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Kanzerogenese

Die Kanzerogenese bezeichnet die Entstehung und Entwicklung maligner Tumore. Tumore sind gekennzeichnet durch unkontrolliertes Wachstum und gestörte Apoptose. Sie lassen sich in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) unterteilen. Der bösartige Tumor unterscheidet sich vom gutartigen dadurch, dass er schnell invasiv wächst, kaum eine Differenzierung stattfindet und Tochtergeschwülste, sogenannte Metastasen, ausbildet (Mutschler 2007).

Tumore entstehen aus einem Ungleichgewicht zwischen proliferativen und apoptotischen Prozessen (Manson 2003). Im betroffenen Gewebe ist der normale Umsatz an Zellen gestört, d.h. das Verhältnis der sich teilenden, proliferierenden und noch undifferenzierten Zellen übersteigt jenes der Zellen, die nach gewebsspezifischer Differenzierung und Übernahme spezifischer Funktion schließlich durch Apoptose abgebaut und eliminiert werden (Mutschler 2007).

Die Entstehung einer Tumorzelle aus einer gesunden, normalen Zelle ist ein mehrstufiger Prozess (siehe Abbildung 1) meist über einen längeren Zeitraum hinweg (Manson 2003; Hanahan and Weinberg 2000).

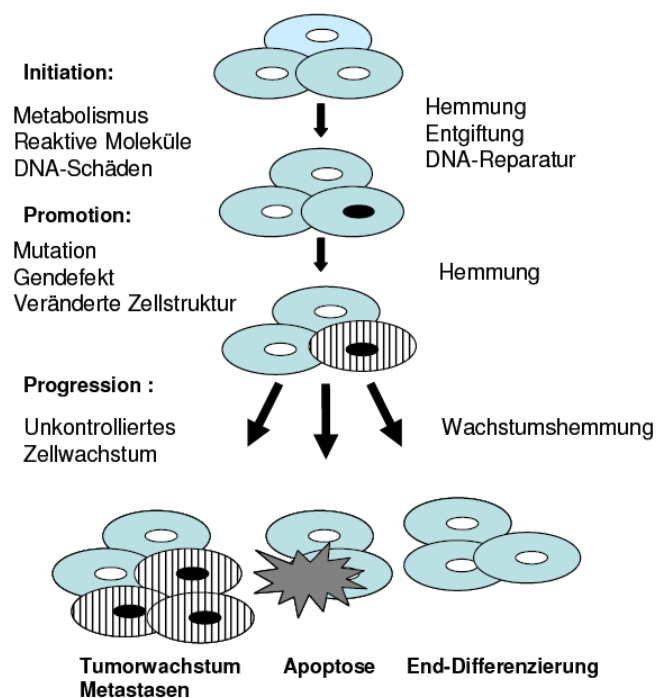


Abbildung 1: Das Drei-Stufen-Modell der Kanzerogenese (Weinstein 1988)

Die erste Phase wird als Initiation bezeichnet, die sich durch Mutation des genetischen Materials der Zelle auszeichnet. Diese irreversible Veränderung wird anschließend auf die Tochterzelle übertragen. Auslösende Faktoren sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und sogenannte Karzinogene, wie Strahlen, Chemikalien, Viren und bakterielle Infektionen (Mutschler 2007).

Tumorpromotion stellt die Beschleunigung der Tumorentstehung dar. Hier kommt es zur Stimulierung des Zellwachstums und zur vermehrten Teilung der initiierten Zelle (Mutschler 2007). Diese Phase kann z.B. durch Modulation der Expression oder der Aktivität verschiedener Elemente bestimmter Signaltransduktionen ausgelöst werden. Durch weitere Progression kann aus einem zunächst gutartigen ein maligner Tumor entstehen (Guillem et al. 1988). Diese dritte Phase geht mit der Aktivierung von Protoonkogenen (z.B. Ras) einher und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53) (Krishnan and Brenner 1996).

Der effektivste Weg um Krebs vorzubeugen ist die Initiation zu blockieren, indem DNA-Schäden vorgebeugt werden (Manson 2003). Viele Nahrungsinhaltsstoffe besitzen antioxidative Eigenschaften, die chemopräventiv wirken (Hayes et al. 1999; Hayes and McMahon 2001). Diese Effekte sind abhängig sowohl von ihrer Konzentration als auch dem Zell- und Gewebetyp (Manson 2003).

Signalwege durch mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) und Proteinkinase B (PKB), sowie Aktivatorprotein-1 (AP-1) oder dem Transkriptionsfaktor Nuclear Factor κ B (NF- κ B) begünstigen die Zellproliferation. In vielen Krebstypen sind Schlüsselmoleküle (z.B.: EGFR, RAS, PI3K, PKB und NF- κ B) überexprimiert. EGFR ist zum Beispiel bei Magen-, Kopf- und Brusttumoren hochreguliert, während der HER2/neu Rezeptor in Magen- und Mammakarzinomen überexprimiert ist (Yarden and Ullrich 1988; Slamon et al. 1987). Es stellte sich heraus, dass einige Nahrungsinhaltsstoffe, getestet *in vitro*, diese Signalweiterleitung supprimieren können (Manson 2003).

Mutationen verschiedener Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) werden mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Dies kann beispielsweise zur Aktivitätssteigerung oder Überexpression der entsprechenden Rezeptoren bzw. des Liganden führen (Sebastian et al. 2006; Burgess et al. 2003; Hubbard and Miller 2007). Infolgedessen versucht man in chemotherapeutischen Ansätzen hinsichtlich der RTKs, die Rezeptoraktivität, die Konzentration der entsprechenden Wachstumsfaktoren oder in weiterer Folge die nachgeschalteten Signalwege zu beeinflussen. (Gschwind et al. 2004).

2.2 Signalweiterleitung durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)

Zellen stehen kontinuierlich mit diversen Stimuli in Kontakt, die von endokrinen bis zu parakrinen Faktoren reichen, um Signale an Nachbarzellen weiterzuleiten (Olayioye et al. 2000). Zu diesen Faktoren zählen Ionen, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Hormone, die entsprechende Informationen zur Zelle übertragen (Wells 1999). Damit diese Signale ins Zellinnere geleitet werden können, besitzt die Zelle auf ihrer Oberfläche Transmembranrezeptoren (Hilger et al. 2002; Wells 1999). Diese Membranrezeptoren werden abhängig von ihrer Primärstruktur, ihrer biologischen Antwort und ihrer Liganden in verschiedene Familien eingeteilt (Jorissen et al. 2003; Schlessinger 2000). Eine wichtige Gruppe stellen die Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) dar (Schlessinger 2000; Gschwind et al. 2004).

Tyrosinkinasen sind Enzyme, die den Transfer einer γ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxygruppe eines Tyrosinrestes am Zielprotein katalysieren (Schlessinger 2000; Gschwind et al. 2004; Manach et al. 2004; Hubbard and Miller 2007). Ihnen gemeinsam ist ihre molekulare Grundstruktur. Sie bestehen aus einer glykosylierten extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einer Transmembranhelix und aus einer zytoplasmatischen Domäne, die aus Tyrosinkinase-Domäne und aus einer regulatorischen Juxtamembranregion besteht (Lemmon and Schlessinger 2010). Bindet nun ein Ligand an die extrazelluläre Bindungsstelle, kommt es in der Regel zu einer Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptor der eigenen Subklasse. Dabei können Tyrosinreste sowohl der intrazellulären Domäne des Dimerisierungspartners als auch von anderen Zielmolekülen phosphoryliert werden. Infolgedessen wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zu unterschiedlichen zellulären Effekten führt (Prenzel et al. 2001).

Nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms stellte sich heraus, dass 58 der 98 Tyrosinkinasesequenzen zu den RTKs zählen, wohingegen die restlichen 32 als Nicht-Rezeptortypen identifiziert wurden (Bazley and Gullick 2005; Hubbard and Miller 2007). Aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede wurden die 58 bekannten RTKs in 20 Subfamilien eingeteilt (Gschwind et al. 2004) (siehe Abbildung 2), wobei die Tyrosinkinasedomäne eine stark konservierte Struktur besitzt. Sie liegen alle mit Ausnahme des Insulinrezeptors als Monomere in der Zellmembran vor. Dieser liegt als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten vor, die jeweils aus zwei Ketten ($\alpha\beta$) bestehen und durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Bazley and Gullick 2005; Schlessinger 2000; Burgess et al. 2003).

Zur RTK-Familie gehören der EGFR, der Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktorrezeptor (PDGFR), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR), der Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptor (FGFR), die Ephrin Rezeptoren (Ephs) und der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-1 Rezeptor (IGF1R) (Hubbard and Miller 2007; Teillet et al. 2008).

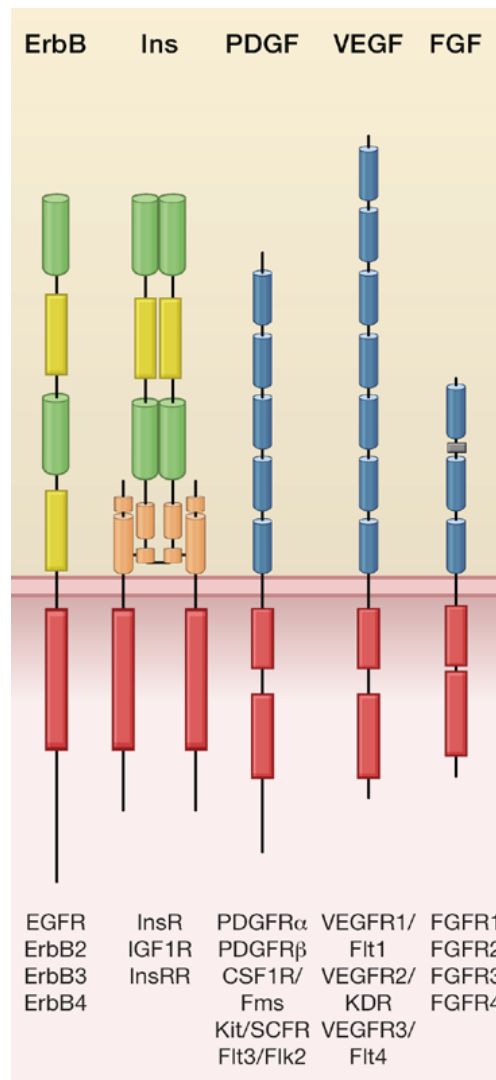


Abbildung 2: Subfamilien ausgewählter RTKs (Lemmon and Schlessinger 2010); EGR-Rezeptor: Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; ErbB2, -3, -4: Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, 3, 4; InsR: Insulinrezeptor; IGF1R: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 Rezeptor; PDGFR α , β : Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktorrezeptor α , β ; CSF1R/Fms: Human colony stimulating factor 1 receptor; SCFR: Stammzell-Faktor-Rezeptor; Flt1, -3, -4: fms-like tyrosine kinase-1, -3, -4; VEGFR1, -2, -3: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 1, -2, -3; FGFR1, -2, -3, -4: Fibroblast Wachstumsfaktorrezeptor 1, -2, -3, -4

Bei der extrazellulären Domäne lassen sich besondere Strukturmerkmale erkennen, z.B. cysteinreiche Domänen (EGFR) und Immunglobulin-ähnliche Domänen (PDGFR,

VEGFR und FGFR) (Schlessinger 2000; Teillet et al. 2008; Lemmon and Schlessinger 2010).

Wichtige Vertreter der RTKs sind die Mitglieder der ErbB-Familie (Bazley and Gullick 2005), auf die nun näher eingegangen werden soll.

2.3 Die ErbB-Familie

Die ErbB-Rezeptorfamilie besteht aus vier Mitgliedern: epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR bzw. ErbB1)-, ErbB2- (HER2 - human epidermal growth factor receptor), ErbB3 (HER3)- und ErbB4-Rezeptor (HER4) (Schlessinger 2000; Olayioye et al. 2000; Burgess et al. 2003; Gschwind et al. 2004; Sebastian et al. 2006; Dutta and Maity 2007; Lemmon and Schlessinger 2010).

2.3.1 Struktur der ErbB-Rezeptoren

Die ErbB-Rezeptoren liegen als Monomere vor und sind 170 bis 200 kDa große Glykoproteine. Ihr Aufbau lässt sich, wie vorhin schon erwähnt, in drei Domänen einteilen: eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, einer α -helikalen Transmembrandomäne und einer intrazellulären, zytosolischen Tyrosinkinasedomäne, die das katalytische Zentrum trägt. Letzteres grenzt an die Juxtamembranregion und an eine nicht-katalytische C-terminale regulatorische Sequenz (siehe Abbildung 3) (Olayioye et al. 2000; Burgess et al. 2003; Bazley and Gullick 2005; Fuller et al. 2008).

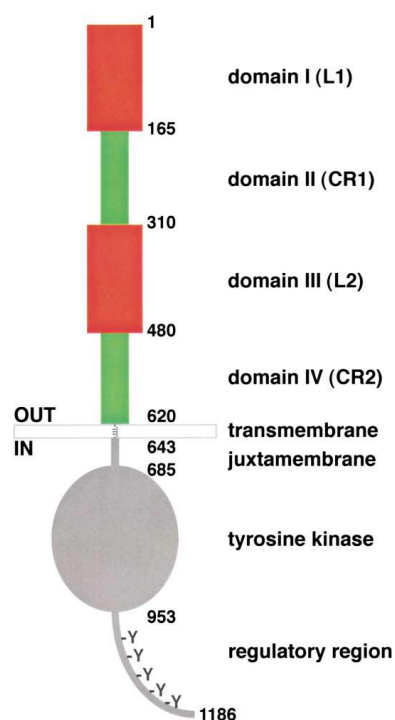


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines ErbB-Rezeptors (Burgess et al. 2003); L1, 2: Ligandenbindungsstellen; CR1, 2: Cysteinreiche Domänen; Y: Tyrosinrest

Der ErbB2-Rezeptor ist von seiner Grundstruktur her dem EGFR sehr ähnlich, aber für ihn sind noch keine Liganden bekannt und ist daher auch kein Rezeptor im herkömmlichen Sinn. Trotz allem besitzt er eine katalytische Proteintyrosinkinase (PTK)-Subdomäne (Fuller et al. 2008). Bei Abwesenheit eines Liganden nimmt er eine fixierte Konformation an, die eine starke Ähnlichkeit mit dem aktiven Status der anderen ErbB-Mitglieder besitzt. In diesem Zustand ist er fähig, mit anderen ErbB-Mitgliedern zu interagieren (Bazley and Gullick 2005).

Den ErbB3-Rezeptoren fehlen im Gegensatz zum EGFR bestimmte Aminosäuren in seiner PTK-ähnlichen Subdomäne, wodurch er katalytisch inaktiv ist. Die carboxyterminale Region besitzt Tyrosinreste, die durch Heterodimerisierung durch andere Mitglieder der ErbB-Familie phosphoryliert und damit aktiviert werden können (Fuller et al. 2008).

2.3.2 Liganden der ErbB-Rezeptoren

Die ErbB-Rezeptoren werden durch eine Vielzahl von Liganden aktiviert, die EGFR-ähnliche Wachstumsfaktoren sind (Sebastian et al. 2006). Es gibt zahlreiche ErbB-spezifische Liganden (siehe Abbildung 4), wobei jeder aus einer EGF-like Domäne besteht, die ihnen Bindungsspezifität verleiht (Olayioye et al. 2000). Diese besteht aus ca. 50-55 Aminosäuren und ist hauptsächlich aus β -Faltblättern aufgebaut. Innerhalb der EGF-like Domäne befinden sich sechs homologe Cysteinreste, die drei intramolekulare Disulfidbrückenbindungen ausbilden (Yarden and Slivkowski 2001; Singer et al. 2001). Die Liganden können mit unterschiedlicher Affinität an die vier verschiedenen ErbB-Rezeptoren binden und werden in vier Untergruppen eingeteilt (siehe Abbildung 4):

- Die erste Gruppe beinhaltet EGF, Amphiregulin (AR) und TGF α (transforming growth factor- α), die spezifisch an ErbB1 binden.
- Zur zweiten Gruppe zählen BTC (Betacellulin), HB-EGF (heparin-binding EGF) und EPR (Epiregulin). Diese weisen eine duale Bindungsspezifität auf. Sie können sowohl an ErbB1-Rezeptor als auch an ErbB4-Rezeptor binden.
- Die Neureguline (NRG) oder Hereguline bilden die dritte Ligandenfamilie, die Produkte von vier verschiedenen Genen (NRG1-NRG4) sind. NRG1 und NRG2 binden an ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren.
- Im Gegensatz dazu sind NRG3 und NRG4 Liganden (Harari et al. 1999) für den ErbB4-Rezeptor, die die letzte Gruppe bilden (Olayioye et al. 2000; Burgess et al. 2003; Fuller et al. 2008).

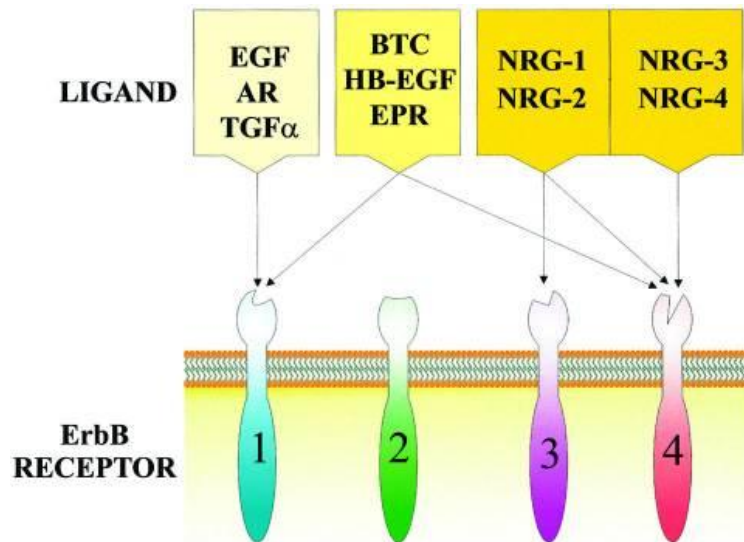


Abbildung 4: Bindungsspezifitäten von EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Olayioye et al. 2000); EGF: epidermal growth factor; AR: Amphiregulin; TGF α : transforming growth factor- α ; BTC: Betacellulin; HB-EGF: heparin-binding EGF; EPR: Epiregulin; NRG-1, -2, -3, -4: Neuregulin-1, -2, -3, -4

Obwohl eine große Anzahl an Liganden für ErbB1-, ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren identifiziert wurde, wurden noch keine direkten Liganden für den ErbB2-Rezeptor entdeckt. Daher wird vermutet, dass der ErbB2-Rezeptor als Corezeptor fungiert (Olayioye et al. 2000). Erb2-Rezeptor ist der bevorzugte Partner für Heterodimerisierung für alle anderen Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie (Tzahar et al. 1996; Graus-Porta et al. 1997) und spielt eine wichtige Rolle in der Potenzierung von ErbB-Rezeptor-Signalweiterleitung (Beerli et al. 1995; Graus-Porta et al. 1995).

Es wurde auch beobachtet, dass es keinen einzigen Liganden gibt, der sowohl an EGFR als auch an den ErbB3-Rezeptor bindet. Daraus lässt sich schließen, dass sich diese beiden Rezeptoren während der Evolution getrennt voneinander entwickelt haben (Wingens et al. 2006).

2.3.3 Aktivierung der ErbB-Rezeptoren

Solange kein Ligand am Rezeptor gebunden ist, liegen die Rezeptoren als Monomer in einer inaktiven Form vor. Bindet nun ein Ligand spezifisch an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, führt dies zur Konformationsänderung der zytosomatischen Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors und zur Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren (Yarden and Sliwkowski 2001; Jorissen et al. 2003). Durch die Konformationsänderung wird die Tyrosinkinaseaktivität erhöht. Dadurch können Tyrosinreste des jeweiligen Dimerisierungspartners trans-phosphoryliert werden (Olayioye et al. 2000; Burgess et al. 2003; Hubbard and Miller 2007). Für

nachgeschaltete Signalproteine dienen diese Phosphotyrosine als Bindungsstelle (Hubbard and Miller 2007).

2.3.3.1 Extrazelluläre Aktivierung und Rezeptordimerisierung

Die monomeren Rezeptoren befinden sich bei Abwesenheit von Liganden in einem inaktiven Zustand, d.h. in diesem Grundzustand besitzen sie keine katalytische Aktivität. Durch das Andocken eines Liganden an die Rezeptorbindungsstelle kommt es zur sequentiellen Rezeptordimerisierung und Oligomerisierung (Bazley and Gullick 2005). Rezeptordimere sind stabiler und weisen eine höhere Bindungsaffinität von Liganden auf als ihre korrespondierenden Monomere (Ben-Levy et al. 1992). Eine derartige Dimerisierung kommt durch die Interaktion von einer EGFR CR1 Domäne mit einem zweiten ErbB-Rezeptor in einem 2:2 Rezeptor-Liganden-Komplex zu Stande (Bazley and Gullick 2005).

Dimerisierung kann auch den direkten Kontakt zwischen den helikalen Transmembranregionen der Rezeptoren zur Folge haben. Die Anziehungskräfte sind u.a. Wasserstoffbindungen oder Van-der-Waals-Interaktionen (Bazley and Gullick 2005).

Das potenteste Heterodimer, im Bezug auf Zellwachstum und Zelltransformation, setzt sich aus dem ErbB2- und ErbB3-Rezeptor zusammen (Bazley and Gullick 2005; Citri et al. 2003). Jeder ErbB-Rezeptor hat einen bevorzugten Dimerisierungspartner. Beispielsweise bevorzugt EGFR eine Dimerisierung mit dem ErbB2- und dem ErbB3-Rezeptor. Im Gegensatz dazu dimerisiert der ErbB4-Rezeptor in einem wesentlich geringeren Ausmaß mit dem Erb2- und ErbB3-Rezeptor (Schulze et al. 2005). Der ErbB2- und ErbB3-Rezeptor dimerisieren bevorzugt miteinander (Citri et al. 2003).

2.3.3.2 Aktivierung der intrinsischen Phosphotyrosinkinase Domäne

Eine Tyrosinphosphorylierung wird bei den meisten RTKs durch eine Aktivierungsschleife ausgelöst, die sich innerhalb der intrazellulären PTK-Domäne befindet und für die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Im monomeren Zustand ist sie inaktiv (Fuller et al. 2008) und für ATP und Substrat unzugänglich (Burgess et al. 2003; Bazley and Gullick 2005). Durch die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife wird eine Konformationsänderung induziert, die die Inhibierung der Substratbindung entfernt und die katalytischen Gruppen für den Phosphattransfer in einer optimalen Position platziert (Burgess et al. 2003). Die C-terminale Schleife von Monomer 1 bindet an die N-terminale Schleife am Monomer 2. Monomer 1 fungiert als ein allosterischer Aktivator von Monomer 2. Dadurch wird eine Konformationsänderung ausgelöst, wodurch die α -C-terminale Helix von Monomer 2 in die korrekte Konformation für die

Katalyse gebracht wird (Hubbard and Miller 2007; Fuller et al. 2008; Olayioye et al. 2000). Durch die PTK-Subdomäne liegen nun viele Tyrosinreste in dem Rezeptordimer trans-phosphoryliert vor und dienen nun als Bindungsstellen für Adapterproteine (Fuller et al. 2008).

2.3.4 Effektorproteine der ErbB-Rezeptoren

Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindungsstellen für diverse Signalproteine. Viele dieser Signalproteine besitzen SH2- (Src-homologe Domäne 2) und PTB- (protein tyrosin binding) Domänen, die Interaktionen mit anderen Proteinen auslösen (Schlessinger 2000; Lemmon and Schlessinger 2010). Ihre Aufgabe besteht darin, das vom Rezeptor erhaltene Signal ins Zytoplasma oder in den Zellkern weiterzuleiten (Bazley and Gullick 2005).

Adapterproteine zählen zu den ersten Komponenten der Signalweiterleitung und werden in zwei Gruppen eingeteilt. Signalproteine, die über eine spezifische SH2-Domäne an Phosphotyrosinreste binden, stellen die größere Gruppe dar. Bindet nun ein Signalprotein, das eine SH2 Domäne besitzt, an die aktivierte RTK, wird das Signalmolekül zur Zellmembran gebracht und trifft dort auf sein Zielprotein (Schlessinger 2000; Bazley and Gullick 2005). Grb2 (growth factor receptor bound protein) ist hierfür ein Beispiel. Ist das Adapterprotein an den aktivierten Rezeptor gebunden, erfolgt die Translokation zur Plasmamembran. Zusätzlich zur SH2-Domäne enthält Grb2 auch eine SH3-Domäne, die eine Interaktion sowohl mit prolinreichen Regionen anderer Proteine als auch mit tyrosinphosphorylierten Motiven ermöglicht (Jorissen et al. 2003).

Die PTB-Domäne bindet innerhalb der Sequenz Asn-Pro-X-pTyr (Asn: Asparaginsäure; Pro: Prolin; X: beliebige Aminosäure; pTyr: Phosphotyrosin) an Phosphotyrosin (Schulze et al. 2005; Bazley and Gullick 2005).

Alle Mitglieder der ErbB-Familie binden an den MAPK-Signalweg via Shc und/oder Grb2 (Olayioye et al. 2000). Grb2 befindet sich im Zytosol und ist an den Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos (Son of Sevenless) gebunden (Jorissen et al. 2003; Bazley and Gullick 2005). Grb2 kann an den aktivierten EGFR über seine SH2-Domäne entweder direkt über p-Tyr - 1068 und 1086 oder indirekt an das tyrosinphosphorylierte Shc binden (Jorissen et al. 2003; Oda et al. 2005). Shc steht dabei durch seine PTB-Domäne mit EGFR in Verbindung, wobei aber unklar ist, ob die zwei unterschiedlichen Bindungen verschiedene Funktionen haben oder ob eine Bindung zellspezifisch bevorzugt wird (Jorissen et al. 2003). Es wird jedoch in beiden Fällen die Relokalisierung des Grb2/Sos-Komplexes an die Zellmembran und in weiterer

Folge die Interaktion von Sos mit seinem Zielprotein Ras ermöglicht (Schlessinger 2000; Jorissen et al. 2003; Bazley and Gullick 2005).

2.4 Nachgeschaltete Signalwege

Aufgrund der Diversität von Liganden und den EGFR-Dimerisierungspartnern können unterschiedliche Signalwege eingeleitet werden (Sebastian et al. 2006). Von den ErbB-Rezeptoren aus können verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden. Dazu zählen unter anderem die MAPK-Kaskade (Mitogen-aktiviert Proteinkinase), der PI3K-Signalweg (Phosphatidylinositol-3-Kinase), die Phospholipase C- γ sowie der JAK/STAT Signalweg (Sebastian et al. 2006). Im folgenden Kapitel wird vorwiegend auf den MAPK-Signalweg eingegangen, da dieser Gegenstand der vorliegenden Diplomarbeit ist.

2.4.1 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase- (MAPK) Signalweg

Der MAPK-Signalweg stellt einen der wichtigsten intrazellulären Signalwege dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und von zytoplasmatischen Aktivitäten. Dabei können sowohl Zellzyklus, Zellmigration, Zellform und metabolische Prozesse als auch Zellproliferation und Differenzierung kontrolliert werden (Schaeffer and Weber 1999; Schlessinger 2000; Lemmon and Schlessinger 2010).

Er lässt sich in verschiedene Kaskaden einteilen, die durch jeweils unterschiedliche Stimuli aktiviert werden. Zum einen gibt es ein Mitogen-aktiviertes Modul, die extrazellulär Signal-regulierte Kinase/mitogen-aktivierte Proteinkinase (ERK/MAPK) 1/2 und die große Mitogen-aktivierte Proteinkinase/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (BMK/ERK), die zur Proliferation und Differenzierung führt und zum anderen ein durch Stress, Zytokine oder Zell-Zell-Interaktion aktiviertes Modul (Robinson and Cobb 1997; Schaeffer and Weber 1999; Hazzalin and Mahadevan 2002).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit soll nur auf das wichtigste, das Mitogen-aktivierte Modul, eingegangen werden.

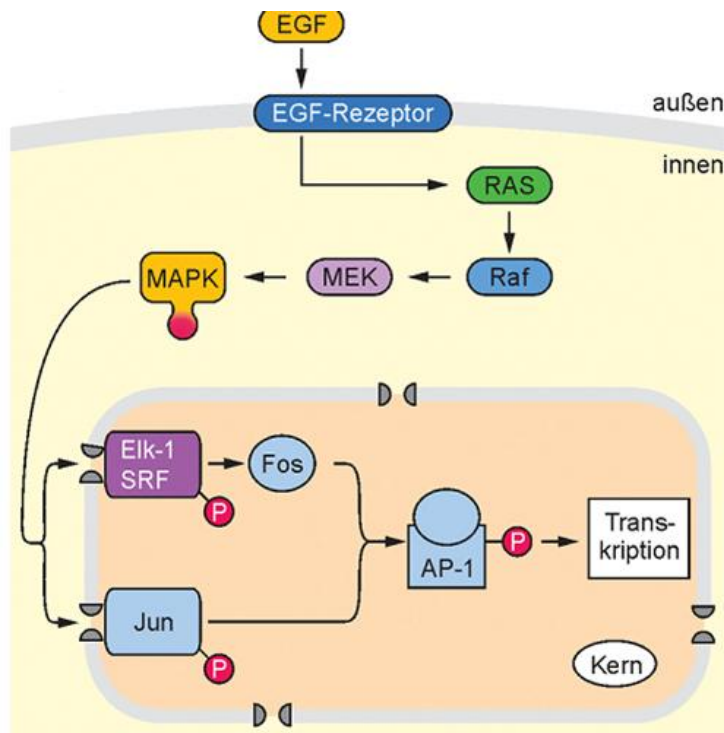


Abbildung 5: Mitogen-aktiverter Proteinkinase (MAPK)-Signalweg (Müller-Esterl 2004), EGF: epidermaler growth factor; Ras: Rat sarcoma; Raf: Rapidly growing fibrosarcomas; MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; Elk-1: Ets ähnliche Kinase 1; SRF: Serum response factor; AP-1: Aktivatorprotein-1

Diese Signalkaskade kann durch alle ErbB-Rezeptoren aktiviert werden. Über eine lineare drei-Schritt-Proteinkinase-Signalabfolge wird das Signal bis zum Zellkern weitergeleitet, wo die Expression der Zielgene moduliert wird. Das mitogen-aktivierte Modul wird durch Bindung eines extrazellulären Liganden (siehe Kap. 2.3.3) an den Rezeptor, nach Dimerisierung und anschließender Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase gestartet. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindungsstellen. Adapterproteine, wie Grb2 oder Shc-Proteine können über ihre Bindungsdomänen an diese spezifischen Phosphotyrosinstellen binden. ErbB-Rezeptoren können die Shc-Proteine tyrosinphosphorylieren, damit Adapterproteine wie u.a. Grb2 binden können. Sos, ein GTP-Austauschfaktor (Guanosintriphosphat) ist mit Grb2 komplexiert. Sos ermöglicht den Austausch von einem GDP (Guanosindiphosphat) gegen ein GTP (Wilkinson and Millar 2000; Pearson et al. 2001). Durch die Bindung von Grb2-Sos an die ErbB-Rezeptoren wird Sos so an die Plasmamembran assoziiert, dass seine Translokation möglich wird, währenddessen Ras aktiviert wird (Schlessinger 2000; Gschwind et al. 2004; Fuller et al. 2008; Shin et al. 2009; Lemmon and Schlessinger 2010). Daraufhin bindet GTP-gebundenes Ras die Raf-Kinase mit hoher Affinität und ist für deren Translokation zur Zellmembran verantwortlich, wo es aktiviert wird (Kolch 2000; Shin et al. 2009). Aktiviertes Raf führt zur Phosphorylierung von zwei Serinresten

in der Aktivierungsschleife von MAPKK MEK-1 (ERK-1) und MEK-2 (ERK-2) (Kolch 2000; Schlessinger 2000). Durch die beiden Isoformen von MEK werden die MAPK ERK-1 und ERK-2 an einer Thr-Glu-Tyr-Einheit (Thr: Threonin; Glu: Glutamin; Tyr: Tyrosin) in der Aktivierungsschleife phosphoryliert und somit aktiviert (Kolch 2000). ERK1/2 phosphoryliert verschiedene zytoplasmatische und membrangebundene Substrate (Schlessinger 2000; Shin et al. 2009). Durch die Aktivierung von ERK1/2 kommt es zur Translokation in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren (Karin and Hunter 1995; Schlessinger 2000). ERK-1 bindet an den Transkriptionsfaktor Elk-1 (Ets ähnliche Kinase 1) über dessen D-Domäne. Dieser wird daraufhin phosphoryliert und kann somit an die SRE-Promotorregion (serum responsive element) seiner Zielgene binden. Dies führt zur Transkription von Onkogenen (z.B. c.fos, c-myc) und anderen Proteinen (z.B. Cyclin D1) (Karin 1995; Hazzalin and Mahadevan 2002).

2.5 Zusammenhang der ErbB-Rezeptoren mit der Kanzerogenese

Tumorentstehung wird mit einem Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose in Verbindung gebracht (Manson 2003). Dies kann eine Folge von Veränderungen in zellulären Signaltransduktionskaskaden sein. Es könnte eine Veränderung des ErbB-Rezeptor-Netzwerkes, wie erhöhte Expression der Rezeptoren, bei vielen Karzinomen nachgewiesen werden (Guillem et al. 1988; Dutta and Maity 2007; Lemmon and Schlessinger 2010).

2.5.1 Mechanismus der Fehlregulation der ErbB-Rezeptoren und ihre Folgen

Fehlregulationen von ErbB-Rezeptoren können zur Entstehung eines Tumors führen (Lemmon and Schlessinger 2010). Dabei lassen sich folgende Mechanismen beobachten:

- Erhöhte Produktion von Wachstumsfaktoren

Es gibt verschieden Gründe für die Überproduktion an Wachstumsfaktoren. Die Produktion von Wachstumsfaktoren kann durch primäre Onkogene ausgelöst werden. Der Tumor selbst kann als Ligandenquelle dienen oder der Ligand kann exprimieren, liegt aber jedoch inaktiv vor (Yarden and Slivkowski 2001).

- Überexpression der ErbB-Rezeptoren

Es konnte eine erhöhte Expression der ErbB-Rezeptoren in vielen humanen Karzinomen nachgewiesen werden (Olayioye et al. 2000; Dutta and Maity 2007). Die Gründe dafür sind zumeist eine erhöhte Proteinproduktion und/oder eine erhöhte Genamplifikation

(Prenzel et al. 2001) Beispielsweise ist der ErbB2 aufgrund einer Genamplifikation in etwa 30 % von Brustkrebspatienten überexprimiert (Lemmon and Schlessinger 2010).

HT29-Zellen überexprimieren EGFR und ErbB2-Rezeptor (Shimizu et al. 2005). Eine erhöhte Expression des ErbB3-Rezeptors ist häufig bei Haut- und Brustkrebs sowie bei Karzinomen des Ovars zu finden (Citri et al. 2003; Shimizu et al. 2005). Eine Überexpression des ErbB4-Rezeptors wurde bei Patienten mit Brustkrebs und Karzinomen des Ovars beobachtet (Prenzel et al. 2001).

Tabelle 1: Überexpression des EGFR in % in verschiedenen Tumortypen (Dutta and Maity 2007)

Tumortyp	Tumorvermittelte Expressionsrate des EGFR [%]
Kolorektalkarzinom	25-77
Pankreaskarzinom	30-50
Blasenkrebs	31-48
Prostatakarzinom	39-47
Ovarialkarzinom	35-70
Gliom	40-63
Brustkrebs	14-91
Lungenkrebs	40-80
Nierenkarzinom	50-90
Tumor des Kopfes und Nackens	80-100

Die Folgen der Überexpression der Rezeptoren sind sowohl eine veränderte Signaltransduktion als auch eine Misslokalisierung der Rezeptoren. Beispielsweise wird EGFR für gewöhnlich an der basolateralen Seite von polarisierten epithelialen Zellen exprimiert, wohingegen er bei einer erhöhten Expression an der apikalen Seite zu finden ist. Die Folge davon ist eine verlängerte Aktivierung des EGFR (Lemmon and Schlessinger 2010).

- Mutationen der Rezeptoren

Mutationen an der extrazellulären und intrazellulären Domäne der Rezeptoren können ebenfalls für Fehlregulationen der Rezeptoren ausschlaggebend sein. Eine bekannte Mutation des EGFR in humanen Krebszellen ist der EGFRVIII (Lemmon and Schlessinger 2010), dem die Aminosäuren 6-273 fehlen (Burgess et al. 2003). Aufgrund dessen besitzt er keine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle und somit erfolgt seine Aktivierung ohne einen spezifischen Liganden (Lemmon and Schlessinger 2010).

2.5.2 ErbB-Rezeptoren als Target der Tumorthherapie

Die ErbB-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle als Angriffspunkte in der Tumorthherapie (Yarden and Sliwkowski 2001). Es wurden schon zahlreiche Arzneistoffe entwickelt und von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen (Lemmon and Schlessinger 2010). Es gibt verschiedene Lösungsansätze um die ErbB-Rezeptoren zu blockieren, entweder mittels monoklonaler Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren (Dutta and Maity 2007; Yarden and Sliwkowski 2001; Lemmon and Schlessinger 2010; Sebastian et al. 2006), die im Folgenden näher erläutert werden.

2.5.2.1 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper (Mab) blockieren die Ligandenbindungsstelle des Rezeptors (Dutta and Maity 2007). Humanisierte Mabs setzen sich hauptsächlich aus humanem Immunoglobulin zusammen. Die Antigenbindungsstelle besteht jedoch aus tierischem Immunoglobulin.

Cetuximab (Erbix[®]) ist ein chimärer Mab, der mit einer doppelt so hohen Affinität an EGFR bindet als der Ligand EGF selbst. Dadurch wird das Binden von EGF inhibiert. Infolgedessen wird auch die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors inhibiert (Sebastian et al. 2006; Reade and Ganti 2009). Die Folgen sind eine Herabregulierung der Rezeptorexpression, die Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion, die Hemmung der Zellzyklusprogression sowie eine Induktion der Apoptose. Somit wird die EGF-induzierte Signaltransduktionskaskade, die letztlich zur Zellproliferation und Metastasenbildung führen würde, blockiert (Grunwald and Hidalgo 2003; Ennis et al. 1991; de Bono and Rowinsky 2002; Dutta and Maity 2007). Es wird zusammen mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan bei der Therapie des metastasierenden Kolonkarzinoms eingesetzt, wenn eine Monotherapie mit Irinotecan nicht angeschlagen hat. Es können jedoch unerwünschte Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Atemnot, Durchfall und anaphylaktische Reaktionen auftreten (Reade and Ganti 2009).

Ein weiterer Vertreter ist Trastuzumab (Herceptin[®]), ein humanisierter Mab, der gegen die extrazelluläre Domäne des ErbB2-Rezeptors gerichtet ist (Yarden and Sliwkowski 2001). Dieser wird zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom eingesetzt (Lemmon and Schlessinger 2010).

2.5.2.2 Tyrosinkinaseinhibitoren

Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) sind niedermolekulare Substanzen, die kompetitiv die Bindung von ATP durch Interaktion mit der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors

hemmen (Ciardiello 2000; Arteaga and Johnson 2001). Dieses Konkurrieren um die Bindungsstelle ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der Moleküle zu ATP möglich (Janmaat and Giaccone 2003; Fry 2003). Die Tyrphostin (Quinazolinderivate) Familie sind wichtige Analoga zu ATP. Ein spezifischer Inhibitor des EGFR ist Tyrphostin AG1478 (4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin) (siehe Abbildung 6). Sein IC_{50} -Wert am isolierten EGFR beträgt 3 nM. Tyrphostin AG1478 ist jedoch nur ein marginaler ErbB2-Rezeptor-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 100 μ M (Osherov and Levitzki 1994).

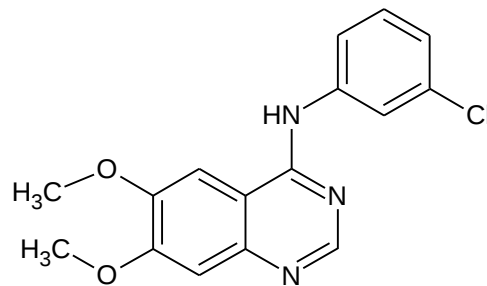


Abbildung 6: Chemische Struktur von Tyrphostin AG1478

Im Gegensatz dazu ist Tyrphostin AG879 ein spezifischer Inhibitor des ErbB2-Rezeptors (siehe Abbildung 7). Es hemmt die Phosphorylierung des Rezeptors mit einem IC_{50} -Wert von 1 μ M (Zhou and Brattain 2005).

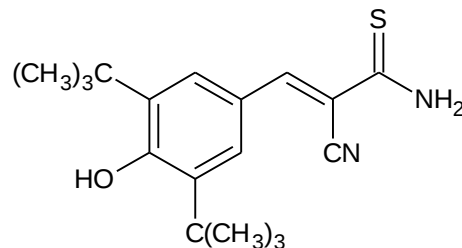


Abbildung 7: Chemische Struktur von Tyrphostin AG879

Ein weiterer Vertreter der TKI ist Gefitinib (Iressa[®]). Es hemmt die Kinaseaktivität von isoliertem EGFR mit einem IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich (Sebastian et al. 2006). Im Gegensatz zu Cetuximab induziert Gefitinib weder die EGFR-Internalisierung noch die Degradierung und erhöht auch nicht den Level von EGFR-Protein (Dutta and Maity 2007).

2.6 Polyphenole

Da pflanzliche Nahrungsmittel vom biologischen System abstammen, bestehen sie hauptsächlich aus Makronährstoffen (Kohlenhydrate, Lipide und Proteine), Ballaststoffen und Mikronährstoffen (Vitamine, Mineralstoffe). Sie besitzen in der Regel jedoch ein breites Spektrum weiterer Komponente (Beecher 1999, 2003; Manach et al. 2005). Viele von diesen Komponenten haben die Eigenschaft enzymatische und chemische Reaktionen zu modifizieren bzw. zu ändern. Daher können sie die menschliche Gesundheit sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Diese Inhaltsstoffe sind bekannt als Phytochemikalien, Phytonährstoffe oder nichttraditionelle Nährstoffe (Beecher 2003).

Phenolische Bestandteile umfassen eine der größten und am meisten vorkommenden Gruppe von Pflanzenmetaboliten. Diese werden gebildet um die Pflanzen beispielsweise vor Photosynthesestress, reaktiven Sauerstoffspezies, Verletzungen und Pflanzenfresser zu schützen (Yang et al. 2001).

Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, da sie im Primärstoffwechsel von der Pflanze weder hergestellt noch verbraucht werden. Sie liegen in der Pflanze oft als Glycosid vor und sind deshalb wasserlöslich. Selten liegen die Polyphenole auch als Aglyca vor (Ross and Kasum 2002). Polyphenole stammen, biogenetisch gesehen, von zwei wichtigen Synthesewegen ab: dem Shikimate-Weg und dem Acetat-Weg (Bravo 1998).

Es sind mehr als 8000 phenolische Strukturen bekannt. Ihr gemeinsames Merkmal ist ein aromatischer Ring, der eine Hydroxygruppe trägt (Croft 1998). Polyphenole können in verschiedene Unterklassen basierend auf ihrer chemischen Struktur unterteilt werden (Watzl and Rechkemmer 2001).

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

Polyphenole besitzen häufig die Fähigkeit Proteine und Mineralien zu binden und werden somit der Gruppe der pflanzlichen Gerbstoffe zugeordnet. Die adstringierende Wirkung beim Verzehr von vielen Früchten und Getränken ist bedingt durch die Reaktion von Speichelproteinen mit Pflanzenpolyphenolen.

Das Vorkommen der Polyphenole ist in Pflanzen sehr unterschiedlich. Manche Verbindungen sind ubiquitär vertreten, wohingegen andere nur in speziellen Spezies

oder Arten in Erscheinung treten, wie z.B. Isoflavone in Leguminosen. Zusätzlich können innerhalb einer Gattung Unterschiede auf Grund von Umwelteinflüssen, genetischen Faktoren und Wachstums- und Reifungsphase der Pflanze auftreten (Cheynier 2005; Harnly et al. 2006).

Früchte und Gemüse sind reich an Polyphenolen mit einem totalen Phenolgehalt so hoch wie 1-2 g/ 100 g Frischgewicht in bestimmten Früchten. Eine weitere wichtige Quelle für Polyphenole sind Getränke wie Rotwein, Kaffee, Tee und Fruchtsäfte. Teetrinker konsumieren in etwa 200 bis 800 mg Catechin pro Tag (in ein bis vier Tassen grünen Tee) (Yang et al. 2001).

2.6.1 Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate

Zu den Phenolcarbonsäuren zählen Hydroxybenzoesäuren, wie Gallussäure oder Protocatechusäure, und Hydroxyzimtsäuren (Manach et al. 2004; Watzl and Rechkemmer 2001). Sie sind im Essen reichlich vorhanden und machen etwa ein Drittel der phenolischen Bestandteile in unserer Nahrung aus. Sie liegen meist mit organischen Säuren oder Estern verestert vor, die entweder löslich sind und in Vakuolen akkumulieren oder unlöslich als Zellwand-Bestandteile vorkommen (Yang et al. 2001).

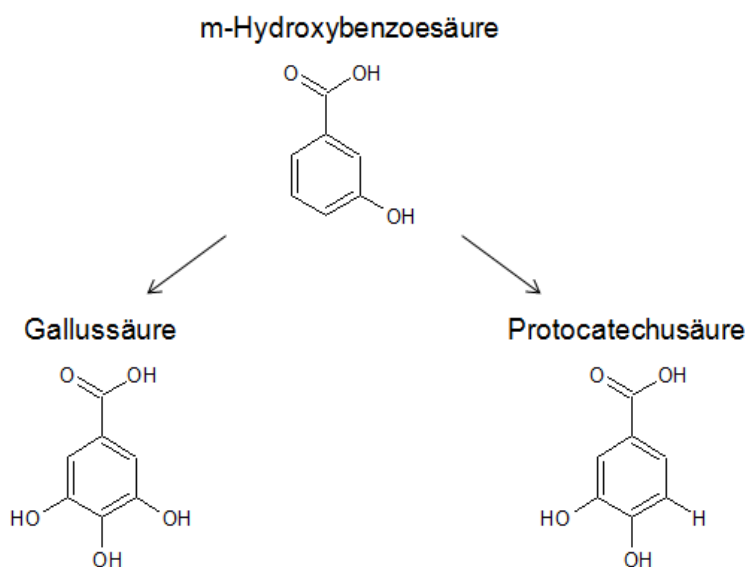


Abbildung 8: Chemische Strukturen der Hydroxybenzoesäuren, wie Gallussäure und Protocatechusäure

Die am häufigsten vorkommenden Hydroxyzimtsäuren sind Kaffeesäure und Ferulasäure. Kaffeesäure findet man in vielen Früchten wie Apfel, Tomate, Grapefruit und Zwetschke. Ferulasäure ist über eine Esterbrücke mit Hemicellulose mit der Zellwand verbunden und kommt in Weizenkleie vor (5 mg/g). Derivate der Hydroxyzimtsäure sind Chlorogensäure (ein Caffeoylester) und Curcumin (Yang et al.

2001). Chlorogensäure wird aus Kaffeesäure und Chinasäure gebildet (Watzl and Rechkemmer 2001).

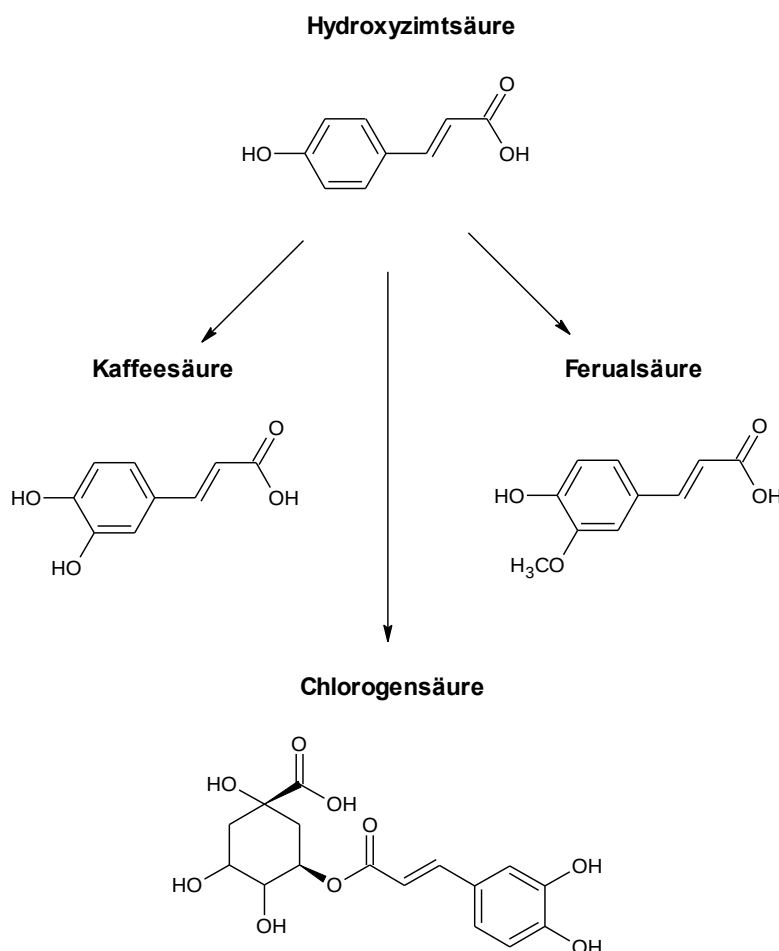


Abbildung 9: Chemische Strukturen der Hydroxyzimtsäuren, wie Kaffeesäure, Ferulasäure und Chlorogensäure

2.6.2 Flavonoide

Flavonoide und deren Polymere stellen eine umfangreiche Gruppe von Nahrungsbestandteilen dar (Beecher 2003). Sie sind die größte Gruppe der phenolischen Komponente (Yang et al. 2001). Mehr als 9000 verschiedene Flavonoide wurden bereits beschrieben (Williams and Grayer 2004). Flavonoide sind eine Subklasse von Polyphenolen, die dadurch charakterisiert sind, dass sie aus einem gemeinsamen Grundgerüst, dem Flavan (2-Phenylchroman) bestehen (siehe Abbildung 10). Es besteht aus zwei phenolischen Ringen mit einem oxygenierten Heterozyklus (Cheynier 2005; Harnly et al. 2006).

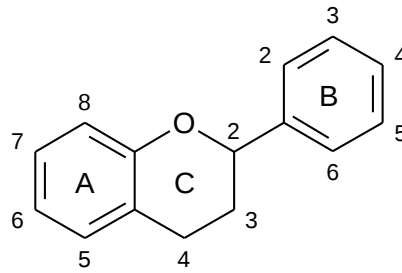


Abbildung 10: Flavan – das Grundgerüst der Flavonoide

Flavonoide werden in sechs Subklassen unterteilt: Flavone, Flavanole (Catechine und Procyanidine), Isoflavone, Flavonole, Flavanone und Anthocyane (siehe Abbildung 11), die sich aufgrund des Oxidationsstatus im Ring C und der funktionellen Gruppen am heterozyklischen Ring unterscheiden (Yang et al. 2001; Ross and Kasum 2002; Williams and Grayer 2004; Cheynier 2005; D'Archivio et al. 2007; Hollman and Katan 1999; Scalbert and Williamson 2000).

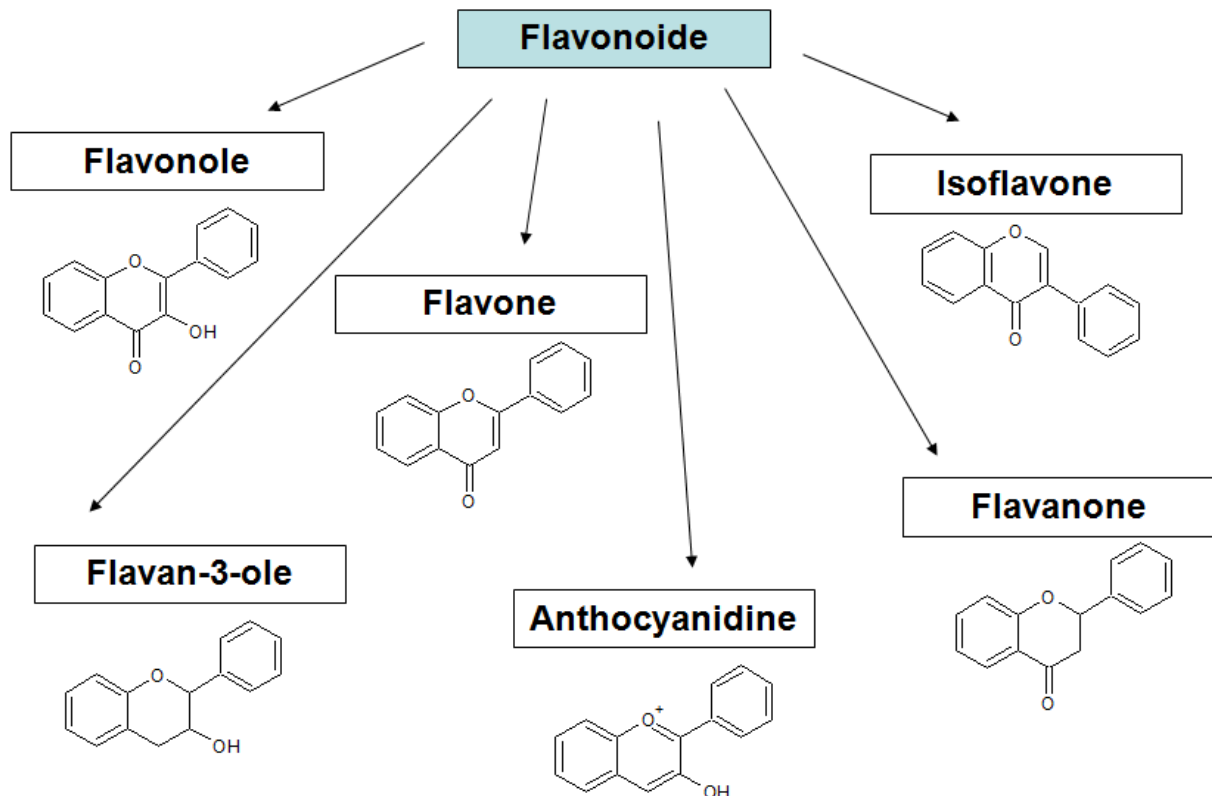


Abbildung 11: Klassifizierung der Flavonoide (Manach et al. 2004)

Die meisten Flavonoide kommen in der Natur als Glycoside vor (Harborne and Williams 2000). Eine Ausnahme bilden die Flavan-3-ole, die entweder als Aglyca oder mit Gallussäure verestert zu finden sind (Scalbert and Williamson 2000). Die am häufigsten

gebundenen Zucker sind Glucose, Rhamnose, Galactose, Arabinose, Xylose und Glucuronsäure. Der Zucker ist meist am Grundgerüst am C-3 β -ständig oder aber auch am C-5-Atom verknüpft. Es ist weiterhin möglich, dass mehrere Zucker in beiden Positionen gleichzeitig gebunden sind. Die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Polyphenole können durch das Glykosylierungsmuster erheblich beeinflusst werden (Scalbert and Williamson 2000).

Die Diversität der Flavonoide ist sowohl durch Unterschiede im Heterozyklus als auch durch dessen verschiedene Substitutionsmuster begründet (Scalbert and Williamson 2000; Williams and Grayer 2004; Cheynier 2005; D'Archivio et al. 2007).

Flavonoide können auch als Polymere vorliegen, die als kondensierte Tannine oder Procyanidine bezeichnet werden (Cheynier 2005). Procyanidine bestehen aus monomerischen Untereinheiten des Flavans, die über eine C-C oder eine Ether-Brücke verbunden sind (Beecher 2003). Sie sind, angefangen als Dimer, bis hin zu großen Polymeren z.B. in Äpfel, Beeren, Schokolade, Rotwein und Nüssen weit verbreitet (Hammerstone et al. 2000; Prior et al. 2001).

Es gibt nur wenige Schätzungen zur Nahrungsaufnahme von Flavonoiden. Die Diversität der chemischen Struktur und der Variabilität im Essen macht das Kalkulieren des Gehalts der Polyphenole in den Nahrungsmitteln schwierig (Yang et al. 2001). *Kuhnau* schätzte die tägliche Aufnahme von Flavonoiden in den USA zwischen 1 und 1,1 g/Tag, abhängig von der Jahreszeit (Kuhnau 1976). *Hertog et al.* berechnete die Aufnahme von Flavonolen und Flavonen in den Niederlanden auf 23 mg/Tag (Hertog et al. 1993), und *Kuhnau* von diesen beiden Subklassen auf 115 mg/Tag (Kuhnau 1976)! Man kann darauf schließen, dass *Kuhnau's* Berechnung durch die damaligen begrenzten Möglichkeiten analytischer Methoden, die in den 1970er Jahren verwendet wurden, zu Stande gekommen ist. *Leth & Justesen* (45) kamen in Dänemark auf 28 mg/Tag von Flavonolen, Flavonen und Flavanonen (Justesen et al. 1998), was den berichteten Ergebnissen von *Hertog et al.* entspricht.

2.6.2.1 Absorption, Bioverfügbarkeit und Biotransformation von Flavonoiden

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen ist ein wichtiger Faktor um deren biologische Aktivität zu verstehen. Sie variiert zwischen verschiedenen Polyphenolen. Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen, sind die chemische Vielfalt der Polyphenole, Dekonjugation/Rekonjugation im Gastrointestinaltrakt, intestinale Absorption, und Enzyme, die für den Metabolismus verfügbar sind (Yang et al. 2001).

Absorption:

Die Absorption von Flavonoiden aus der Nahrung wurde lange als unerheblich betrachtet, da sie als β -Glucoside vorliegen (mit Ausnahme von Catechin) (Hollman and Katan 1999). Die Glycoside sind zu hydrophil um durch die Darmwand durch passive Diffusion zu penetrieren. Der Magen als Resorptionsort kommt nur für Flavonoidaglycone in Betracht (Kuhnau 1976).

Es wurde bislang davon ausgegangen, dass Flavonoidglycoside erst im Kolon durch Enzyme der Darmflora hydrolysiert und in verschiedene Metaboliten umgewandelt werden. Polyphenolglucoside werden beispielsweise durch β -Glucosidase im Darm gespalten, wohingegen Polyphenolrhamnoside mittels α -Rhamnosidase der Mikroflora im Kolon aufgeschlossen werden (Yang et al. 2001). Untersuchungen mit Quercetin und Quercetinglycosiden haben gezeigt, dass nach peroraler Verabreichung an Menschen Phase-II-Metaboliten entstehen (Schroeter et al. 2002). Die Quercetinglycoside werden dabei hydrolysiert und glucuronidiert. Es konnte bei Untersuchungen der Bioverfügbarkeit von Quercetinglycosiden festgestellt werden, dass bei Bindung der Glucose an 3- oder 4-Position des Aglycons kein Unterschied zu sehen war. Bei Bindung einer Rutinose am OH-C(3) des Aglycons nahm die relative Bioverfügbarkeit auf ca. ein Fünftel derjenigen von Quercetin-3-O-glucosid ab. Daraus kann man schließen, dass Zuckerreste im Respirationsprozess eine entscheidende Rolle spielen. Nach Verabreichung von Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid) wurde die maximale Plasmakonzentration nach etwa 7 h erreicht und nach der Verabreichung von Quercetin-3-O-glucosid bereits nach 0,7 h. Diese stark voneinander abweichenden pharmakokinetischen Profile weisen auf unterschiedliche Mechanismen und Resorptionsorte hin (Manach et al. 2004; Bhattaram et al. 2002; Aherne and O'Brien 2002).

Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass der Dünndarm eine wesentliche Rolle bei der Resorption von Flavonoiden spielt (Nemeth et al. 2003). Im menschlichen Dünndarm sind Lactase-Phlorizinhydrolase (LPH) und die zytosolische β -Glucosidase (CBG) in der Lage Flavonoide zu spalten. LPH befindet sich auf der luminalen Seite der Dünndarmepithelzellen und ist membrangebunden. Die entstandenen Aglyca gelangen über passive Diffusion durch die Zellmembran in das Zellinnere. CBG liegt intrazellulär vor und erfordert dadurch einen aktiven Transport der Glucoside in die Zelle, der durch natriumabhängigen Glucosetransporter-1 (SGLT-1) möglich gemacht wird (Hollman and Katan 1999).

Ausnahmen bilden die Anthocyane, wie Cyanidin-3-O-glucosid beispielsweise, bei denen bei der Absorption keine Hydrolyse stattfindet und Isoflavonoide, z.B. Daidzein-7-O-glucosid mit einer geringen Hydrolyserate. Nach dem Phase-II-Metabolismus sind die Polyphenole, gebunden an Plasmaproteine, systemisch verfügbar und werden in der Leber metabolisiert (Breinholt et al. 2002). Die Metabolite werden hauptsächlich renal ausgeschieden.

Flavonoidglycoside, die keine Substrate von LPH und CBG sind, werden im Kolon von verschiedenen Enzymen der Darmflora in phenolische Säuren und Aglyca metabolisiert (Hollman and Katan 1999).

Biotransformation:

Polyphenole werden durch Glucuronidierung, Sulfatierung und Methylierung im Dünndarm, Leber und anderen Organen konjugiert. Die Glucuronidierung wird katalysiert über eine mikrosomale UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), die UDP-Glucuronsäure als Cofaktor verwendet. Die Sulfatierung wird durch zytosolische Sulfotransferase (SULT) mit 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als Sulfatdonor katalysiert. Catechol-O-methyltransferase (COMT) katalysiert den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf ein Polyphenol. Die Polyphenole liefern viele potentielle Stellen für diese Reaktionen. Der Ablauf und das Ausmaß dieser Reaktionen hängen von verschiedenen Faktoren ab:

- a) Substratspezifität des Enzyms, das die Reaktivität und die Position der Konjugation determiniert.
- b) Die Verfügbarkeit von konjugierenden Enzymen und deren entsprechenden Cofaktoren, die auf Speziesunterschiede, genetische Polymorphismen, Enzyminduktion und metabolischen Status wirken.
- c) Dosis von Nahrungspolyphenolen (Yang et al. 2001).

Das Ausmaß der Konjugation ist dosis- und zeitabhängig und hat große interindividuelle Unterschiede. Die Konjugation von Polyphenolen wirkt sich auf deren biologischen Verbleib aus. Beispielsweise lässt die Verabreichung von Piperin (ein UGT-Inhibitor) merklich den Level des Serum-Curcumins in Ratten und bei Menschen steigen (Shoba et al. 1998).

Für einige Polyphenole ist außerdem der Phase-I Metabolismus von Bedeutung. So sind vor allem Komponenten mit Doppelbindungen abhängig vom reduktiven Metabolismus. Curcumin wird zum Beispiel zu Tetrahydrocurcumin im Intestinaltrakt konvertiert. Cytochrom P450 Enzyme können Polyphenole oxidieren und so zusätzliche phenolische

OH-Gruppen am Ring anhängen oder die O-Demethylierung vom methylierten Polyphenol katalysieren. Umfangreich hydrolysierte Polyphenole sind zu hydrophil um als Substrate von Cytochrom P450 Enzymen zu dienen (Yang et al. 2001).

2.6.3 Biologische Effekte der Flavonoide

Pflanzen enthalten unzählige phenolische Inhaltsstoffe. Viele von ihnen verändern metabolische Prozesse und haben daher einen Einfluss auf die Gesundheit (Yang et al. 2001). Die erste Untersuchung der biologischen Aktivität von Polyphenolen wurde 1936 von Rusznyak & Szent-Gyorgyi publiziert. Ursprünglich sollten diese zusammen als Vitamine klassifiziert werden. So war zunächst der Term „Vitamin P“ für Flavonoide angedacht, dieser wurde später jedoch wieder verworfen (Kuo 1997).

Zahlreiche epidemiologische Studien lassen darauf schließen, dass Flavonoide protektiv aufgrund ihrer antioxidativen und antikanzerogenen Eigenschaften gegen zahlreiche Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs und kardiovaskuläre Erkrankungen, wirken (Ness and Powles 1997).

Pflanzliche Polyphenole sind durch antioxidatives Potential in der Lage reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzufangen (Yang et al. 2001). Diese entstehen *in vivo* während des aeroben Metabolismus und können die Ursache von DNA-, Protein- und Lipidschäden sein (Ross and Kasum 2002). Die Akkumulation von nichtreparierten geschädigten Produkten könnte entscheidend für die Entwicklung von Tumoren, Atherosklerose, Diabetes und chronischen Entzündungen sein (Halliwell 1994).

Die antioxidativen Eigenschaften von phenolischen Komponenten sind bedingt durch deren Struktur (Ross and Kasum 2002). Die wichtigsten Strukturmerkmale, die für diese Aktivität verantwortlich sind, sind die ortho-Dihydroxy-Struktur im Ring B, eine Doppelbindung bei Position 2 und 3 in Konjugation mit einer 4-Keto-Funktion, eine Hydroxylgruppe an Position 3 und 5 bei Flavonolen, eine Di- und Trihydroxyphenol Struktur bei Catechinen, und die konjugierte Doppelbindung in der Seitenkette mit der ortho-Dihydroxyphenol-Struktur in der Kaffeesäure (Yang et al. 2001). Die Addition einer Hydroxylgruppe am C-4 in ortho-Position kann das antioxidative Potential erhöhen (Lien et al. 1999).

Studien haben gezeigt, dass die Aglyca, wie Quercetin, Luteolin, Myricetin und Kaempferol, eine höhere antioxidative Aktivität aufweisen als die konjugierten Flavonoide, wie Quercetin-3-O-glucosid, Quercitrin und Rutin (Noroozi et al. 1998; Ioku et al. 1995).

Flavonoide, in Konjugation mit anderen Antioxidantien, wie Vitamin C und E, haben des Weiteren die Möglichkeit Lipidperoxidation in der Phospholipiddoppelschicht aufgrund von reaktiven Sauerstoffspezies zu unterdrücken. Flavonoide können Radikale auf der Grenzfläche der Membran abfangen. Dadurch wird die Progression der Radikalkettenreaktion unterbunden (Ross and Kasum 2002). Bei äquimolaren Konzentrationen wiesen sogar viele Flavonoide eine größere antioxidative Aktivität auf als Vitamin C (Noroozi et al. 1998).

Neben ihrer Funktion als Radikalfänger können manche Flavonoide auch Metallionen, wie Eisen und Kupfer chelatieren, die die Fenton-Reaktion katalysieren und somit für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich sind (Yang et al. 2001; Ross and Kasum 2002). Die Möglichkeit mit Metallionen zu reagieren, ermöglicht es den Polyphenolen auch als Prooxidans zu agieren. Es wurde gezeigt, dass Flavonoide potent antioxidativ gegen Peroxy- und Hydroxyradikale wirken, jedoch im Zusammenhang mit Cu^{2+} ein Prooxidans darstellen (Cao et al. 1997).

Des Weiteren können zahlreiche Flavonoide oxidativen Stress durch Induktion antioxidativ wirksamer Gene, beispielsweise der Glutathion-S-Transferase (GST) mindern. GST ist ein Enzym, das den zytoplasmatischen Level an Glutathion erhöht und die Zelle somit vor oxidativem Stress, ausgelöst durch Wasserstoffperoxide, schützt. So waren viele Flavonoide, beispielsweise Quercetin, Myricetin und Fisetin, in der Lage die GST-spezifischen Aktivität zu erhöhen (Fiander and Schneider 2000).

Flavonoide tragen aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften auch zur Prävention von Atherosklerose bei (Hollman and Katan 1999). Die Oxidation von LDL (low density lipoprotein) scheint eine wichtige Rolle bei der sklerotischen Pathogenese zu spielen (Shaikh et al. 1988). Durch Verabreichung von Antioxidantien konnte die LDL-Oxidation vorgebeugt werden und somit das atherosklerotische Risiko gesenkt werden (Hollman and Katan 1999).

In der Zutphen Elderly Study wurde die Krebsmortalität in Verbindung mit Flavonoiden untersucht. Bei dieser Studie nahmen 805 Männer im Alter zwischen 65 und 84 Jahren teil, die pro Tag 26 mg Flavonoide zu sich nahmen. Dabei wurden jedoch keine Zusammenhänge zwischen Flavonen- und Flavonolen-Aufnahme und totaler Krebsmortalität gefunden. Die Entstehung bzw. der Verlauf spezifischer Tumorerkrankungen, beispielsweise von Lungenkrebs, konnte durch den Verzehr von Flavonolen bzw. Flavonen nicht beeinflusst werden (Hertog et al. 1994).

Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie mit ca. 10.000 Teilnehmern nach einem Follow-up von 24 Jahren eine Risikoreduktion von Lungenkrebs um 50 % im oberen Quartil des Probandenkollektivs mit der höchsten Flavonol-Aufnahme ermittelt werden (Knekt et al. 1997).

Die Verbindung zwischen Flavonol- bzw. Flavon-Aufnahme und dem Risiko eines Gehirnschlages wurde in einer Kohorte von 550 Männern mittleren Alters über einen Zeitraum von 15 Jahren untersucht. Die Probanden des oberen Quartil hinsichtlich der Flavonol und Flavon-Aufnahme (> 30 mg/Tag) wiesen ein um ca. 60 % reduziertes Krankheitsrisiko auf (Hollman and Katan 1999).

2.6.4 Anthocyane

Anthocyane (griech. anthos = Blüte, altgriech. kyáeneos = blau) sind natürlich vorkommende Polyphenole, die für die intensive Farbe von vielen Früchten und Gemüse wie Beeren, roter Grapefruit, Weintrauben, roter Zwiebeln und Rotkohl (siehe Tabelle 2) verantwortlich sind (Harborne 1988; Mazza 1995).

Die tägliche Aufnahme von Anthocyanen wird in den USA zwischen 150 und 215 mg geschätzt (Wang and Stoner 2008; Kowalczyk et al. 2003), wohingegen die Aufnahme von anderen Flavonoiden wie Genistein, Quercetin und Apigenin nur 20-25 mg/Tag beträgt (Hertog et al. 1993). Etwa 0,01 % der oral verabreichten Dosis wird mit dem Urin ausgeschieden (Joshi et al. 2001).

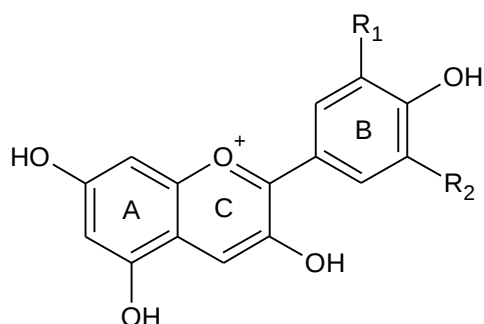
Tabelle 2: Anthocyanengehalt verschiedener Lebensmittel (modifiziert nach (Watzl 2001)).

Lebensmittel	mg/100g Frischgewicht
Brombeeren	115
Himbeeren	10-60
Heidelbeeren	83-420
Schwarze Johannisbeeren	130-400
Süßkirschen	2-450
Weintrauben	30-750
Aronia	200-1000
Blutorangen	200
Rote Zwiebeln	0-25
Rotkohl	25
Auberginen	750
Rhabarber	0-200
Rotwein	24-35
Portwein, rot	14-110

Anthocyane gehören zu den wasserlöslichen Pflanzenpigmenten (Kowalczyk et al. 2003). Im Gegensatz zu den Flavonoiden besitzen die Anthocyane in saurer Lösung eine positive Ladung (siehe Abbildung 12) und liegen somit als Kationen vor (Wang and Stoner 2008; Hou et al. 2004).

In der pflanzlichen Zelle kommen sie hauptsächlich glycosidisch gebunden vor. Die Zahl der verschiedenen Zuckerreste ist für die große Anzahl (etwa 500 verschiedene Komponente) der Anthocyane verantwortlich (Hou et al. 2004). Als Zucker finden sich neben Glucose auch Galaktose, Arabinose und Rhamnose, die zu Di- und Trisacchariden verknüpft sein können (Hou et al. 2004; Wang and Stoner 2008). Die Zucker sind im Allgemeinen an die 3-Hydroxygruppe gebunden, doch kommen auch 3,5-Diglycoside vor (Kowalczyk et al. 2003; Wang and Stoner 2008). Anthocyanidine, die Aglyca der Anthocyane, sind im pflanzlichen Material kaum vorhanden (Wang and Stoner 2008; Hou et al. 2004; Kowalczyk et al. 2003). Anthocyane sind wesentlich stabiler als ihre entsprechenden Aglyca (Kowalczyk et al. 2003).

Die in der Natur am häufigsten vorkommenden Verbindungen sind die Glycoside der Anthocyanidine Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin (Hou et al. 2004; Wang and Stoner 2008). Ihnen gemeinsam ist ihre Grundstruktur, das 2-Phenyl-benzo-[b]-pyran (siehe Abbildung 12).



Anthocyanidin	R ₁	R ₂
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OH	OCH ₃

Abbildung 12: Grundstruktur der Anthocyanidine (2-Phenyl-benzo-[b]-pyran)

Für die strukturellen Unterschiede sind die Anzahl und Position der Hydroxy- und Methoxysubstituenten am Aglycon, die Anzahl und Position der Zuckerreste und die Acylierung von diesen Gruppen verantwortlich (Kowalczyk et al. 2003).

Die Farben der Anthocyane hängen vom pH-Wert ihrer Lösung ab. Sie kommen in den Vakuolen im Gleichgewicht von vier Molekülspezies vor. Dazu zählen die rot gefärbte Hauptstruktur des Flavylumkations und drei Sekundärstrukturen. Bei pH < 2 tritt das Flavylumkation am häufigsten auf. Bei Anstieg des pH-Wertes verliert es sein Proton und die blaue Chinoid-Struktur wird gebildet. Gleichzeitig findet eine langsame

Hydratisierung statt, bei der aus dem Flavylumkation die farblose Hemiketal-Form entsteht. Diese tautomerisiert weiter durch eine Ringöffnung am C-Ring zum Chalkon (siehe Abbildung 13) (McGhie and Walton 2007).

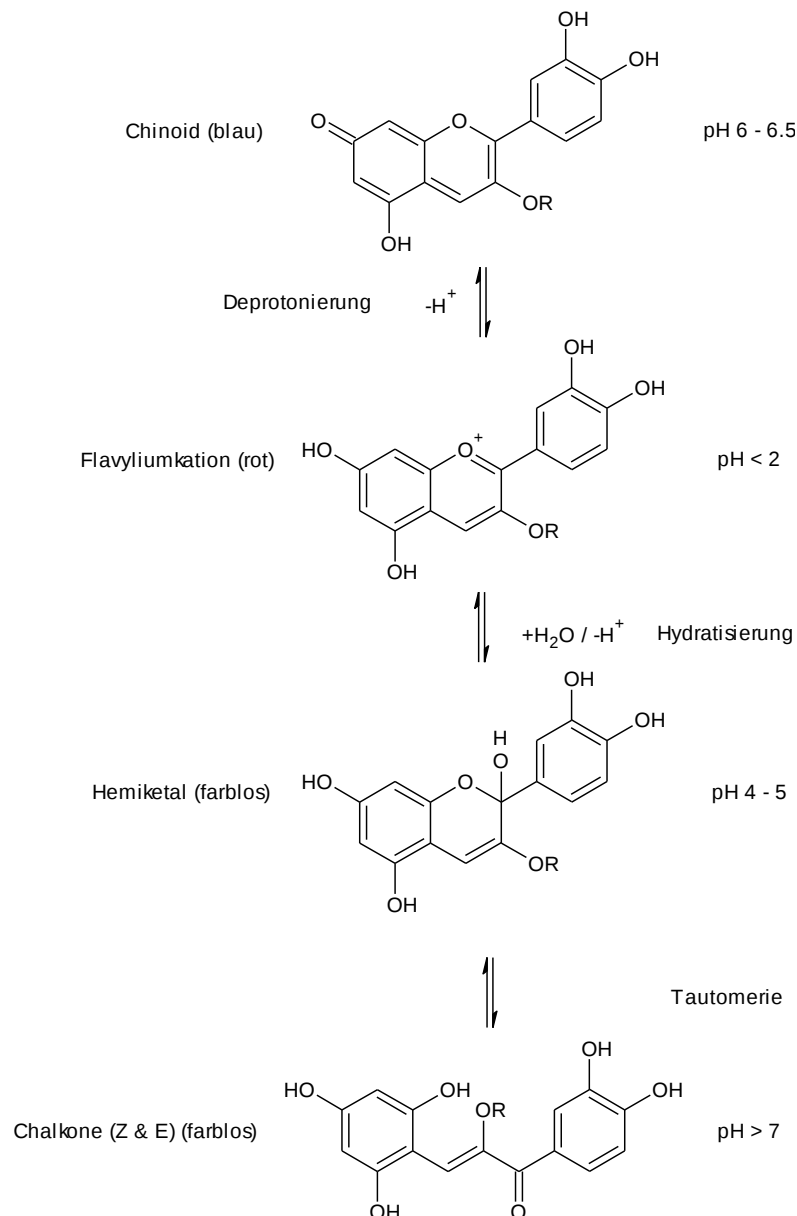


Abbildung 13: Die molekularen Strukturen der Anthocyane unter verschiedenen pH-Wert Bedingungen (McGhie and Walton 2007).

2.6.4.1 Biologische Wirkungen der Anthocyane und ihre Rolle in der Krebsprävention

Die präventiven Eigenschaften der Anthocyane werden hauptsächlich ihrer antioxidativen Aktivität zugeschrieben (Kowalczyk et al. 2003). Sie können, bedingt durch ihre chemische Struktur, mit vielen aktiven Substanzen im Körper reagieren. Studien bestätigen die antioxidative Eigenschaft von Anthocyanen. Diese resultiert aus der chemischen Struktur, insbesondere durch die Anwesenheit von Hydroxygruppen in

Position 3 am C-Ring und auch in 3'-4' Position im B-Ring (Kowalczyk et al. 2003; Hou et al. 2004). Die Hydroxygruppe am C-Ring ermöglicht die Chelatbildung mit Metallionen, z.B. mit Eisen und Kupfer (Kowalczyk et al. 2003). Die antioxidative Aktivität der Anthocyane korreliert mit der Acylierung der Zuckerreste mit aromatischen Hydroxysäuren (Seeram and Nair 2002). Anthocyane besitzen ein stärkeres antioxidatives Potential als Vitamin E (α -Tocopherol), Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin A (β -Carotin) berechnet als Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC) (Kowalczyk et al. 2003).

Anthocyane greifen auch in den Verlauf des Entzündungsprozesses ein, indem sie die Cyclooxygenase (COX) hemmen (Hou et al. 2004; Kowalczyk et al. 2003). COX liegt in drei Isoformen vor (Chandrasekharan et al. 2002; Warner and Mitchell 2002). COX-1 ist in vielen Zelltypen zu finden und ist verantwortlich für die Produktion von Prostaglandinen (PG). COX-3 ist eine Splicevariante von COX-1 und vorwiegend im zerebralen Cortex vertreten. Analgetische/antipyretische Arzneimittel wie Acetaminophen, Phenacetin, Antipyrine und Dipyrone können selektiv dieses Enzym hemmen. Die medikamentöse Hemmung der COX-3 resultiert in der Verminderung von Schmerzen und der Senkung von Fieber (Chandrasekharan et al. 2002). COX-2 wird durch proinflammatorische Stimuli, wie Mitogene, Cytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) in den Zellen *in vitro* und durch entzündliche Stellen *in vivo* induziert (Mitchell et al. 1994). Daten zeigen, dass COX-2 in vielen inflammatorischen Prozessen involviert und in verschiedenen Karzinomen induziert ist. Daraus kann man schließen, dass COX-2 eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese spielt (Hou et al. 2004). Interessant ist, dass einige chemopräventiv wirksame Antioxidantien die Expression von COX-2 durch Eingriff in dessen Regulationsmechanismus inhibieren können (Chinery et al. 1998). Wang et al fanden heraus, dass Anthocyane aus Sauerkirschen und das Aglycon Cyanidin die Aktivität von COX-1 und COX-2 inhibieren können (Wang et al. 1999).

Anthocyane und Proanthocyanidine haben auch antibakterielle Eigenschaften, beispielsweise hemmen sie die Adhäsion von Bakterien der Schleimhaut des Urogenitaltraktes (Howell 2002).

Sie zeigen desweiteren auch protektive Eigenschaften gegen Hepatozyten bei Hepatitis A und B (Knox et al. 2001) und auch bei Paracetamol-induzierter Hepatotoxizität (Ali et al. 2003).

Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Auswirkungen der Anthocyane auf zelluläre Signalkaskaden, insbesondere auf RTKs gegeben werden, da diese Gegenstand der vorliegenden Diplomarbeit sind.

In vitro:

Der extrazelluläre signalregulierte/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (ERK/MAPK) Signalweg stellt einen der größten Signalkaskaden dar, der die Zellproliferation reguliert (Lewis et al. 1998). Effektive Hemmung des EGFR führt zu einer Inaktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade und in weiterer Folge zur Hemmung des Zellwachstums. Bei vielen Tumorzelllinien liegt im Vergleich zu malignen Zellen der EGFR überexprimiert vor (Marko et al. 2004).

Die Aglyca der am häufigsten vorkommenden Anthocyane in der Nahrung, Cyanidin (Cy) und Delphinidin (Del) repräsentieren potente Inhibitoren des EGFR. Strukturaktivitätsstudien zeigen, dass die Anwesenheit der vicinalen Hydroxygruppe im Phenylring an der Position 2 im Ring B entscheidend für die Target-Interaktion ist. Die Anwesenheit einer einzelnen Hydroxygruppe oder Einführung von Methoxysubstituenten am Ring B resultieren in einem beträchtlichen Verlust der inhibitorischen Fähigkeiten (Marko et al. 2004; Teller et al. 2009a). Demnach zeigen Del und Cy die potenteste Wachstumshemmung, gefolgt von Malvidin (Mv) (Meiers et al. 2001; Marko et al. 2004). Die Abnahme der Hydroxygruppen reduziert signifikant das inhibitorische Potenzial. Daher scheinen die Anthocyane bessere Inhibitoren als ihre entsprechenden Glycoside zu sein. Anthocyane können in den Zellzyklus eingreifen (Kowalczyk et al. 2003) und die Zellproliferation hemmen (Wang and Stoner 2008).

Die Inkubation von HT29-Zellen mit Del führt zu einer konzentrationsabhängigen Unterdrückung der EGFR Phosphorylierung mit einem IC_{50} -Wert von $54 \pm 11 \mu M$. Ebenso wurde eine Hemmung der Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors in A431 Zellen festgestellt. Im Gegensatz zu Del beeinflusst das methoxylierte Mv die Autophosphorylierung von beiden RTKs EGFR und ErbB2-Rezeptor bis zu einer Konzentration von $100 \mu M$ nicht. Del mindert ebenfalls signifikant die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 bei einer Konzentration von $30 \mu M$ (Fridrich et al. 2008). ERK1/2 sind dem EGFR nachgeschaltete Signalelemente, die über die MAP-Kinase aktiviert werden (siehe Kap. 2.3).

Eine dreistündige Inkubation mit Del in humanen Brustkrebszellen AU-565 und humanen MCF-10A-Zellen zeigt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Unterdrückung der EGFR-Aktivität (Afaq et al. 2008).

Mit HPLC/DAD wurden der Zerfall der Anthocyane und die darauffolgende Bildung der phenolischen Säuren während der Inkubation von HT29-Zellen detektiert. Nach 30 Minuten war Del schon nicht mehr bestimmbar und ein enormer Abbau von Cy, Pg, Pn bemerkbar (Kern et al. 2007).

Del ist nicht nur ein potenter Inhibitor des EGFR, sondern auch von strukturverwandten Rezeptoren, wie ErbB2-, ErbB3-Rezeptor, VEGFR-2, VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor 2 und 3) und IGF-1R (insulin like growth factor receptor 1) (Teller et al. 2009a). ErbB und IGF-Rezeptoren sind in vielen Tumortypen überexprimiert, das in der Veränderung zellulären Signalkaskaden resultiert, die das Zellwachstum und Differenzierung beeinflussen (Karamouzis et al. 2007; Mitsiades et al. 2004; Ryan and Goss 2008). VEGF-Rezeptoren sind Schlüsselmolekulatoren von Angiogenese und Lymphangiogenese (Gerber et al. 1998; Korpelainen and Alitalo 1998; Thiele and Sleeman 2006).

An A431-Zellen wurde die Phosphorylierung von EGFR ($IC_{50} = 33 \pm 14 \mu M$) und ErbB2-Rezeptor ($IC_{50} = 51 \pm 23 \mu M$) in einem ähnlichen Ausmaß gehemmt, während die Heregulin-stimulierte Aktivierung des ErbB2-Rezeptors ($IC_{50} \sim 0,1 \mu M$) noch effektiver unterdrückt wurde. Der endogene Status des ErbB3-Rezeptors nimmt konzentrationsabhängig ab einer Konzentration von $1 \mu M$ ab, wohingegen er von EGFR und ErbB2-Rezeptor nicht verändert wird. Daraus kann man schließen, dass die Endozytose beeinflusst wird (Teller et al. 2009a). Lamy et al. (2008) wies zusätzlich die Hemmung der Phosphorylierung von PDGFR- β durch Inkubation der humanen Endothelzellen (HUVEC) mit Del nach (Lamy et al. 2008).

Es wurden Schweineaorten-Endothelzellen (PAE) mit VEGFR-2 und -3 transfiziert und es war eine Reduktion des Phosphorylierungsstatus von VEGFR-2 ab einer Konzentration von $5 \mu M$ Del sichtbar ($IC_{50} \sim 50 \mu M$). Eine komplette Hemmung der Phosphorylierung des VEGFR-3-Rezeptors konnte bei $50 \mu M$ Del nachgewiesen werden (Teller et al. 2009a). In HUVEC-Zellen wurde ebenfalls die Hemmung der VEGFR-2-Phosphorylierung durch Del beobachtet (Lamy et al. 2006).

In vivo:

Apc^{Min} Mäuse stellen ein gut etabliertes Modell der humanen Kolonkarzinogenese dar, die durch Fütterung mit Anthocyanen oder Cy *in vivo* signifikant weniger Adenoma im Caecum aufweisen als jene Mäuse, die eine Kontrollnahrung bekommen haben. Die Zahl der Adenome im Kolon und die Häufigkeit der Tumore im Dünndarm konnten jedoch in dieser Studie durch diese Nahrung nicht signifikant beeinflusst werden (Kang et al. 2003).

Bei einem anderen Versuch wurde die Nahrung von vier Wochen alten Apc^{Min} Mäusen mit einer anthocyanreichen Mischung aus Heidelbeere oder mit Cy-3-glc für 12 Wochen supplementiert. Es kam bei beiden Varianten zu einer Abnahme der Adenome im Dünndarm, die konzentrationsabhängig ist. Bei der höchsten Konzentration (0,3 %) von Cy-3-glc und dem Heidelbeerextrakt wurde die Anzahl der Adenome um 45 % bzw. um 30 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Cooke et al. 2006). Diese Tierversuche weisen, wie die *in vitro* Versuche, auf einen wachstumshemmenden Effekt der Adenome hin.

Epidemiologische Studien am Menschen konnten im Gegensatz zu den *in vivo* Tiermodellen bis jetzt noch keine überzeugenden Beweise liefern. Doch sie deuten darauf hin, dass der Konsum von Anthocyanen gewisse Parameter von oxidativen Schäden minimieren kann. Die Reduktion des Krebsrisikos durch Anthocyaneinnahme konnte jedoch nicht bewiesen werden (Wang and Stoner 2008).

In Italien wurde eine multizentrische Fall-Kontroll-Studie durchgeführt. Es nahmen 1.294 Patienten, die an Prostatakrebs litten, und 1.451 Kontrollen ohne Neoplasie teil. Die Ergebnisse zeigten keinen protektiven Effekt von Flavonoiden, inklusive Anthocyanidine gegen Prostatakarzinom (Bosetti et al. 2006).

Doch bei einer Pilotstudie konnten nun erste vielversprechende Ergebnisse geliefert werden. Ein anthocyanreicher Heidelbeerextrakt wurde Patienten, die an Kolonkrebs erkrankt waren, täglich für eine Woche vor ihrer Operation verabreicht. Es kam zu einer Verringerung der Proliferation des Tumorgewebes um 7 % im Vergleich mit präinterventiven Werten bei allen Patienten (Thomasset et al. 2009).

Eine Studie in Deutschland zeigte, dass Personen, die einen anthocyan-/polyphenolreichen Fruchtsaft zu sich nahmen, eine Reduktion der oxidativen DNA-Schädigung und eine signifikante Abnahme des reduzierten Glutathions im Vergleich zur Kontrolle bemerkbar waren (Duthie et al. 2006).

2.6.5 Heidelbeerextrakt und dessen Fraktionierungsschema

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein Heidelbeerextrakt (HBE) der Firma Symrise GmbH & Co.KG (Holzminden, Deutschland; Produktnr.: 600761) untersucht. Weiterhin wurden diverse Subfraktionen des HBE zur Untersuchung herangezogen, die von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) durch unterschiedliche Fraktionierungsverfahren gewonnen wurden. Der Extrakt und die Subfraktionen werden im folgenden Abschnitt näher definiert und charakterisiert.

Der untersuchte HBE wurde aus Trester der europäischen Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) mittels Methanol extrahiert. Weitere Aufarbeitungsschritte umfassen die Filtration, Einengung und Lyophilisierung (durchgeführt von der Firma Symrise GmbH & Co.KG). Der Extrakt wurde trocken und dunkel bei -80 °C gelagert. Er besteht zu 27,6 % aus Anthocyanen. Anthocyanidine (Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin, Malvidin) sind in geringen Mengen enthalten. Ein weiterer Bestandteil ist die Chlorogensäure, die 1,1 % des Extraktes ausmacht. Weitere Bestandteile sind Flavonole (Quercetin und seine Glycoside), Phenolcarbonsäuren (Gallussäure, Protocatechusäure, 5-Hydroxyvanillinsäure, Vanillinsäure, Syringasäure) und Hydroxyzimtsäuren, wie Kaffeesäure und p-Cumarsäure (siehe Tabelle 3).

Der HBE wurde von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) mittels Membranchromatographie SARTOBIND in zwei Hauptfraktionen aufgetrennt (siehe Abbildung 14). Die Membranchromatographie basiert auf dem Prinzip eines Membranionenaustauschers: Die Cellulose-Membran ist mit negativ geladenen Sulfonsäuregruppen substituiert. Die Extraktlösung wird angesäuert und die Flavylumkationen werden an der Membranoberfläche adsorbiert. Durch Zugabe von NaCl-Lösung werden die Flavylumkationen gegen Na⁺ ausgetauscht. Im Eluat befinden sich die Anthocyane und im Filtrat die Polymere und die Copigmente.

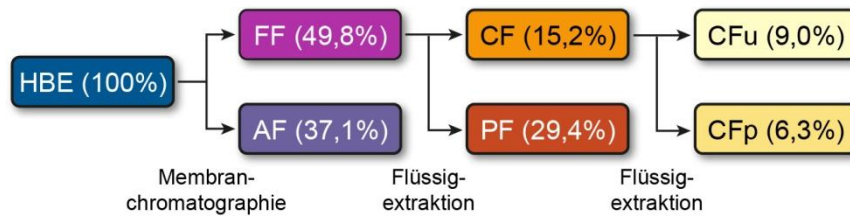


Abbildung 14: Fraktionierung des HBE mittels Membranchromatographie SARTOBIND mit anschließender Extraktion; HBE: Heidelbeerextrakt, AF: Anthocyanfraktion, FF: Filtratfraktion, PF: Polymerfraktion, CF: Copigmentfraktion, CFp: polare Copigmentfraktion, CFu: unpolare Copigmentfraktion (persönliche Mitteilung von Dipl. Andreas Juadjur, Arbeitskreis Prof. Dr Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Braunschweig).

Die erhaltene Anthocyanfraktion, das Adsorbat, macht 37,1 % und die Filtratfraktion 49,8 % des Gesamtextraktes aus.

Die Filtratfraktion wurde mittels Flüssigextraktion weiter aufgetrennt. Dazu wurde die wässrige Fraktions-Lösung mit Ethylacetat gegen H₂O/Methanol extrahiert. Die wässrige Phase enthält den Polymeranteil, der 29,4 % des Gesamtextraktes umfasst, und die organische Phase die restlichen Polyphenole, die weiterhin als Copigmente bezeichnet werden. Diese Fraktion macht einen Anteil von 15,2 % des Gesamtextraktes aus.

Die Polymerfraktion wurde mit H₂O gegen Ethylacetat extrahiert und somit in eine polare (17,2 %) und unpolare (12,2 %) Fraktion aufgetrennt.

Die Copigmentfraktion wurde mit Ethylacetat gegen H₂O ausgeschüttelt und man erhielt ebenfalls eine polare (6,3 %) und unpolare (9,0 %) Subfraktion.

Tabelle 3: Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Fraktionen des HBE; Quantifizierung erfolgte als: ¹Cyanidin-3-O-Glucosid-Äquivalente [520 nm]; ²Quercetin-3-O-Glucosid-Äquivalente [351 nm]; ³Gallussäure-Äquivalente [280 nm]; ⁴Molarität berechnet als Cyanidin-3-O-Glucosid nd = nicht detektierbar, nm = nicht messbar aufgrund von Koelution mit Anthocyanen (modifiziert nach Technische Universität Braunschweig)

		Extrakt	Anthocyan- fraktion (AF)	Filtrat- fraktion (FF)	Polymer- fraktion (PF)	Polymere polar	Polymere unpolar	Copigmente (CF)	Copigmente polar (CFp)	Copigmente unpolar (CFu)
		[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]	[%]/[μM]
Anthocyan- gehalt¹	gesamt	27,62/ (113,94)	70,9/108,4 ⁴	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aglyca	Delphinidin	nm	0,35/ (0,86)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Cyanidin	nm	0,29/ (0,75)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Petunidin	0,09/ (0,51)	0,15/ (0,32)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Peonidin	0,03/ (0,2)	0,05/ (0,12)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Malvidin	0,06/ (0,33)	0,13/ (0,26)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlorogen- säure		1,10/ (6,21)	nd	1,34/ (3,77)	nd	nd	nd	2,68/ (2,31)	5,82/ (2,06)	0,48/ (0,24)
Flavonole²	Quercetin	0,28/ (1,85)	nd	1,62/ (5,34)	nd	nd	nd	4,97/ (5,01)	0,44/ (0,18)	8,15/ (4,83)
	Quercetin-Galactosid	0,34/ (1,46)	nd	0,23/ (0,49)	nd	nd	nd	0,31/ (0,20)	0,47/ (0,13)	0,19/ (0,07)
	Quercetin-Glucuronid	0,41/ (1,71)	nd	0,57/ (1,19)	nd	nd	nd	1,52/ (0,97)	3,19/ (0,84)	0,36/ (0,13)
	Quercetin-Arabinosid	0,12/ (0,55)	nd	nm	nd	nd	nd	0,12/ (0,08)	0,28/ (0,08)	nd
	Quercetin-Rhamnosid	0,12/ (0,53)	nd	nm	nd	nd	nd	0,08/ (0,05)	0,19/ (0,05)	nd
	Myricetin	0,15/ (0,94)	nd	0,48/ (1,50)	nd	nd	nd	2,13/ (2,04)	0,32/ (0,13)	3,39/ (1,91)
Phenol- carbon- säuren³	Gallussäure	0,15/ (1,76)	nd	0,63/ (1,87)	nd	nd	nd	0,63/ (1,13)	1,24/ (0,92)	0,20/ (0,21)
	Protocatechusäure	0,21/ (2,73)	nd	1,15/ (2,72)	nd	nd	nd	1,15/ (2,27)	0,80/ (0,65)	1,39/ (1,62)
	5-	0,05/ (0,54)	nd	0,34/ (0,81)	nd	nd	nd	0,34/ (0,56)	0,35/ (0,24)	0,33/ (0,32)
	Hydroxyvanillinsäure	nm	nd	0,39/ (0,83)	nd	nd	nd	0,39/ (0,71)	0,24/ (0,18)	0,50/ (0,53)
	Vanillinsäure	nm	nd	0,27/ (0,55)	nd	nd	nd	0,27/ (0,42)	0,18/ (0,11)	0,35/ (0,32)
	Syringasäure									
Hydroxy- zimtsäuren³	Kaffeesäure	nm	nd	0,23	nd	nd	nd	0,46	0,15	0,67
	p-Cumarsäure	nm	nd	0,42	nd	nd	nd	1,29	0,26	2,02
sonstige³	Depsid	0,01	nd	0,10	nd	nd	nd	0,19	0,19	0,20
	Cumaroyl-Iridoid	0,13	nd	0,08	nd	nd	nd	0,06	0,15	nd
	Cumarsäure-Derivat	0,05	nd	0,09	nd	nd	nd	0,13	0,31	nd
Prozentualer Anteil am Gesamtextrakt		100 %	37,1 %	49,8 %	29,4 %	17,2 %	12,2 %	15,2 %	6,3 %	9,0 %

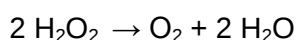
2.7 Bildung von Wasserstoffperoxid unter Zellkulturbedingungen durch Polyphenole

Polyphenole sind im Stande, mit noch unbekannten Bestandteilen des Zellkulturmediums zu interagieren und so Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu generieren, welches dann im Medium angereichert wird (Hou et al. 2005; Dashwood et al. 2002; Halliwell et al. 2000). Als Mechanismus wird die Autooxidation zu Grunde gelegt, wobei die Reaktion von Metallionen wie Cu^{2+} , die im Zellkulturmedium vorliegen, katalysiert werden soll (Lapidot et al. 2002; Hou et al. 2005).

Die Antwort der Zellen auf Wasserstoffperoxid ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie der zu untersuchenden Zellart, der gebildeten Menge von Wasserstoffperoxid sowie die eingesetzte Konzentration an Katalase und anderen H_2O_2 -verminderten Enzymen (Long et al. 2000).

Es besteht auch eine Abhängigkeit zwischen dem eingesetzten Zellkulturmedium und der Akkumulation von Wasserstoffperoxid. So wurde bei Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) die höchste Konzentration an Wasserstoffperoxid ermittelt (Long et al. 2000). Weiterhin ist die Akkumulation von H_2O_2 sowohl von der Substanzinkubationszeit als auch von der Substanzkonzentration abhängig (Long et al. 2000; Lapidot et al. 2002; Bellion et al. 2009). Wasserstoffperoxid hat einen Einfluss auf Proteintyrosinkinasen, indem es deren Phosphorylierungsstatus anheben kann und somit an einer erhöhten Signaltransduktion beteiligt ist (DeYulia and Carcamo 2005). Der Grund dafür ist eine Inaktivierung der Proteintyrosinkinase-Phosphatase B1 (PTPB1) durch reaktive Sauerstoffspezies, beispielsweise Wasserstoffperoxid. PTPB1 ist für die Hydrolyse von Phosphotyrosin verantwortlich und somit an der Inaktivierung der RTK abhängigen Signaltransduktion beteiligt.

Darüber hinaus kann Wasserstoffperoxid die Stabilität der Testverbindungen modulieren (Kern et al. 2007). Viele Ergebnisse könnten aufgrund der artifiziellen Erzeugung von oxidativem Stress durch H_2O_2 verfälscht sein. Daher wird empfohlen, Katalase oder andere Enzyme, die die Wasserstoffperoxidbildung reduzieren oder H_2O_2 abbauen, zuzusetzen. H_2O_2 disproportioniert bei Anwesenheit von Katalase in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O):



Dadurch wird die Akkumulation unterdrückt und die gemessenen Effekte in der Zellkultur können nun ohne weiteres auf die Wirkung der Polyphenole zurückgeführt werden (Lapidot et al. 2002).

3 Problemstellung

In Österreich erkranken jährlich etwa 36.000 Menschen an Krebs, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Bösartige Tumorerkrankungen stellen, nach den Herz-Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache dar (Statistik-Austria, 2011). Aufgrund der hohen Inzidenz an Kolorektalkarzinomen wuchs das Interesse an der Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen, die möglicherweise chemopräventive Eigenschaften aufweisen. Ernährungsgewohnheiten spielen vor allem bei Tumoren des Kolons eine wesentliche Rolle.

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe haben in den letzten Jahren u.a. aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaft zunehmend an Bedeutung erlangt. Vor allem den Anthocyanidinen werden chemopräventive Eigenschaften zugeschrieben. Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*) sind reich an Anthocyanen, die glykosylierten Formen der Anthocyanidine, und an weiteren sekundären Pflanzeninhaltsstoffen.

Die Tumorentstehung wird mit Veränderungen der Aktivität von Oberflächenrezeptoren und infolgedessen ihrer nachgeschalteten Signaltransduktionswege in Verbindung gebracht. Dies führt zur Modulation von Signalelementen, die das Zellwachstum und die Differenzierung regulieren. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) sowie der nachgeschaltete MAPK-Signalweg sind zentrale Elemente der Steuerung der Zellproliferation.

Ziel ist es, die Aktivität der Rezeptoren der ErbB-Familie durch Nahrungsmittel bzw. pflanzliche Inhaltsstoffe zu mindern und dadurch prokanzerogenen Prozessen wie der Tumorentstehung bzw. dem –Wachstum vorzubeugen.

Viele Studien haben sich bereits mit Beeren- und Apfelextrakten sowie charakteristischer Inhaltsstoffe und deren chemopräventives Potential beschäftigt, die ein inhibitorisches Potential auf diverse Rezeptortyrosinkinasen und das Zellwachstum zeigten (Meiers et al. 2001; Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007b; Fridrich et al. 2007a; Teller et al. 2009a; Teller et al. 2009b).

Die hemmende Wirkung der Anthocyanidine und anderer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf die Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen, vor allem auf den EGFR, wurde schon vielfach untersucht.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit ist es herauszufinden, ob die Anthocyane einen wesentlichen Beitrag zur Hemmwirkung des HBEs auf die Phosphorylierung des EGFRs leisten oder ob andere bioaktive Verbindungen dafür verantwortlich sind.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss diverser Subfraktionen des HBE auf die Aktivität des EGF-Rezeptors

Mittels Western Blot Analyse wurde die Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR-Rezeptors unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Dabei wurde jede Fraktion in DMSO gelöst, da sie schlecht wasserlöslich sind und anschließend im Zellmedium homogenisiert. Die Endkonzentration von DMSO im Zellmedium betrug 1 %. Aus diesem Grund wurde eine 1%ige DMSO-Lösung in Kulturmedium als Lösungsmittel für jeden Versuch mitgeführt, die in weiterer Folge als DMSO-Kontrolle bezeichnet wird.

Vorherige Untersuchungen im Arbeitskreis haben gezeigt, dass der HBE sowohl die Aktivität des EGFRs (siehe Abbildung 15) als auch die Wachstumshemmung von Tumorzellen (siehe Kap. 4.5) signifikant unterdrückt. Diese Daten wurden als Grundlage für die Aktivität des nativen Extraktes herangezogen und mit den Daten zu den Subfraktionen ergänzt.

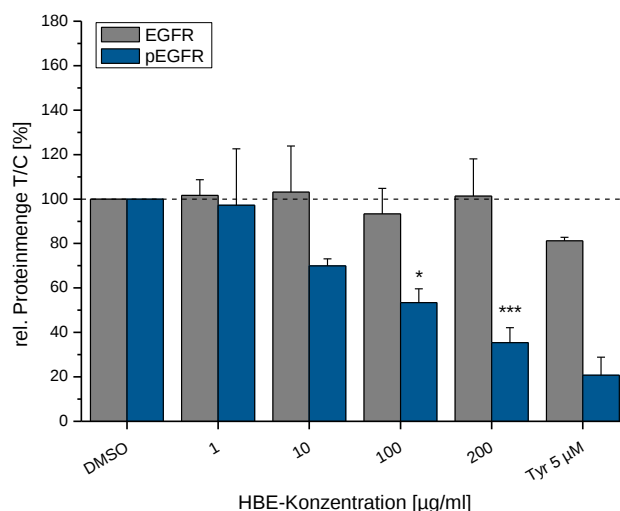


Abbildung 15: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch HBE unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (unveröffentlichte Daten, erhoben von Nicole Teller); Tyr: Tyrphostin AG1478 (5 µM), MW $\pm$ SD aus vier unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Mit jeder einzelnen Subfraktion wurde in aufsteigenden Konzentrationen für 45 min im serumfreien Medium inkubiert. Bei jedem Versuch wurden HBE (200 µg/ml) und der spezifische EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 (1 µM) als Positivkontrollen mitgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde für 15 min mit dem Wachstumsfaktor EGF (100 ng/ml) stimuliert. Um konstante Proteingehalte zwischen den einzelnen Proben

gewährleisten zu können, wurden diese mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt (siehe Kap. 6.2.3), normalisiert und darüber hinaus in jedem Versuch mit dem Kontrollprotein α -Tubulin die Menge des aufgetragenen Proteins überprüft. Da EGFR (170 kDa) und α -Tubulin (54 kDa) unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, wurde für die Beladungskontrolle ein zusätzliches 12%iges Polyacrylamidgel mitgeführt. Im Gegensatz dazu wurden EGFR und pEGFR in einem 7%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Pipettierschema siehe Tabelle 7). Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Immunodetektion mit polyklonalen Antikörper quantifiziert und in Bezug zur Negativkontrolle (T/C) angegeben (siehe Kap. 6.2.6).

Die Konzentrationen der Subfraktionen [$\mu\text{g/ml}$] wurden entsprechend des Fraktionierungsschemas und ihrem prozentuellen Anteil am Gesamtextrakt berechnet. Die ersten Konzentrationen dieser Subfraktion wurden in Bezug zu den beiden höchsten Konzentrationen (50, 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$) des zuvor untersuchten HBE gewählt. Diese werden im Folgenden als HBE-Äquivalenzkonzentrationen bezeichnet. So konnten die erhaltenen Ergebnisse direkt verglichen und der Einfluss jeder Subfraktion auf die zellwachstumshemmende Eigenschaft des HBE ermittelt werden. Für jeden Versuch wurden zwei DMSO-Kontrollen und HBE in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ mitgeführt und die Ergebnisse auf den Mittelwert der beiden Negativkontrollen (T/C) bezogen.

Im Folgenden werden die einzelnen Subfraktionen und deren Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs in HT29-Zellen dargestellt und diskutiert.

4.1.1 Anthocyanfraktion

Der HBE wurde mittels Membranchromatographie SARTOBIND in die Anthocyanfraktion (AF) und in die Filtratfraktion (FF) aufgetrennt. Der prozentuelle Anteil der AF vom Gesamtextrakt beträgt 37,1 % (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Die Ergebnisse des Western Blots von vier bis acht unabhängigen Versuchen sind in der Abbildung 16 veranschaulicht.

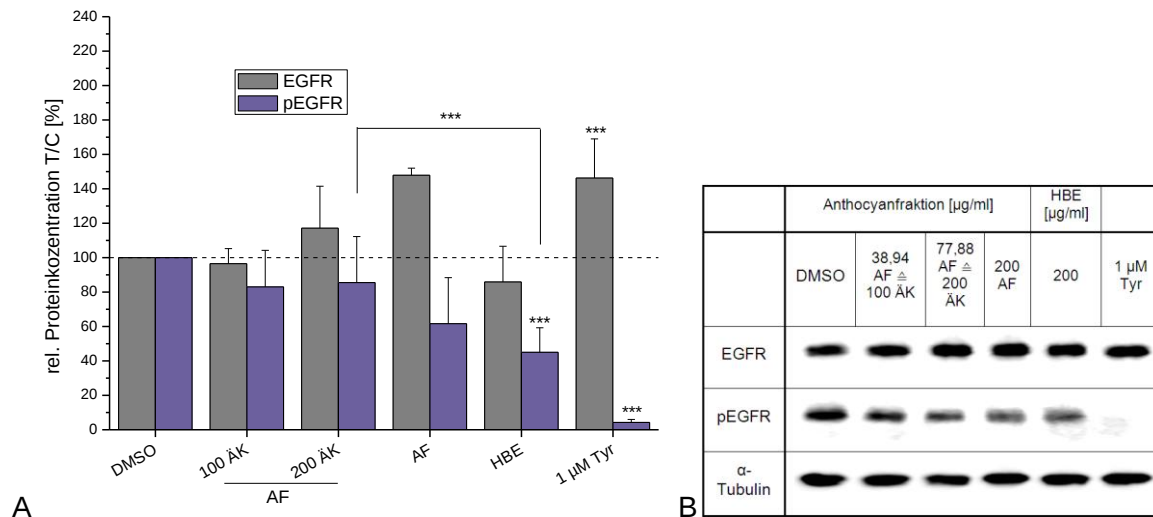


Abbildung 16: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch Anthocyanfraktion (AF) mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (38,94 bzw. 77,88 µg/ml absolut) und mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus vier bis acht unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die Inkubation der HT29-Zellen mit AF erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen. Die ersten beiden Konzentrationen dieser Subfraktion wurden in Bezug zu den beiden höchsten Konzentrationen (100 und 200 µg/ml) des zuvor untersuchten HBE gewählt. Diese werden im Folgenden als HBE-Äquivalenzkonzentrationen bezeichnet. Da AF einen Anteil von 37,1 % des Gesamtextraktes ausmacht, resultieren daraus die Absolutkonzentrationen 38,9 und 77,9 µg/ml. Die Effekte auf die Phosphorylierung können so direkt im Kontext des HBE diskutiert werden. Als dritte Konzentration wurden 200 µg/ml gewählt, um den Effekt der AF direkt mit anderen Subfraktionen vergleichen zu können.

Die AF-Inkubation mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (38,9 bzw. 77,9 µg/ml absolut) unterdrückte die EGFR-Phosphorylierung nur auf maximal $83,0 \pm 21,2$ % (T/C), jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 16). Somit scheint die AF nur einen kleinen Anteil der biologischen Wirksamkeit des HBE (200 µg/ml) auszumachen, der die EGFR-Phosphorylierung signifikant auf $45,0 \pm 14,2$ % (T/C) reduziert. Die AF-Inkubation mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml resultierte dennoch in einer potenten Unterdrückung der Rezeptoraktivität auf $61,6 \pm 26,7$ % (T/C). Diese AF-Konzentration würde jedoch einer HBE-Konzentration von 539 µg/ml entsprechen.

Die Inkubation der HT29-Zellen mit der Positivkontrolle Tyrphostin AG1478 (1 μ M) resultierte in der signifikanten Stimulation des endogenen Status des EGFRs auf $146,2 \pm 22,8$ % (T/C). Der Grund für dieses Phänomen könnte sein, dass das Cycling des Rezeptors gestört wird. Der Gehalt des phosphorylierten Rezeptors wurde dagegen signifikant auf $4,2 \pm 1,8$ % (T/C) gehemmt. Der Proteingehalt des Zelllysats (bestimmt mittels α -Tubulin) blieb während der Inkubation mit AF und HBE annähernd konstant.

AF besteht zu 70,9 % aus Anthocyanen. In der Lösung von 77,9 μ g/ml (entspricht 200 μ g/ml HBE) resultiert somit eine Anthocyankonzentration von 108,4 μ M berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid (Cy-3-glc).

Es ist bekannt, dass vor allem die Aglyca der Anthocyane, wie Cyanidin (Cy) und Delphinidin (Del) potente Inhibitoren des EGFR sind. Del und Cy zeigten die potenteste Wachstumshemmung, gefolgt von Malvidin (Mv) (Marko et al. 2004; Teller et al. 2009a; Meiers et al. 2001). Nach Inkubation von HT29-Zellen mit Del kam es zu einer konzentrationsabhängigen Unterdrückung des Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors mit einem IC_{50} -Wert von 54 ± 11 μ M. Ebenfalls hat man eine Hemmung der Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors in A431 Zellen beobachtet. Del minimierte auch signifikant die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 bei einer Konzentration von 30 μ M (Fridrich et al. 2008). Im Gegensatz dazu wiesen die Glycoside keine hemmenden Effekte auf (Meiers et al. 2001).

Das bedeutet, dass die Anthocyane nur bedingt eine Rolle für die Bioaktivität des HBE in Hinsicht auf die Unterdrückung der EGFR-Phosphorylierung *in vitro* spielen. Die Aglyca (Anthocyanidine), die als potente Hemmstoffe bekannt sind, sind in nur sehr geringen Konzentration (< 0,9 μ M) in dieser Subfraktion enthalten und haben somit wenig Einfluss auf die Wirkung des Extraktes.

4.1.2 Filtratfraktion

Die Filtratfraktion (FF) macht 49,8 % des Gesamtextraktes aus (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Es wurde ebenfalls die Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs in HT29-Zellen untersucht (siehe Abbildung 17).

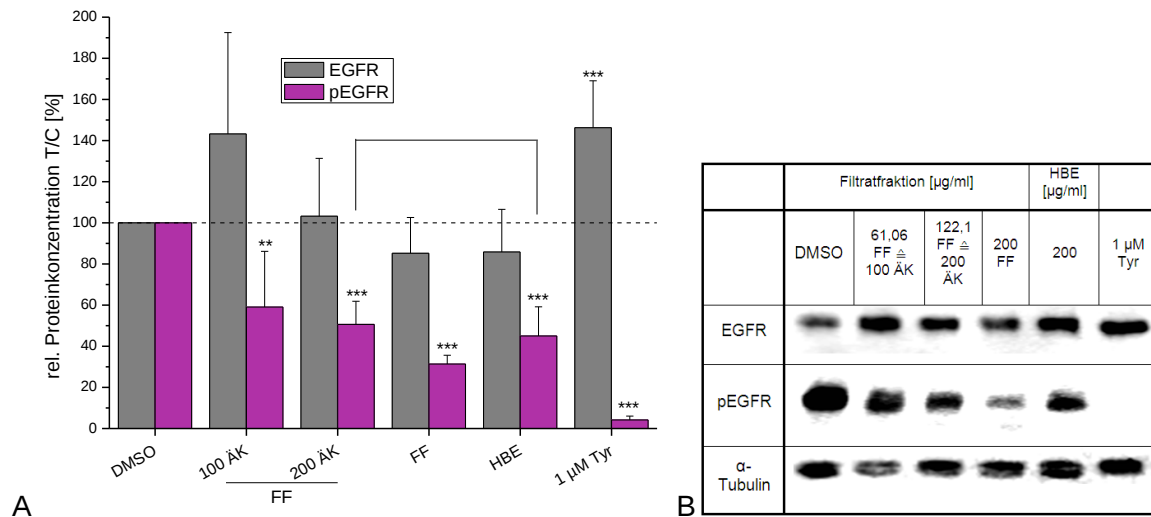


Abbildung 17: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch die Filtratfraktion (FF) mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (61,06 bzw. 122,1 µg/ml absolut) und mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen B) Repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

In Abbildung 17 wird deutlich, dass FF in aufsteigenden Konzentrationen, die analog zur AF gewählt wurden, die Aktivität des EGFR signifikant hemmte. In der HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml (122,1 µg/ml absolut) war eine signifikante Hemmung des Phosphorylierungsstatus des EGFR auf $50,6 \pm 11,3$ % (T/C) durch FF zu beobachten. Der endogene Status wurde, wenn man die Standardabweichung berücksichtigt, im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration nur leicht verringert. Dies kann jedoch auf Schwankungen der Western Blot Analyse zurückgeführt werden. Der Gesamtproteingehalt (bestimmt über α-Tubulin) blieb über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg nahezu konstant.

FF setzt sich u.a. aus 1,3 % (3,8 µM) Chlorogensäure, 2,9 % (8,5 µM) Gesamt-Quercetin inklusive Glucoside und 1,2 % (2,7 µM) Protocatechusäure zusammen (Auflistung siehe Tabelle 3). Das Flavonol Quercetin wurde schon früher als ein Inhibitor der PTK-Aktivität von EGFR beschrieben (Kern et al. 2005; Lee et al. 2002; Bhatia et al. 2001). Die Behandlung von HT29-Zellen mit Quercetin hat eine Unterdrückung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors mit einem IC_{50} -Wert von $0,6 \pm 0,1$ µM gezeigt. Eine signifikante Abnahme von phosphorylierten ERK1 und ERK2 wurde mit vergleichbaren IC_{50} -Werten für beide Isoformen beobachtet (ERK1: $7,7 \pm 2,1$ µM; ERK2: $6,6 \pm 3,5$ µM) (Fridrich et al. 2008). Im Gegensatz dazu beobachtete Bhatia et al. (2001) in A431 Zellen nur einen marginalen Effekt bis zu einer Konzentration von 200 µM

(Bhatia et al. 2001). Interessant ist auch, dass Quercetin in A431 Zellen ebenfalls nur geringe hemmende Eigenschaften auf die Aktivität des ErbB2-Rezeptors besitzt (Fridrich et al. 2008).

Zur Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) konnten keine Literaturdaten im Bezug auf die Aktivität des EGF-Rezeptors gefunden werden. Deshalb wurde die Reinsubstanz in aufsteigender Konzentration mittels Western Blot getestet (siehe Kap. 4.3). Die reine Chlorogensäure (CGA) führte in aufsteigender Konzentration zu einer signifikanten Zunahme der EGFR-Aktivität (siehe Abbildung 24).

Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die starke Hemmleistung der FF dadurch zustande kommt, dass mögliche antagonistische Effekte aufgrund der stimulierenden Wirkung des EGFR durch CGA und aufgrund der hemmenden Wirkung von Quercetin dafür verantwortlich sind. Die FF ist im Gegensatz zur AF die Fraktion mit dem deutlich stärkeren Hemmpotential hinsichtlich der EGFR-Aktivität und scheint für die Wirkung des HBE hauptursächlich zu sein.

Die FF wurde von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) mit Ethylacetat gegen H₂O/Methanol extrahiert und somit in zwei weitere Subfraktionen, in die Polymerfraktion und Copigmentfraktion aufgetrennt.

4.1.3 Polymerfraktion

Die Polymerfraktion (PF) umfasst 29,4 % des HBE. Seine Zusammensetzung konnte mit der HPLC nicht detektiert werden. Es lässt sich vermuten, dass diese Subfraktion oligomere Procyanidine und Tannine beinhaltet. Abbildung 18 veranschaulicht die Ergebnisse des Western Blots von sechs unabhängigen Versuchen im Hinblick auf den Effekt der PF auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors.

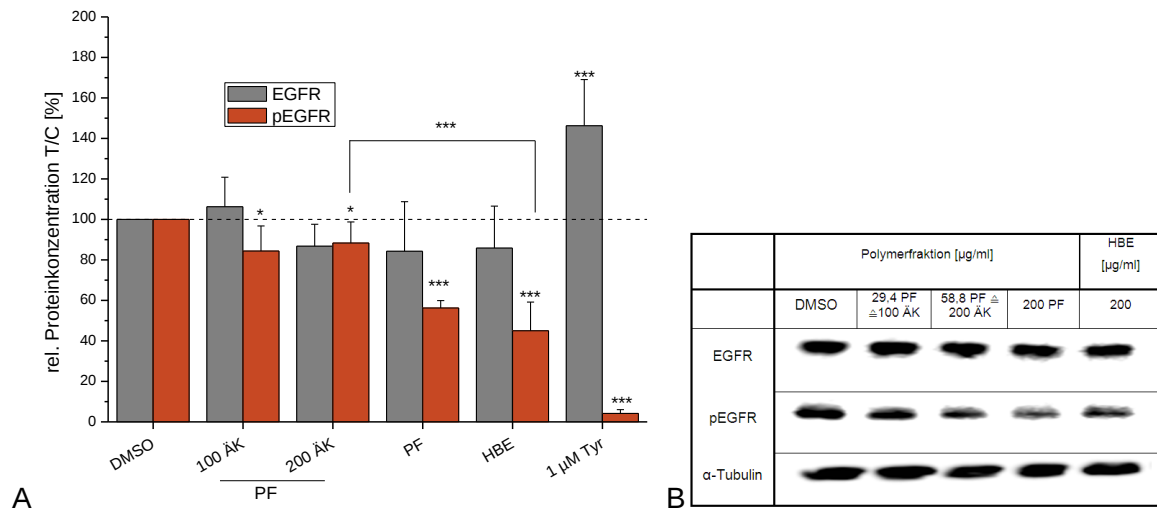


Abbildung 18: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch die Polymerfraktion (PF) mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (29,4 bzw. 58,8 µg/ml absolut) und mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die Inkubation der HT29-Zellen mit der PF erfolgte analog zur AF und FF in unterschiedlichen Konzentrationen. Es wurden wie zuvor zwei Konzentrationen dieser Subfraktion in Bezug zu den beiden höchsten HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml gewählt. Da PF 29,4 % des HBE umfasst, resultieren daraus die Absolutkonzentrationen 29,4 µg/ml und 58,8 µg/ml. Als dritte Konzentration wurde 200 µg/ml absolut gewählt, die schlussendlich einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 680,4 µg/ml entsprechen würde.

Der endogene Status wies bei 29,4 µg/ml PF einen geringen Anstieg auf, während dieser bei zunehmender Konzentration leicht sank. Dies lässt sich auf die Schwankungsbreite der Western Blot Analyse zurückführen.

Die PF-Inkubation mit den beiden Konzentrationen in Relation zum Gesamtextrakt (29,4 µg/ml und 58,8 µg/ml) unterdrückte die EGFR-Phosphorylierung signifikant nur auf $84,3 \pm 12,5$ % bzw. $88,4 \pm 10,4$ % (T/C), hingegen die Aktivität des Rezeptors bei der PF-Inkubation mit 200 µg/ml auf $56,3 \pm 3,7$ % (T/C) minimiert wurde. Somit scheint die PF nur einen kleinen Beitrag zur Bioaktivität des HBE zu leisten und weist ein geringeres inhibitorisches Potential als FF auf.

Der Proteingehalt (bestimmt mittels α-Tubulin) blieb über den gesamten Konzentrationsbereich nach Inkubation mit der PF und HBE konstant.

Der Effekt von oligomeren Procyanidinen auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors wurde bereits untersucht. Das trimere Procyanidin PC1 weist in HT29-Zellen eine potente Hemmwirkung auf die EGFR-Autophosphorylierung mit einem IC_{50} -Wert von $35 \pm 15 \mu\text{M}$, wohingegen das tetramere Procyanidin PA2 bis zu einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ sich nicht signifikant auf die Aktivität des EGFR auswirkte. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Effekt von oligomeren Procyanidinen auf den EGFR durch das ansteigende Molekulargewicht begrenzt ist (Fridrich et al. 2007a).

Eine aufgereinigte Polymerfraktion, die mittels Lösungsmittlextraktion und Hexanfällung von einem Heidelbeerextrakt an der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) aufgetrennt worden ist, zeigte ab einer HBE-Äquivalenzkonzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors. Bei einer HBE-Äquivalenzkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ nahm die Aktivität des EGFR auf $68,2 \pm 7,6 \%$ (T/C) ab (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck).

4.1.4 Copigmentfraktion

Eine Unterfraktion der Filtratfraktion ist die Copigmentfraktion (CF). Ihr prozentueller Anteil vom Gesamtextrakt beträgt $15,2 \%$ (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Die Abbildung 19 stellt den Effekt dieser Fraktion auf den endogenen und den phosphorylierten Status des EGF-Rezeptors mittels Western Blot in drei bis acht unabhängigen Versuchen dar.

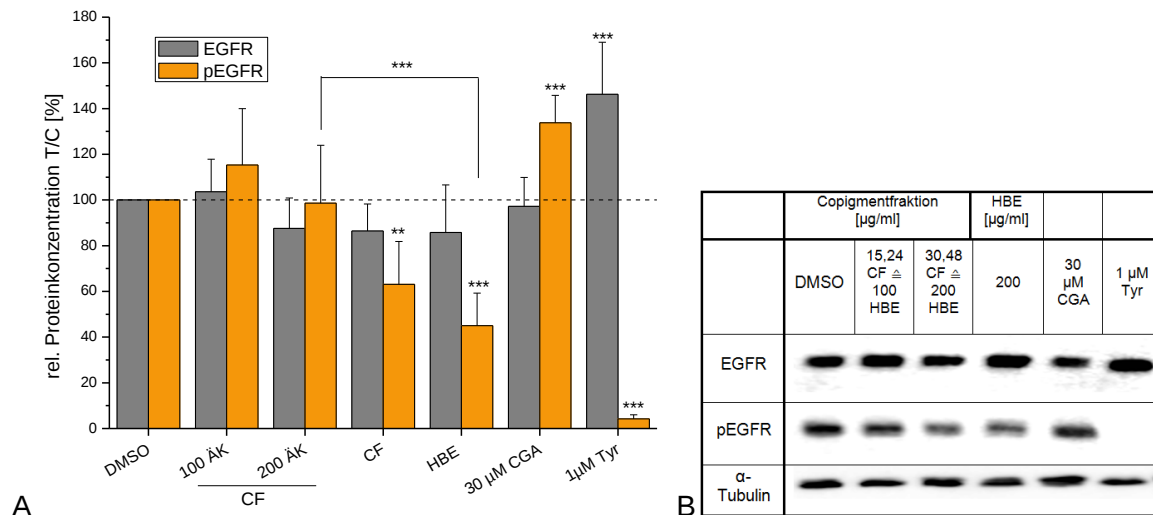


Abbildung 19: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch die Copigmentfraktion (CF) mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (15,24 bzw. 30,48 µg/ml absolut) und mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; CGA: Chlorogensäure; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus drei bis acht unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Es wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen analog zu den vorherigen Subfraktionen mit CF inkubiert. Der endogene Status war anfangs bei 15,2 µg/ml CF, die 100 µg/ml HBE entspricht, leicht erhöht und sank dann bei der darauffolgenden Konzentrationen leicht ab. Dies lässt sich auf Schwankungen der Western Blot Analyse zurückführen. Der Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors zeigte bei den beiden niederen Konzentrationen, die einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 100 bzw. 200 µg/ml entsprechen, keine Unterdrückung. Die CF-Inkubation mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 µg/ml hemmte den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors auf $63,1 \pm 18,8$ % (T/C), die allerdings einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 1.315,8 µg/ml entsprechen würde. Der Proteingehalt der Zelllysate (bestimmt mittels α-Tubulin) blieb während der Inkubation mit der AF und dem HBE annähernd konstant.

Da CF zu 2,7 % (2,3 µM) aus CGA besteht, wurde diese mit einer Konzentration von 30 µM ebenfalls mitgeführt. Dabei kam es zu einer signifikanten Stimulierung des Phosphorylierungsstatus von EGFR auf $133,8 \pm 11,9$ % (T/C). Da es für CGA noch keine experimentellen Daten in der Literatur zu finden waren, wurde diese ebenfalls in aufsteigenden Konzentrationen mittels Western-Blot in HT29-Zellen auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors untersucht (siehe Kap. 4.3).

Die CF besteht u.a. aus 7,0 % (6,3 μ M) Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside). Es konnte gezeigt werden, dass Quercetin schon in geringen Konzentration die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors hemmt (Fridrich et al. 2008).

Eventuell lässt sich die schwache Hemmung dieser Fraktion aufgrund antagonistischer Effekte zwischen CGA und Quercetin erklären.

Die Copigmentfraktion wurde anschließend mit Ethylacetat gegen H₂O extrahiert und in die polare und unpolare Phase aufgetrennt.

4.1.5 Polare Copigmentfraktion

Die polare Copigmentfraktion (CFp) ist eine Subfraktion der CF und macht 6,3 % des Gesamtextraktes aus (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Sie wurde ebenfalls mittels Western Blot in fünf unabhängigen Versuchen auf deren Effekt im Bezug auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors untersucht (siehe Abbildung 20).

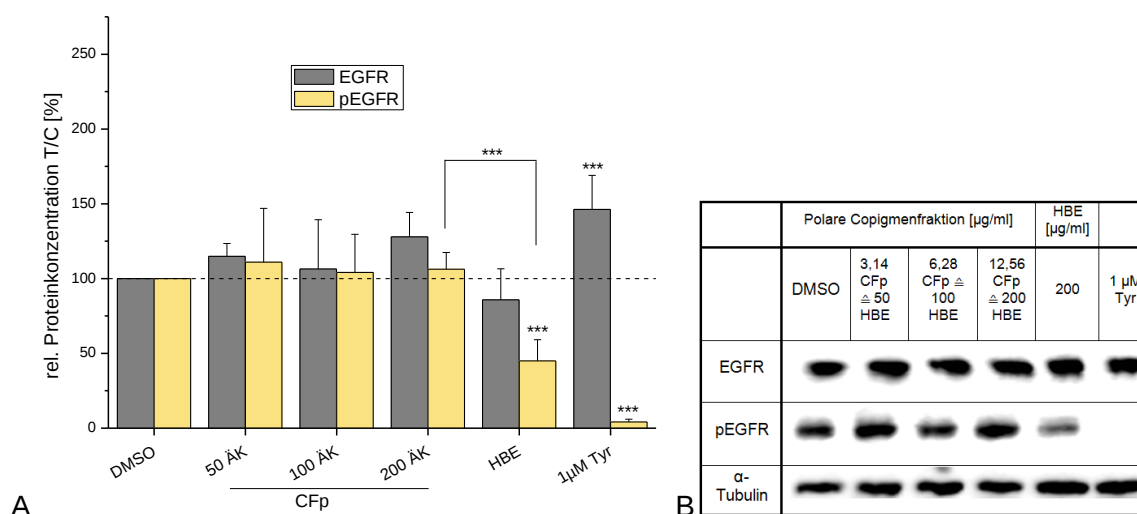


Abbildung 20: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch die polare Copigmentfraktion (CFp) mit den HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 μ g/ml (3,14, 6,28 bzw. 12,56 μ g/ml absolut) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 μ g/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 μ M); MW $\pm$ SD aus fünf unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Der endogene Status des EGFRs wies leichte Schwankungen auf, was jedoch auf Schwankungen der Western Blot Analyse zurückzuführen ist. Die Aktivität des EGFRs bezogen auf die DMSO-Kontrolle blieb nahezu unverändert. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Subfraktion nicht substantiell zur Bioaktivität des HBE beiträgt. CFp enthält zu 5,8 % (2,1 μ M) CGA und zu 4,6 % (1,3 μ M) Quercetin (inklusive Quercetin-

Glucoside). Eventuell lässt sich dieser Effekt aufgrund der antagonistischen Wirkung zwischen CGA und Quercetin erklären.

4.1.6 Unpolare Copigmentfraktion

Eine weitere Subfraktion der Copigmentfraktion ist ihre unpolare Phase (CFu). Ihr prozentueller Anteil am Gesamtextrakt beträgt 9,0 % (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Abbildung 21 veranschaulicht die Ergebnisse der Untersuchung der Aktivität des EGFRs mittels Western Blot von vier unabhängigen Versuchen.

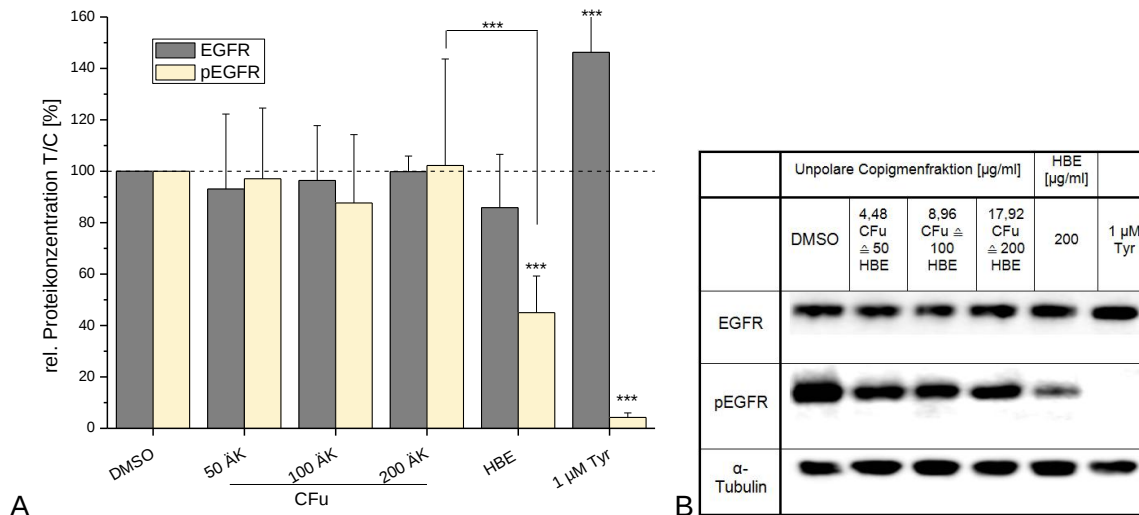


Abbildung 21: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch die unpolare Copigmentfraktion (CFu) mit den HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml (4,48, 8,96 bzw. 17,92 µg/ml absolut) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus vier unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Der endogene Status war von kleinen Abweichungen gekennzeichnet, die sich auf den Schwankungsbereich der Western Blot Analyse zurückführen lassen. Der Phosphorylierungsstatus des EGFRs wurde in keiner der untersuchten Konzentrationen signifikant gehemmt. Bei einer Konzentration von 17,9 µg/ml CFu, die einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml entspricht, wurde die Aktivität von EGFR auf $102,2 \pm 41,5$ % (T/C) stimuliert. Durch die hohe Schwankung ist die Aussage dieses Wertes jedoch limitiert. Somit spielt auch diese Fraktion keine wesentliche Rolle für die Bioaktivität des Gesamtextraktes hinsichtlich der EGFR-Modulation.

CFu besteht zu 0,5 % (0,2 µM) aus CGA und zu 8,7 % (5,0 µM) aus Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside). Aufgrund des hohen Anteils an Gesamt-Quercetin wäre eine Unterdrückung des Phosphorylierungsstatus des EGFRs zu erwarten. Stattdessen

kommt es zu einer Stimulierung. Es kann vermutet werden, dass u.U. während der Auftrennung bioaktive Substanzen verloren gegangen sind oder abgebaut wurden.

4.2 Einfluss von Cyanidin bzw. Cyanidin-3-O-glucosid auf den Phosphorylierungs-status des EGF-Rezeptors

Cyanidin (Cy) und Cyanidin-3-O-glucosid (Cy-3-glc) wurden ebenfalls mittels Western Blot auf deren Aktivität auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs untersucht (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

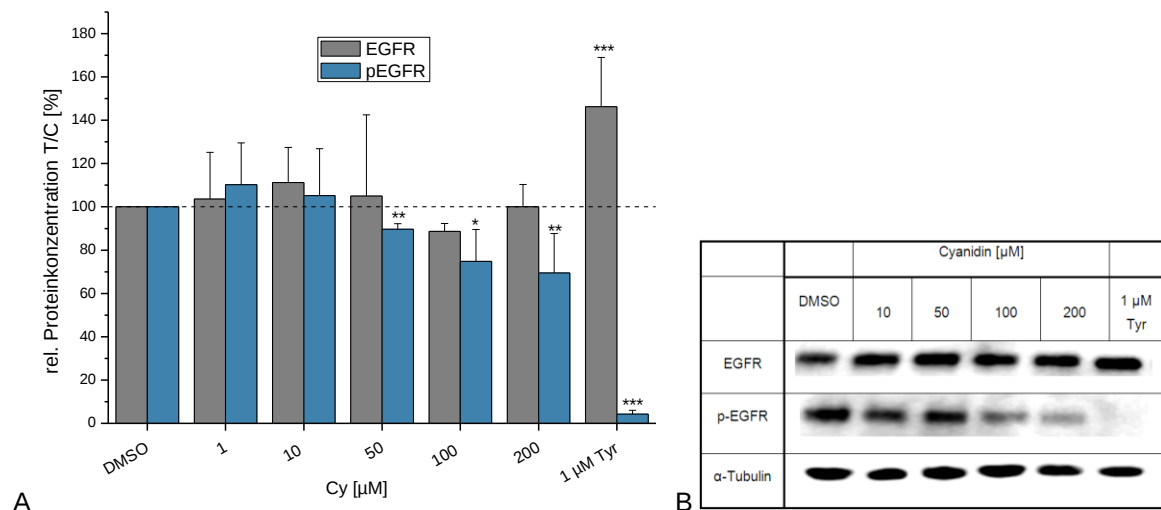


Abbildung 22: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch Cyanidin (Cy) mit den Konzentration 1, 10, 50, 100 und 200 µM unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %); Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus vier unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Der Gesamtproteingehalt des EGF-Rezeptors blieb während der gesamten Inkubation mit Cy konstant. Der endogene Status unterlag leichten Abweichungen, die sich auf den Schwankungsbereich der Western Blot Analyse zurückführen lassen. Der phosphorylierte Status des EGFRs veränderte sich bei einer Konzentration von 1 µM und 10 µM Cy kaum. Bei einer Konzentration von 50 µM war bereits eine signifikante Abnahme der Aktivität des EGFRs auf $89,6 \pm 2,6$ % (T/C) bemerkbar. Die stärkste Hemmung des Phosphorylierungsstatus des EGFRs wurde bei einer Konzentration von 200 µM Cy verzeichnet. Die Abnahme betrug $30,5 \pm 18,2$ % (T/C).

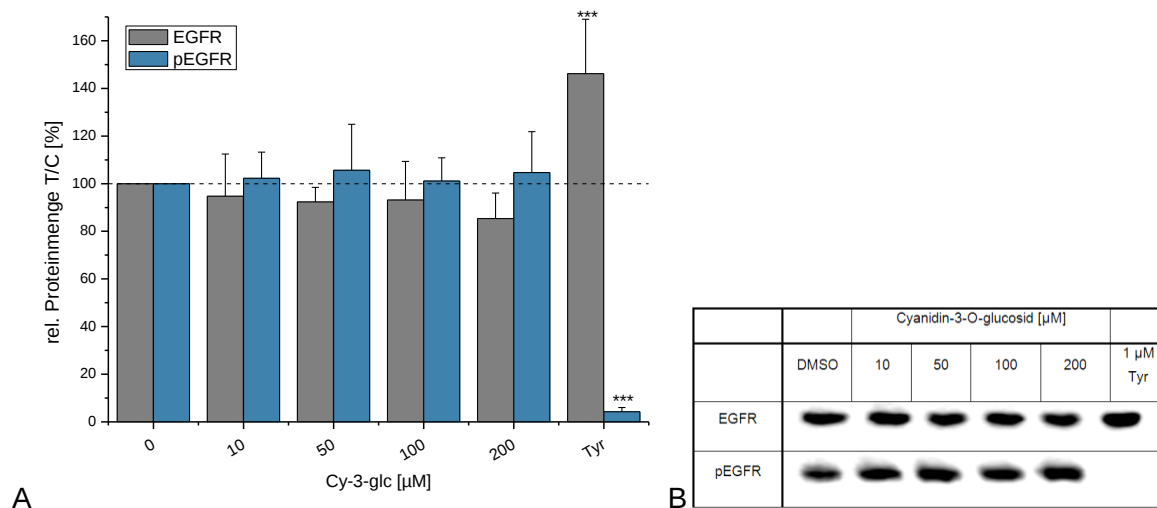


Abbildung 23: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch Cyanidin-3-O-glucosid (Cy-3-glc) mit den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 µM unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %); Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus fünf unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Bei der Inkubation von HT29-Zellen mit Cy-3-glc wurde keine Beeinflussung der Aktivität des EGF-Rezeptors sichtbar. Der endogene Status blieb nahezu konstant, wenn man die Standardabweichungen mit einbezieht.

Cy ist als ein potenter Inhibitor der Tyrosinkinase-Aktivität von EGFR bekannt (Meiers et al. 2001; Marko et al. 2004), was hier im zellulären System bestätigt wird. Daraus wird deutlich, dass Cy einen Beitrag zur Hemmwirkung des HBE leistet, wohingegen es in seiner glucosidischen Form die Aktivität des EGFRs nicht beeinflusst.

4.3 Einfluss von Chlorogensäure auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors

Die Wirkung der Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) auf die Aktivität des EGFR wurde ebenfalls in aufsteigenden Konzentrationen untersucht, da sie ein wichtiger Bestandteil des HBE ist (siehe Abbildung 24).

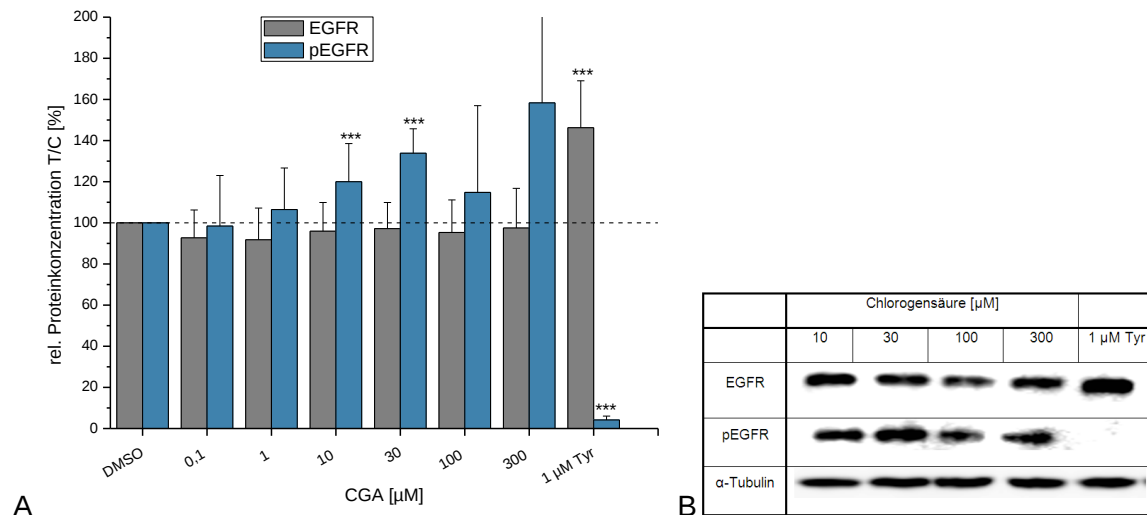


Abbildung 24: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch Chlorogensäure (CGA) mit den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 30, 100 und 300 μM unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %); Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 μM); MW ± SD aus 7 - 36 unabhängigen Versuchen B) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Der endogene Status des EGF-Rezeptors blieb weitgehend konstant. Der Phosphorylierungsstatus des EGFRs stieg jedoch ab einer Konzentration von 1 μM an. Sie erreichte bei einer Konzentration von 30 μM einen signifikanten Anstieg auf $133,8 \pm 11,9$ % (T/C). Die höchste Aktivität wurde bei einer Konzentration von 300 μM mit $158,4 \pm 50,5$ % (T/C) verzeichnet. Demnach wird der CGA eine stimulierende Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs beigemessen.

Frühere Untersuchungen aus diesem Arbeitskreis bestätigten diese Aktivierung (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck). Hierbei wurde bei einer Konzentration von 23 μM CGA mit $171,7 \pm 11,7$ % (T/C) die höchste Aktivität gemessen. Diese hohe Stimulierung konnte jedoch nicht erreicht werden.

4.4 Einfluss von Coinkubaten auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors

Da CGA eine stimulierende Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs hat und AF, FF und Cy bei einer Absolutkonzentration von 200 μg/ml die Aktivität des EGFRs hemmen, stellte sich nun die Frage, ob CGA in Coinkubation mit AF, FF und Cy deren Supprimierung des Rezeptors kompensiert. Deshalb wurde eine Western Blot Analyse in HT29-Zellen unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt (siehe Abbildung 25).

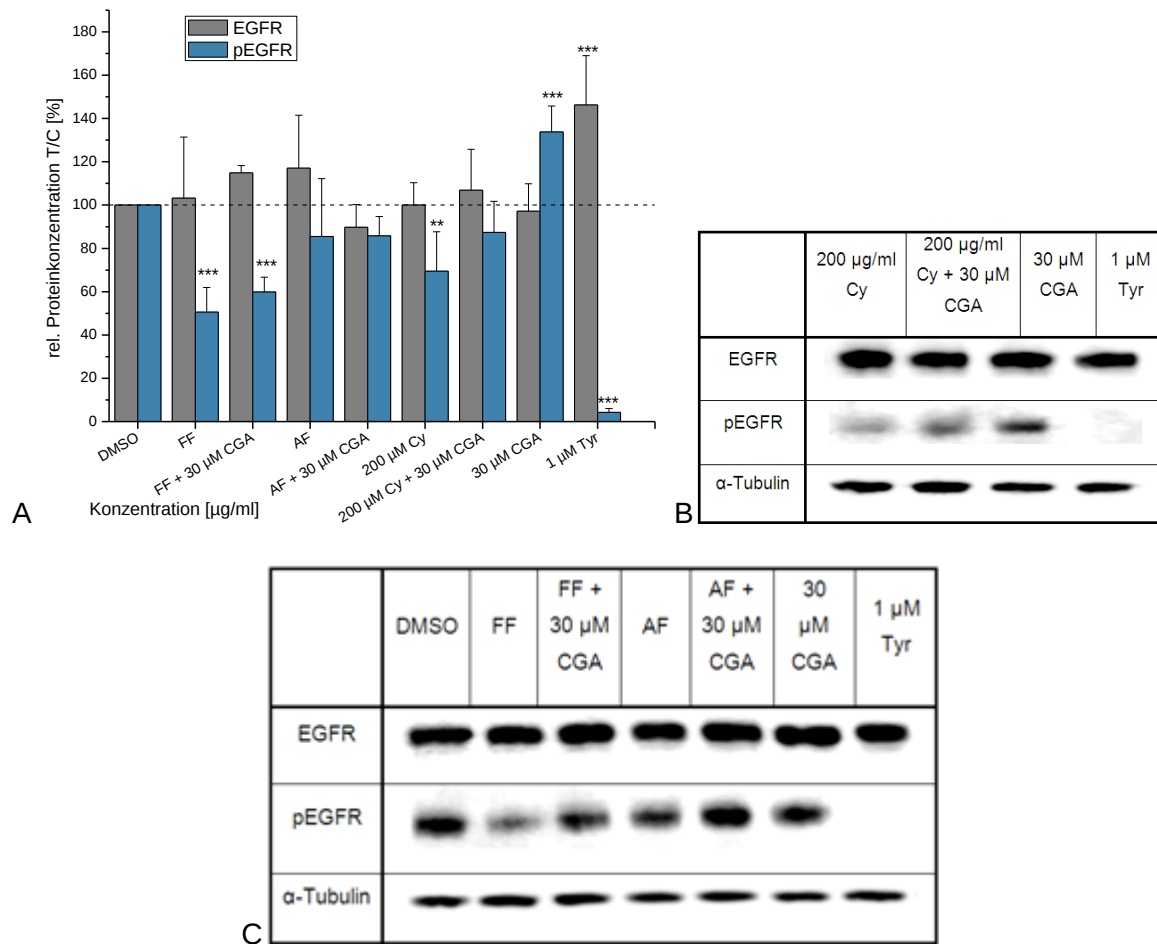


Abbildung 25: A) Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch FF, AF, Cyanidin (jeweils 200 µg/ml ÄK) in Coinkubation mit 30 µM CGA unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %); FF: Filtratfraktion; AF: Anthocyanfraktion; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus vier bis 36 unabhängigen Versuchen B + C) repräsentative Blotbilder der entsprechenden Untersuchung, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Der endogene Status des EGF-Rezeptors unterlag leichten Schwankungen, was auf die Schwankungsbreite des Assays zurückgeführt werden kann. Wie zu erwarten war, wurde die Aktivität des EGFRs durch die Subfraktion FF und Cy gehemmt sowie durch AF kam es zu einer leichten Unterdrückung der Rezeptoraktivität bei jeweils einer Konzentration von 200 µM. Durch die Inkubation mit FF wurde der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors signifikant auf $50,6 \pm 11,3 \%$, mit AF auf $85,5 \pm 26,8 \%$ und mit Cy signifikant auf $69,5 \pm 18,2 \%$ (T/C) supprimiert. In Coinkubation mit 30 µM CGA wurden diese hemmenden Effekte teilweise signifikant aufgehoben. Dies bedeutet bei der FF in Coinkubation mit CGA eine signifikante Hemmung von $59,9 \pm 6,8 \%$ (T/C), bei Cy mit CGA von $87,3 \pm 14,4 \%$ (T/C). Bei AF in Coinkubation mit CGA war jedoch kein wesentlicher Unterschied bemerkbar. Daraus kann geschlossen werden, dass dieser antagonistische Effekt das inhibitorische Potential der Subfraktionen

und des HBE beeinflusst und somit insbesondere in Fraktionen mit erhöhtem CGA-Anteil zur Suppression deren Bioaktivität hinsichtlich der EGFR-Modulation beisteuert.

4.5 Beeinflussung des Zellwachstum diverser Subfraktionen des Heidelbeerextraktes

Die Tests auf Wachstumshemmung wurden mittels SRB-Test (Skehan et al. 1990) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt (genaue Durchführung siehe Kap. 6.3). Katalase wurde zugesetzt um die Akkumulation von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium zu verhindern (siehe Kap. 2.7). Die Inkubation erfolgte in einem serumhaltigen Medium (10 % FKS-haltigem DMEM) mit HBE und dessen Subfraktionen (genaue Auftrennung siehe Kap. 2.6.5) in unterschiedlichen Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 h.

Vorherige Untersuchungen im Arbeitskreis von Prof. Marko haben gezeigt, dass der HBE das Zellwachstum in aufsteigenden Konzentrationen im Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO signifikant hemmt (siehe Abbildung 26).

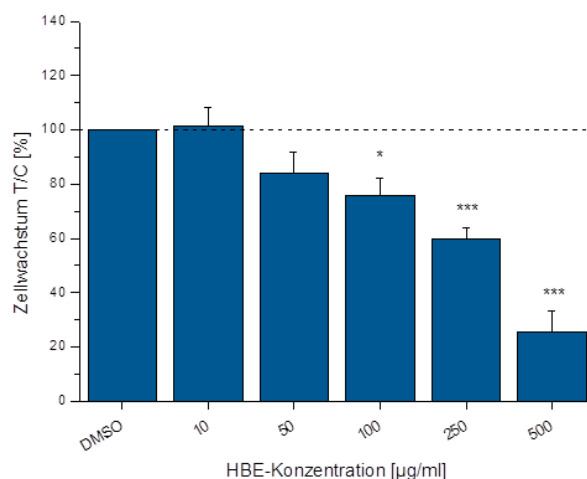


Abbildung 26: Einfluss des Heidelbeerextraktes (HBE) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle; Inkubation für 72 h in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD aus mind. sechs unabhängigen Versuchen (unveröffentlichte Daten erhoben von Verena Eschbach), Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Es wurde bereits eine Vielzahl von anthocyanreichen Beerenextrakten auf deren wachstumshemmendes Potential in diversen humanen Tumorzelllinien getestet (Ferguson et al. 2004; Olsson et al. 2004; Seeram et al. 2006; McDougall et al. 2008; Faria et al. 2010). Es muss jedoch darauf aufmerksam gemacht werden, dass die meisten Versuche ohne Katalase durchgeführt wurden.

Verschiedene Inhaltsstoffe des HBE können das Zellwachstum beeinflussen. Der in dieser Arbeit untersuchte HBE wurde von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) in verschiedene Subfraktionen aufgetrennt (Fraktionierungsschema siehe Kap. 2.6.5) und besteht vorwiegend aus Anthocyanen, Chlorogensäure, Flavonole wie Quercetin und deren Glucoside, Phenolcarbonsäuren und Hydroxyzimtsäuren.

Im Folgenden werden die einzelnen Subfraktionen und deren Einfluss auf das Zellwachstum dargestellt und diskutiert.

4.5.1 Anthocyanfraktion

Der HBE wurde mittels Membranchromatographie SARTOBIND in AF und FF aufgetrennt. Der prozentuelle Anteil der AF vom Gesamtextrakt beträgt 37,1 % (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Die Ergebnisse des SRB-Tests von sechs unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 27 dargestellt.

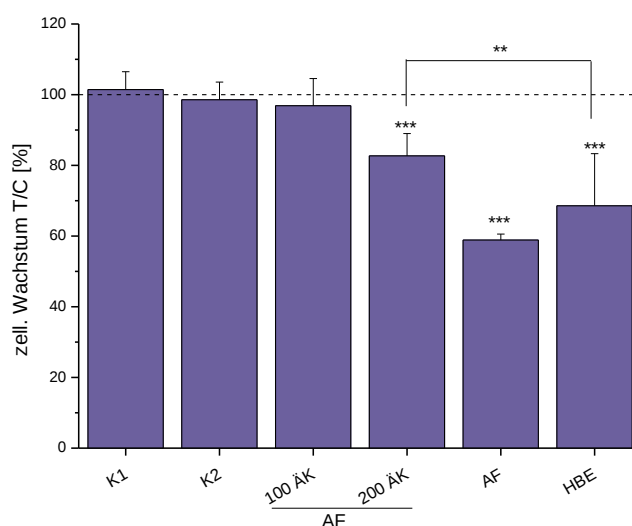


Abbildung 27: Einfluss der Anthocyanfraktion (AF) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2); Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (38,94 bzw. 77,88 µg/ml absolut) und mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; MW ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die untersuchte AF beeinflusste das Zellwachstum in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen. Die ersten beiden Konzentrationen dieser Subfraktion wurden in Bezug zu den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml gewählt. Da AF einen Anteil von 37,1 % des Gesamtextraktes ausmacht, resultieren daraus die Absolutkonzentrationen 38,9 und 77,9 µg/ml. Bei einer AF-Inkubation mit 77,9 µg/ml wurde das Zellwachstum signifikant auf $82,7 \pm 6,3$ % (T/C) gehemmt, wohingegen das Zellwachstum bei einer HBE-Inkubation auf $68,6 \pm 14,8$ % (T/C) minimiert wurde. Somit

scheint AF lediglich einen kleinen Anteil des zellwachstumshemmenden Potentials des HBE auszumachen. Die AF-Inkubation mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml resultierte dennoch in einer potenten Hemmung des Zellwachstums signifikant auf $58,9 \pm 1,7$ % (T/C). Diese AF-Konzentration würde jedoch einer HBE-Konzentration von 539 µg/ml entsprechen.

Yi et al. (2005) hatte ebenfalls einen HBE in verschiedene Fraktionen, wie phenolische Säuren, Tannine, Flavonole und Anthocyane, aufgetrennt und ihren Einfluss auf das Zellwachstum in HT29-Zellen untersucht. Die phenolischen Säuren zeigten einen geringen Effekt, wohingegen die Flavonol- und Tanninfraktion das Zellwachstum von HT29-Zellen hemmten. Die Anthocyanfraktion jedoch hatte den größten Einfluss auf das Zellwachstum (Yi et al. 2005).

4.5.2 Filtratfraktion

Die FF macht 49,8 % des Gesamtextraktes aus (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Sie wurde ebenfalls in sechs unabhängigen Versuchen auf deren zellwachstumshemmende Eigenschaft getestet (siehe Abbildung 28).

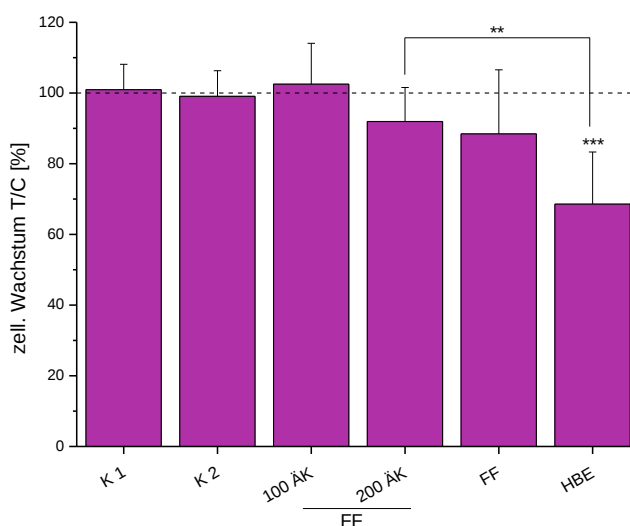


Abbildung 28: Einfluss der Filtratfraktion (FF) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2); Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml (61,06 bzw. 122,1 µg/ml absolut) und mit der Absolutkonzentration von 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; MW $\pm$ SD aus sechs unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Es wurde analog zu AF mit unterschiedlichen Konzentrationen der FF inkubiert. Die ersten beiden Konzentrationen dieser Subfraktion wurden ebenfalls in Bezug zu den beiden HBE-Äquivalenzkonzentrationen 100 und 200 µg/ml gewählt. Aufgrund des prozentuellen Anteils von 49,8 % der FF am Gesamtextrakt erhält man die Absolutkonzentrationen 61,1 µg/ml und 122,2 µg/ml. Die Inkubation mit 122,1 µg/ml FF

ergab ebenfalls lediglich eine geringe Hemmung des Zellwachstums auf $91,9 \pm 9,6 \%$ (T/C). Einzeln betrachtet, scheint die FF keinen wesentlichen Beitrag auf die zellwachstumshemmende Eigenschaft des HBE zu leisten. Die FF-Inkubation mit der absoluten Konzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ resultierte in einer minimal stärkeren Unterdrückung des Zellwachstums auf $88,4 \pm 18,1 \%$ (T/C). Diese FF-Konzentration würde jedoch einer HBE-Konzentration von $327,3 \mu\text{g/ml}$ entsprechen. Demnach hatte FF ein geringeres zellwachstumshemmendes Potential als die AF. Wenn man jedoch die beiden Hemmleistungen von AF und FF addiert, erhält man in etwa die wachstumshemmende Wirkung des Gesamtexttraktes.

Die Filtratfraktion setzt sich u.a. aus $1,3 \%$ ($3,7 \mu\text{M}$) CGA, aus $2,9 \%$ ($8,5 \mu\text{M}$) Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside) und $1,2 \%$ ($2,7 \mu\text{M}$) Protocatechusäure zusammen (Auflistung siehe Tabelle 3).

CGA wurde schon des Öfteren in verschiedenen Zelllinien auf deren zellwachstumshemmendes Potential untersucht. Jedoch konnte nur eine marginale Hemmleistung des Zellwachstums nachgewiesen werden oder ein Effekt trat erst ab einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ auf (Iwai et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte Hsu et al., (2006) einen IC_{50} – Wert von $72,3 \mu\text{M}$ berechnen, der die Beeinflussung des Zellwachstums durch 72 h Inkubation mit Chlorogensäure in 3T3-L1 Präadipozyten untersuchte (Hsu et al. 2006). Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass sich humane Tumorzelllinien womöglich in ihrer Wirkung von den Präadipozyten unterscheiden.

In früheren Untersuchungen des Arbeitskreises von Prof. Marko wurde ein Zeitverlauf von drei verschiedenen Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h) mit CGA unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Dabei war bei einer Inkubationszeit von 72 h eine Stimulierung des Zellwachstums erkennbar, wohingegen nach einer Inkubation von 24 und 48 h keine wachstumsstimulierende bzw. wachstumshemmende Wirkung ersichtlich war (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010). Bei einer 72 h Inkubation von HT29-Zellen ohne Katalase wurde ein IC_{50} – Wert von $200 \mu\text{M}$ ermittelt. Eine leichte Stimulierung des Wachstums war bei $100 \mu\text{M}$ zu erkennen (Daten entnommen aus Dissertation Melanie Kern, 2006). Diese Untersuchung wurde jedoch ohne Zusatz von Katalase durchgeführt und kann daher nicht direkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden. Die Generierung von H_2O_2 durch CGA wäre aufgrund der catecholischen Seitengruppe möglich, wurde jedoch nicht untersucht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zuvor beobachtete Wachstumshemmung in

höheren Konzentrationen eventuell auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies im Zellkulturmedium zurückzuführen ist.

Feng et al. (2005) zeigten über eine signifikante Hemmung des Zellwachstums der humanen Lungenkrebszelllinie A 549 nach einer Inkubationszeit von 72 h bei einer Konzentration von 80 µM CGA. Dagegen wurde ein geringerer Effekt auf das Zellwachstum durch die CGA in derselben Konzentration in JB6-Zellen, einer murinen Epithermalzelllinie, beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte *Kutara et al. (2007)* in verschiedenen Zelllinien bis zu einer Konzentration von 100 µM CGA nach 72 h Inkubation kein zellwachstumshemmendes Potential erkennen. Demzufolge scheint CGA eine zelltypenspezifische Wirkung auf das Zellwachstum zu haben.

Hingegen Flavonole und ihre Glycoside, vor allem Quercetin, aber weniger ihre Glucoside wie Rutin, zeigten einen potenten Einfluss auf die Zellproliferation (Ranelletti et al. 1992; Agullo et al. 1994; Kuo 1996; Alia et al. 2006).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass FF vermutlich aufgrund antagonistischer Effekte durch die Chlorogensäure und der Flavonole ein geringes zellwachstumshemmendes Potential aufweist.

4.5.3 Polymerfraktion

PF umfasst 29,4 % des HBE. Seine Zusammensetzung konnte per HPLC nicht untersucht werden. Es lässt sich vermuten, dass diese Subfraktion oligomere Procyanidine und Tannine beinhaltet. Abbildung 29 veranschaulicht die Ergebnisse des SRB-Assays von sechs unabhängigen Versuchen.

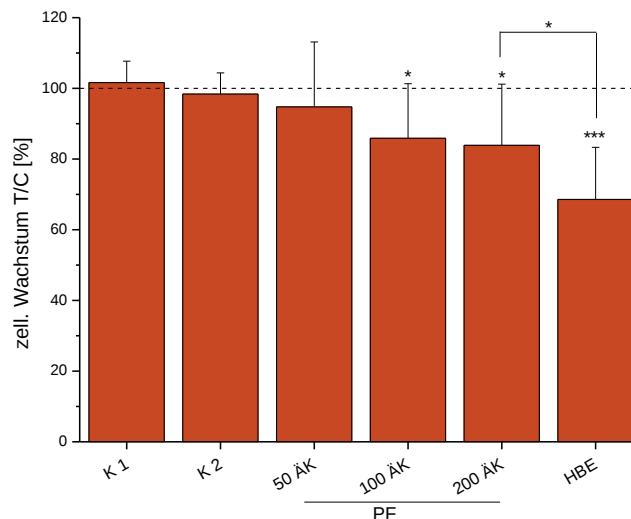


Abbildung 29: Einfluss der Polymerfraktion (PF) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2); Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit den HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml (14,7, 29,4 bzw. 58,8 µg/ml absolut) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; MW ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die untersuchten Konzentrationen der PF wurden entsprechend der HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml gewählt. Da PF einen Anteil von 29,4 % des Gesamtextraktes ausmacht, resultieren daraus die Absolutkonzentrationen 14,7; 29,4 und 58,5 µg/ml. Eine Konzentration von 200 µg/ml konnte nicht mitgeführt werden, da zu wenig Substanz dieser Subfraktion vorhanden war.

Bei der Inkubation mit PF stagnierte beinahe die zellwachstumshemmende Wirkung. Es gab zwischen den untersuchten Konzentrationen kaum merklich einen Unterschied in ihrer Hemmleistung. Bei 58,5 µg/ml PF wurde die höchste Hemmung des Zellwachstums auf $83,9 \pm 17,3$ % (T/C) sichtbar und leistete somit einen geringen Beitrag zur zellwachstumshemmenden Wirkung des HBE.

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass oligomere Procyanidinkomplexe und procyanidinreiche Extrakte das Zellwachstum in verschiedenen Zelllinien inhibieren können (Schmidt et al. 2004; Mantena et al. 2006).

4.5.4 Copigmentfraktion und ihre beiden Subfraktionen

CF ist eine Subfraktion der Filtratfraktion. Ihr prozentueller Anteil vom Gesamtextrakt beträgt 15,2 % (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3). Sie wurde ebenfalls in vier unabhängigen Versuchen auf ihr zellwachstumshemmendes Potential untersucht (siehe Abbildung 30).

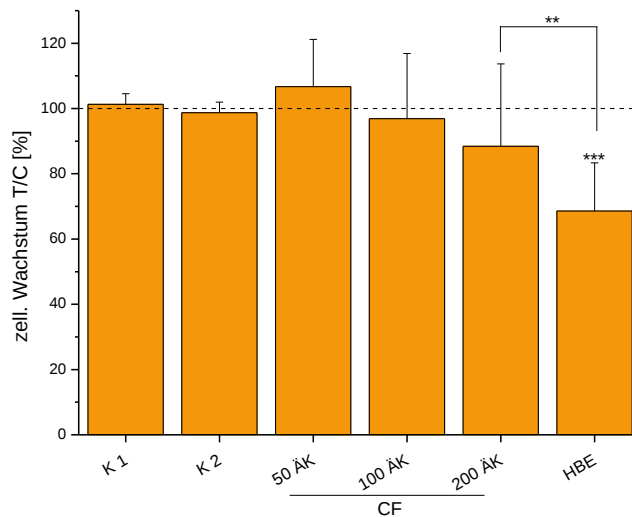


Abbildung 30: Einfluss der Copigmentfraktion (CF) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2); Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit den HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml (7,6, 15,2 bzw. 30,5 µg/ml) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; MW ± SD aus vier unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die Auswahl der untersuchten Konzentrationen der CF, entsprechend der HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml, erfolgte analog zur PF. Da CF 15,2 % des Gesamtextraktes ausmacht, erhält man die Absolutkonzentrationen 7,6; 15,2 und 30,5 µg/ml. Erst bei einer Konzentration von 30,5 µg/ml CF wurde eine Hemmung des Zellwachstums von $88,5 \pm 25,2$ % (T/C) sichtbar. Somit trägt diese Fraktion einen Teil zur Aktivität der übergeordneten FF bei.

CF wurde von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) mittels Extraktion mit Ethylacetat gegen H₂O in eine polare und unpolare Phase aufgetrennt (Auflistung der Bestandteile siehe Tabelle 3)

Das zellwachstumshemmende Potential dieser beiden Fraktionen wurde ebenfalls untersucht (siehe Abbildung 31).

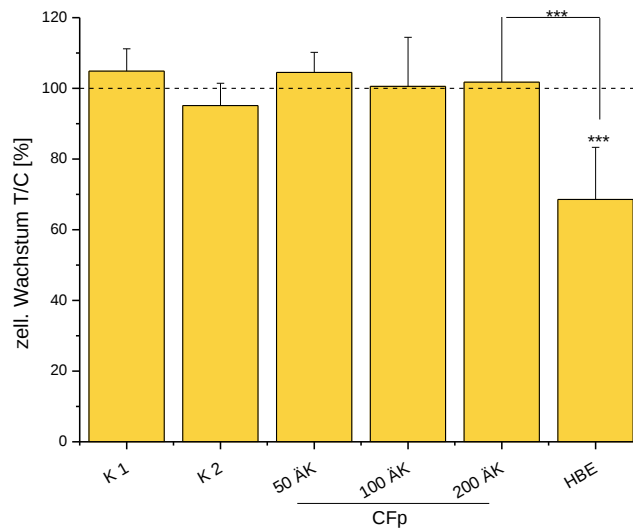


Abbildung 31: Einfluss der polaren Copigmentfraktion (CFp) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2); Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit den HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml (3,1, 6,3 bzw. 12,6 µg/ml) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; MW ± SD aus sechs unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die untersuchten Konzentrationen wurden analog zur PF und CF ausgewählt. Aufgrund des Anteils von 6,3 % der CFp am Gesamtextrakt, resultieren daraus die Absolutkonzentrationen 3,1; 6,3 und 12,6 µg/ml.

Bei allen eingesetzten Konzentrationen der CFp wurde keine Hemmung des Zellwachstums gemessen und scheint somit keinen Beitrag zur zellwachstumshemmenden Eigenschaft des HBE zu leisten.

Die Lösung der HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml der Subfraktion zeichnete sich durch einen vergleichsweise hohen Gehalt von 2,1 µM CGA und 1,3 µM Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside) aus. Da der CGA keine wachstumsstimulierende Wirkung in HT29-Zellen vorausgesagt wird (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010), lässt sich aufgrund dessen dieses Ergebnis begründen.

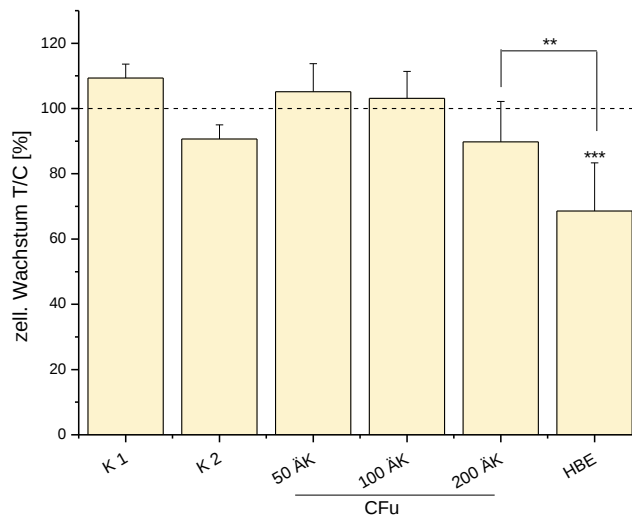


Abbildung 32: Einfluss der unpolaren Copigmentfraktion (CFu) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2); Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit den HBE-Äquivalenzkonzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml (4,5, 8,96 bzw. 17,9 µg/ml) unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; MW ±SD aus sechs unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die Ergebnisse der unpolaren Copigmentfraktion (CFu) zeigten ähnlich wie die der polaren Copigmentfraktion (CFp) keinen bis minimalen zellwachstumshemmenden Effekt. Anfangs trat keine Zellwachstumshemmung ein, erst bei einer Konzentration von 17,9 µg/ml CFu, das einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml entspricht, wurde das Zellwachstum auf $89,8 \pm 12,4$ % (T/C) minimiert. Sie enthält 5,0 µM Quercetin inklusive Glucoside und nur 0,2 µM CGA. Die unpolare Copigmentfraktion ist für das wachstumshemmende Potential ihrer übergeordneten Copigmentfraktion verantwortlich, das man womöglich auf den höheren Gehalt der Flavonole zurückführen kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das wachstumshemmende Potential des HBE nicht auf eine bestimmte Subfraktion festgelegt werden kann, sondern dass diese zellwachstumshemmende Eigenschaft durch ein Konglomerat seiner Inhaltsstoffe aufgrund antagonistischer bzw. synergistischer Effekte zu Stande kommt.

In Abbildung 33 und Abbildung 34 werden die Ergebnisse der verschiedenen Subfraktionen der Western-Blot-Analyse und des SRB-Assays bei einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml noch einmal graphisch veranschaulicht.

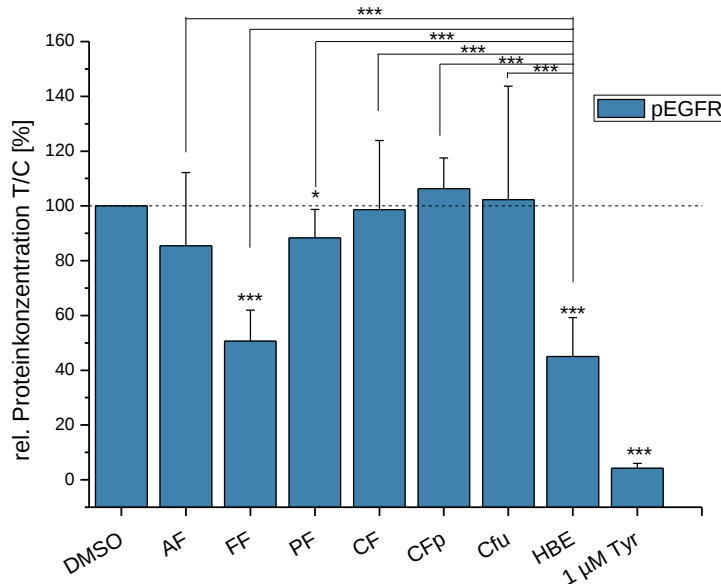


Abbildung 33: Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFRs nach 45-minütiger Inkubation von HT29-Zellen durch die Anthocyanfraktion (AF), Filtratfraktion (FF), Polymerfraktion (PF), polare (CFp) und unpolare Copigmentfraktion (CFu) mit der HBE-Äquivalenzkonzentrationen 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; ÄK: Äquivalenzkonzentration; Tyr: Tyrphostin AG1478 (1 µM); MW ± SD aus drei bis acht unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

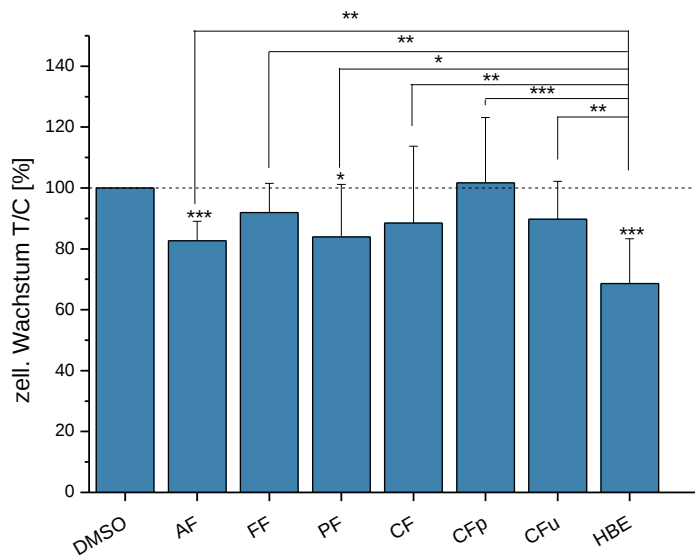


Abbildung 34: Einfluss der Anthocyanfraktion (AF), Filtratfraktion (FF), Polymerfraktion (PF), polare (CFp) und unpolare Copigmentfraktion (CFu) auf das Wachstum von HT29-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle (K1, K2) und zur Positivkontrolle 200 µg/ml HBE; Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit der HBE-Äquivalenzkonzentrationen 200 µg/ml unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). ÄK: Äquivalenzkonzentration; HBE: Heidelbeerextrakt, MW ±SD aus vier bis sechs unabhängigen Versuchen, Signifikanzen mittels Student's-T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

4.6 Gesamtdiskussion

Das Entstehen von Tumoren wird häufig mit einer Fehlregulation verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege in Verbindung gebracht. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die oft als Angriffspunkte der Tumorthherapie dienen (Olayioye et al. 2000).

In verschiedenen Untersuchungen wurden bereits Beeren- und Apfelextrakte sowie charakteristische Inhaltsstoffe auf deren chemopräventives Potential getestet und als Hemmstoffe verschiedener RTKs identifiziert (Meiers et al. 2001; Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007b; Fridrich et al. 2007a; Teller et al. 2009a; Teller et al. 2009b). Die hemmende Wirkung der Anthocyane und sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf die Aktivität verschiedener RTKs, insbesondere auf den EGFR, wurde schon vielfach untersucht. Im Fokus der vorliegenden Diplomarbeit sollte untersucht werden, ob die Anthocyane einen wesentlichen Beitrag zur Hemmwirkung des HBEs auf die Phosphorylierung des EGFRs leisten oder ob andere bioaktive Verbindungen dafür verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde HBE der Firma Symrise GmbH & Co.KG (Holzminden, Deutschland; Produktnr.: 600761) von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) in weitere Fraktionen mittels Membranchromatographie SARTOBIND aufgetrennt. Im Vordergrund standen die Untersuchung der Modulation der EGFR-Phosphorylierung der verschiedenen Subfraktionen und diverser charakteristischer Einzelsubstanzen mittels Western-Blot-Analyse sowie deren wachstumshemmendes Potential mittels SRB-Assay. Alle Untersuchungen wurden in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt. Ohne Zusatz von Katalase könnten Polyphenole mit noch unbekannten Bestandteilen des Zellkulturmediums Wasserstoffperoxid interagieren und somit Wasserstoffperoxid generieren (Halliwell et al. 2000; Dashwood et al. 2002; Lapidot et al. 2002; Hou et al. 2005). Wasserstoffperoxid kann Proteintyrosinkinasen beeinflussen, indem es deren Phosphorylierungsstatus anheben kann und daher an einer erhöhten Signaltransduktion beteiligt ist (DeYulia and Carcamo 2005). Zudem kann Wasserstoffperoxid die Stabilität der Testverbindungen modulieren (Kern et al. 2007). Viele Ergebnisse könnten aufgrund der artifiziellen Erzeugung von oxidativem Stress durch H_2O_2 verfälscht sein (Lapidot et al. 2002; Hou et al. 2005; Fridrich et al. 2007a). Aus diesen Gründen wurden alle Versuche unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um eine Wasserstoffperoxidakkumulation zu verhindern (Lapidot et al. 2002) und um die Verwendbarkeit der gemessenen Effekte im Bezug auf die Polyphenole gewährleisten zu können.

Der EGFR ist ein zentrales Element, der über seine Aktivierung und Weiterleitung des Signals über den nachgeschalteten MAPK-Signalweg die Zellproliferation steuert (Marais and Marshall 1996; Lewis et al. 1998; Schaeffer and Weber 1999; Meiers et al. 2001; Schlessinger 2000; Depeint et al. 2002; Burgess et al. 2003; Lemmon and Schlessinger 2010). Die MAPK-Signalkaskaden stellen einer der wichtigsten Hauptwege der intrazellulären Signalwege dar. Dabei können sowohl Zellzyklus, Zellmigration, Zellform und metabolische Prozesse als auch Zellproliferation und Differenzierung kontrolliert werden (Schaeffer and Weber 1999; Schlessinger 2000; Lemmon and Schlessinger 2010). Durch die Unterdrückung der Aktivierung des EGFRs, die über seinen Phosphorylierungsstatus gemessen wird, kann es zu einer Unterdrückung der nachgeschalteten Signalwege, insbesondere der MAPK, führen. Die Hemmung der Aktivität des EGFRs wird mit der Wachstumshemmung in Tumorzellen in Verbindung gebracht (Meiers et al. 2001; Kern et al. 2005). Frühere Untersuchungen im Arbeitskreis von Prof. Marko haben gezeigt, dass HBE zu einer potenten Hemmung sowohl des Phosphorylierungsstatus des EGFRs als auch des Zellwachstums führt (unveröffentlichte Daten des AK Prof. Marko). Deshalb wurde anfangs HBE an der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion fraktioniert, um potente Verbindungsklassen aufzuklären (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010). Doch das Problem dieser Auftrennung lag darin, dass die Anthocyane in jeder Subfraktion enthalten waren und man die Unterdrückung der Aktivität des EGF-Rezeptors nur auf eine bestimmte Subfraktion und nicht auf eine spezifische Substanzklasse zuordnen konnte. Daher wurde HBE an der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) erneut aufgetrennt, aber in diesem Fall mittels der Membranchromatographie SARTOBIND, die die Anthocyane erfolgreich von den restlichen Subfraktionen abtrennen konnte (Fraktionierungsschema siehe Kap. 2.6.5). Im Rahmen dieser Arbeit wurden AF, FF, PF, CF sowie ihre polare und unpolare Subfraktion sowohl auf deren Einfluss auf die Aktivität des EGFRs mittels Western-Blot als auch auf das Zellwachstum mittels SRB-Assay getestet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss der getesteten Subfraktionen und des HBE in der Konzentration, die 200 µg/ml HBE entspricht, auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs und der Wachstumshemmung im Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, berechnet als T/C [%] und ihr prozentueller Anteil am HBE

Getestete Fraktion	[% des HBE]	pEGFR [%]	Wachstumshemmung [%]
Heidelbeerextrakt	100 %	45,0 % ± 14,2 %	68,6 % ± 14,8 %
Anthocyanfraktion	37,05 %	85,5 % ± 26,8 %	82,7 % ± 6,3 %
Filtratfraktion	49,82 %	50,6 % ± 11,3 %	91,9 % ± 9,6 %
Polymerfraktion	29,4 %	88,4 % ± 10,4 %	83,9 % ± 17,3 %
Copigmentfraktion	15,24 %	98,7 % ± 25,3 %	88,5 % ± 25,2 %
Polare Copigmentfraktion	6,28 %	106,3 % ± 11,2 %	101,7 % ± 21,5 %
Unpolare Copigmentfraktion	8,96 %	102,2 % ± 41,5 %	89,8 % ± 12,4 %

AF, die zu 70,9 % Anthocyane (108,4 µM berechnet als Cy-3-glc) enthält, konnte die Aktivität des EGF-Rezeptors in einer Konzentration von 122,1 µg/ml, die einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml entspricht, auf etwa 86 % in Bezug auf die DMSO-Kontrolle senken, ohne den endogenen Status des Rezeptors zu beeinflussen. Die Aglyca der am häufigsten vorkommenden Anthocyane in der Nahrung, Cyanidin (Cy) und Delphinidin (Del) repräsentieren potente Inhibitoren des EGFRs. Cy hemmte in aufsteigender Konzentration den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors. Bei einer Konzentration von 100 µM Cy war eine signifikante Abnahme auf ca. 75 % (T/C) erkennbar, wobei die stärkste Supprimierung des Rezeptors bei einer Konzentration von 200 µM Cy deutlich wurde.

Cy und Del zeigten die potenteste Wachstumshemmung gefolgt von Mv (Meiers et al. 2001; Marko et al. 2004; Teller et al. 2009a). Bei einer Inkubation von HT29-Zellen mit Del kam es zu einer konzentrationsabhängigen Unterdrückung des Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors mit einem IC₅₀-Wert von 54 ± 11 µM (Meiers et al. 2001). Im Gegensatz zu Del beeinflusste Mv den Phosphorylierungsstatus des EGFRs bis zu einer Konzentration von 100 µM nicht (Fridrich et al. 2008). Die Glucoside hingegen wiesen keine hemmenden Eigenschaften auf. Cy-3-glc beeinflusste die Aktivität des EGFRs nicht (Meiers et al. 2001). Durch diese Untersuchungen wurde bestätigt, dass die Anthocyane nur bedingt eine Rolle für die Bioaktivität des HBE in Hinsicht auf die Unterdrückung der EGFR-Phosphorylierung *in vitro* spielen. Die Aglyca (Anthocyanidine), die als potente Hemmstoffe bekannt sind, sind in nur sehr geringen Konzentration (< 0,9 µM) in dieser Subfraktion enthalten und haben somit wenig Einfluss auf die Wirkung des Extraktes.

Im Bezug auf das Zellwachstum hatte AF den größten Einfluss von allen Fraktionen. Bei einer Konzentration von 77,9 µg/ml (entsprechend einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml) wurde das Zellwachstum signifikant auf ca. 83 % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle gehemmt. *Yi et al. (2005)* hatte ebenfalls ein Heidelbeerextrakt in verschiedene Fraktionen, wie phenolische Säuren, Tannine, Flavonole und Anthocyane, aufgetrennt und ihr zellwachstumshemmendes Potential untersucht. Dabei hatte AF den größten Einfluss auf das Zellwachstum (*Yi et al. 2005*).

Die Ergebnisse des Western-Blots im Vergleich zu denen des SRB-Assays waren widersprüchlich. Aufgrund der zellwachstumshemmenden Eigenschaft der AF würde man eine deutliche Unterdrückung der Aktivität des EGFRs erwarten. Das war jedoch nicht der Fall. Daraus kann man schließen, dass die Hemmung des Zellwachstums nicht direkt mit der Inhibierung des über EGFR-nachgeschalteten MAPK-Signalwegs verknüpft ist sondern weitere Regulationswege involviert sind. Eine anthocyanreiche Fraktion des Heidelbeerextraktes Myrteselect wurde in A431 Zellen auf ihre wachstumshemmende Aktivität untersucht. Dabei stellten sich nur marginale Effekte heraus, obwohl diese Fraktion eine starke endogene Expression von EGFR, ErbB2 und ErbB3 zeigte (*Teller et al. 2009b*). Dies kann man auf die begrenzte Stabilität der Anthocyane im Zellkulturmedium rückschließen (*Kern et al. 2007*).

Im Gegensatz dazu führte FF zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität des EGFRs auf etwa 51 %. Diese Fraktion setzt sich u.a. aus 1,3 % (3,7 µM) CGA, aus 2,9 % (8,5 µM) Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside) und 1,2 % (2,7 µM) Protocatechusäure zusammen. Quercetin war als ein potenter Inhibitor der PTK-Aktivität von EGFR bekannt (*Bhatia et al. 2001; Lee et al. 2002; Kern et al. 2005*). Die Inkubation mit Quercetin hat in HT29-Zellen zu einer Unterdrückung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors mit einem IC₅₀-Wert von 0,6 ± 0,1 µM geführt (*Fridrich et al. 2008*). Im Gegensatz dazu beobachtete *Bhatia et al. (2001)* in A431 Zellen nur einen marginalen Effekt bis zu einer Konzentration von 200 µM (*Bhatia et al. 2001*). Interessant war auch, dass Quercetin in A431 Zellen auch nur geringe hemmende Eigenschaften auf die Aktivität des ErbB2-Rezeptors besaß (*Fridrich et al. 2008*). Zur CGA wurden keine Literaturdaten im Bezug auf die Aktivität des EGF-Rezeptors gefunden. Daher wurde die Reinsubstanz in aufsteigenden Konzentrationen mittels Western Blot getestet. Sie erreichte bei einer Konzentration von 30 µM eine signifikante Stimulierung auf ca. 134 % (T/C). Frühere Untersuchungen des Arbeitskreises von Prof. Marko bestätigten diesen stimulierenden Effekt (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010). Daraus kann geschlossen werden, dass für die hemmende

Eigenschaft der FF mögliche antagonistische Effekte zwischen der stimulierenden Wirkung der CGA und der hemmenden Wirkung des Quercetins verantwortlich sind. Die FF ist somit die Subfraktion mit den potentesten Hemmeigenschaften und wahrscheinlich für die Bioaktivität des HBE verantwortlich.

Hingehend ihres zellwachstumshemmenden Potentials wurde nur ein geringer Effekt sichtbar. Es konnte nur eine geringe signifikante Hemmung gemessen werden. Dies lässt sich womöglich auf die marginale Hemmleistung der CGA zurückschließen. Ein Effekt trat erst ab einer Konzentration von 500 μM auf (Iwai et al. 2004). Bei früheren Untersuchungen des Arbeitskreises von Prof. Marko wurde ein Verlauf von drei verschiedenen Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h) mit CGA unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in HT29-Zellen untersucht. Dabei kam es bei 72 h Inkubation mit CGA zu einer Stimulierung des Wachstums. Im Gegensatz dazu war bei 24 bzw. 48 h Inkubation weder ein wachstumsstimulierender noch ein wachstumshemmender Effekt sichtbar (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010). Ohne Zusatz von Katalase jedoch erhielt man bei einer 72 h Inkubation einen IC_{50} -Wert von 200 μM . Bei 100 μM war eine leichte Stimulierung erkennbar (Daten entnommen aus Dissertation Melanie Kern, 2006). Es muss an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Versuche ohne Katalase durchgeführt worden sind. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Wachstumshemmung in höheren Konzentrationen vielleicht auf die Generierung von Wasserstoffperoxid durch eine Reaktion von CGA mit noch unbekannten Bestandteilen des Zellkulturmediums zurückzuführen war. CGA wurde in verschiedenen Zelllinien auf ihr zellwachstumshemmendes Potential getestet. Dabei berichtete *Feng et al. (2005)* über eine signifikante Hemmung des Zellwachstums der humanen Lungenkrebszelllinie A 549 bei einer Konzentration von 80 μM CGA nach einer Inkubationszeit von 72 h. In JB6-Zellen, einer murinen Epithermalzelllinie, war jedoch nur ein geringer Effekt bei gleicher Konzentration messbar. Im Gegensatz dazu konnte *Kutara et al. (2007)* in verschiedenen Zelllinien bis zu einer Konzentration von 100 μM CGA nach 72 h Inkubation kein zellwachstumshemmendes Potential erkennen. Demzufolge schien CGA eine zelltypenspezifische Wirkung auf das Zellwachstum zu haben. Wegen dieser geringen zellwachstumshemmenden Eigenschaft der CGA in HT29-Zellen kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass sie womöglich für die geringe Zellwachstumshemmung der FF verantwortlich ist. Addiert man jedoch die zellwachstumshemmende Leistung der AF und FF, so erhält man in etwa das wachstumshemmende Potential des Gesamtextraktes.

PF, die vermutlich oligomere Procyanidine und Tannine beinhaltet, zeigte wiederum ein geringeres inhibitorisches Potential als HBE und FF. Bei einer Inkubation von 58,8 µg/ml PF (entsprechend einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml) nimmt die Aktivität des EGFRs signifikant auf ca. 88 % (T/C) ab. Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors erfuhr erst bei der Konzentration von 200 µg/ml (die jedoch einer Konzentration von 680,4 µg/ml HBE entsprechen würde) eine signifikante Abnahme auf ca. 56 % (T/C). Die Zusammensetzung der PF konnte mittels HPLC nicht untersucht werden. Es lag die Vermutung nahe, dass sie oligomere Procyanidine und Tannine beinhaltet. Der Einfluss von oligomeren Procyanidinen auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors wurde bereits untersucht. Das trimere Procyanidin PC1 wies in HT29-Zellen eine potente Hemmwirkung auf die EGFR-Autophosphorylierung mit einem IC₅₀-Wert von 35 ± 15 µM auf, wohingegen das tetramere Procyanidin PA2 bis zu einer Konzentration von 50 µM sich nicht signifikant auf die Aktivität des EGFR auswirkte. Daraus konnte man ableiten, dass der Effekt von oligomeren Procyanidinen auf den EGFR durch das ansteigende Molekulargewicht begrenzt ist (Fridrich et al. 2007a). Bei einer vorhergehenden Auftrennung eines HBE mittels Lösungsmittlextraktion und anschließender Hexanfällung an der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) zeigte die aufgereinigte Polymerfraktion ab einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 100 µg/ml eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors. Bei einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml nahm die Aktivität des EGFR auf ca. 68 % (T/C) ab (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010). Diese Ergebnisse bestätigten das inhibitorische Potential der PF. Im Bezug auf ihre zellwachstumshemmende Eigenschaft konnte eine signifikante Minimierung des Zellwachstums bei einer Inkubation mit 58,8 µg/ml PF, das einer HBE-Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml entspricht, auf ca. 84 % (T/C) nachgewiesen werden.

Eine weitere Subfraktion der FF ist CF, die u.a. zu 2,7 % (2,3 µM) CGA und zu 7,0 % (6,3 µM) Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside) besteht. Bei den zwei eingesetzten Konzentrationen, die dem HBE entsprechen, war kein hemmender Effekt auf die Aktivität des Rezeptors erkennbar. Erst bei der 200 µg/ml CF, die jedoch einer Konzentration von 1.315,8 µg/ml HBE entsprechen würde, wurde der Phosphorylierungsstatus des EGFRs signifikant auf ca. 63 % (T/C) minimiert. Aufgrund der antagonistischen Wirkung zwischen CGA und Quercetin ließ sich diese schwache Hemmung erklären. Auch im Bezug auf das Zellwachstum war kein großer Effekt sichtbar. Erst bei einer Konzentration von 30,5 µg/ml CF, das einer HBE-

Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml entspricht, trat eine signifikante Hemmung des Zellwachstums von ca. 88 % (T/C) auf. CF wurde weiters noch in eine polare und unpolare Fraktion aufgetrennt.

CFp wies kein inhibitorisches Potential bezogen auf die Aktivität des EGFRs auf. Da sie zu 5,8 % (2,1 µM) CGA und zu 4,6 % (1,3 µM) Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside) besteht, lässt sich dieser Effekt aufgrund der antagonistischen Wirkung zwischen CGA und Quercetin erklären. Das Zellwachstum betrachtend, war in den getesteten Konzentrationen keine signifikante Hemmung erkennbar. Aufgrund dessen, dass der CGA in HT29-Zellen keine wachstumsstimulierende bzw. –hemmende Wirkung vorausgesagt wurde (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010), lässt sich dieser Effekt begründen.

Bei CFu zeichnete sich ein ähnliches Bild wie bei CFp ab. Der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors wurde nicht gehemmt, sondern bei einer Konzentration von 17,9 µg/ml CFu (entsprechend 200 µg/ml HBE-Äquivalenzkonzentration) in geringem Ausmaße stimuliert. Da CFu zu 8,7 % (5,0 µM) aus Quercetin (inklusive Quercetin-Glucoside) und zu 0,5 % (0,2 µM) aus CGA besteht, würde man aufgrund des hohen Anteils an Gesamt-Quercetin, das schon in geringen Konzentrationen eine hemmende Wirkung zeigte (Fridrich et al. 2008), eine Supprimierung des Phosphorylierungsstatus des EGFRs erwarten. Stattdessen wurde der Rezeptor in geringem Maße stimuliert. Man kann vermuten, dass vielleicht während der Auftrennung bioaktive Substanzen verloren gegangen sind oder abgebaut wurden. CFu zeigte erst bei einer Konzentration von 17,9 µg/ml CFu (entsprechend 200 µg/ml HBE-Äquivalenzkonzentration) eine Hemmung des Zellwachstums auf ca. 90 % (T/C). Sie ist somit für das wachstumshemmende Potential ihrer übergeordneten Copigmentfraktion verantwortlich, das man womöglich auf den höheren Gehalt der Flavonole zurückführen kann.

Da CGA eine stimulierende Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs hatte und AF, FF und Cy bei einer Konzentration von 200 µg/ml die Aktivität des EGFRs hemmten, stellte sich nun die Frage, ob CGA in Coinkubation mit AF, FF und Cy deren Supprimierung des Rezeptors kompensierte. Durch die Inkubation mit FF wurde der Rezeptor auf ca. 51 % (T/C), mit AF auf ca. 86 % (T/C) und mit Cy auf ca. 70 % (T/C) signifikant supprimiert. Bei einer Coinkubation mit 30 µM CGA, wurde der hemmende Effekt dieser Fraktionen und von Cy teilweise signifikant aufgehoben. Daraus kann geschlossen werden, dass das inhibitorische Potential der Subfraktionen und des HBE durch diesen antagonistischen Effekt beeinflusst wird und somit für die unterschiedliche

Hemmleistung der Fraktionen aufgrund konzentrationsbedingter Unterschiede der CGA verantwortlich gemacht werden kann.

Tabelle 5: Einfluss der getesteten Fraktionen bzw. Einzelsubstanzen auf die Rezeptoraktivität des EGFRs und der Wachstumshemmung; +++ starker Effekt, ++ mittlerer Effekt, + geringer Effekt, - kein Effekt, ↑ Stimulierung, n.d. nicht durchgeführt

Getestete Fraktion/Substanz	Einfluss auf EGF-Rezeptoraktivität	Einfluss auf Wachstums-hemmung
Heidelbeerextrakt	+++	+++
Anthocyanfraktion	++	++
Filtratfraktion	+++	+
Polymerfraktion	++	++
Copigmentfraktion	++	++
Polare Copigmentfraktion	-	+
Unpolare Copigmentfraktion	-	+
Cyanidin	++	n.d.
Cyanidin-3-O-glucosid	-	n.d.
Chlorogensäure	↑	n.d.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der spezifischen Bioaktivität des HBE und seinen Subfraktionen auf den EGFR lag. FF wies das stärkste inhibitorische Potential im Bezug auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors auf, wohingegen diese Fraktion auf das Zellwachstum jedoch nur einen geringen Effekt hatte (siehe Tabelle 5). Daraus kann geschlossen werden, dass die Inhibierung des MAPK-Signalweges durch die Hemmung des EGFRs keinen Einfluss auf das Zellwachstum hatte und somit die zellwachstumshemmende Eigenschaft der Fraktionen und des HBE womöglich über die Unterdrückung weiterer Regulationswege erfolgte. Die Bioaktivität des HBE ließ sich aber nicht auf eine spezifische Substanzklasse oder einer bestimmten Fraktion zuweisen. Cy repräsentierte einen potenten Hemmstoff des EGFRs, wohingegen sein Glucosid keine Wirkung zeigte. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität des Rezeptors durch CGA stimuliert. Schlussendlich ließ sich die Bioaktivität des HBE auf diverse antagonistische und synergistische Effekte der Inhaltsstoffe rückschließen. Diese Effekte dürfen jedoch nur als Teilaspekte der komplexen Wirksamkeit des Gesamtexttraktes betrachtet werden.

5 Zusammenfassung

Für die Entstehung von Tumoren ist neben dem Lebensstil, der Umwelt und der genetischen Prädisposition auch die Ernährung ein wichtiger Einflussfaktor. Die Initiation und Progression von Krebs wird mit der Veränderung spezifischer Signaltransduktionswege assoziiert, die die Proliferation, Differenzierung und die Induktion der Apoptose steuern. Aus diesem Grund ist es ein Ziel der Chemoprävention, Nahrungsmittelinhaltsstoffe zu identifizieren, die diese Signalkaskaden inhibieren können. Polyphenole können die Aktivierung der Rezeptoren inhibieren und damit die Signaltransduktion beeinflussen (Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007b; Teller et al. 2009a). Da Beeren und Äpfel reich an diesen Polyphenolen sind, haben sich bereits zahlreiche Studien mit polyphenolreichen Extrakten dieser Früchte beschäftigt und es konnten bereits hemmende Effekte sowohl auf die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen als auch auf das Zellwachstum nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit soll die Wirkung eines anthocyanreichen Heidelbeerextraktes und diverser Subfraktionen, die von der Technischen Universität Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) extrahiert wurden, sowie ausgewählter Inhaltsstoffe auf verschiedene proliferationsassoziierte biologische Endpunkte untersucht werden. Es sollte untersucht werden, ob diese Fraktionen sowie spezifische Inhaltsstoffe die Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und seiner nachgeschalteten Signalelemente modulieren und ob sie das Zellwachstum beeinflussen können. Alle Versuche wurden in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt.

Ein Heidelbeertresterextrakt (HBE) wurde mittels Membranchromatographie SARTOBIND (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie) in Fraktionen aufgetrennt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die sog. Filtratfraktion (FF), die keine Anthocyane enthält, im Gegensatz zur Anthocyanfraktion (AF) einen größeren Einfluss auf die Aktivität des EGFRs hatte. Die Polymerfraktion (PF) und Copigmentfraktion (CF) wiesen hingegen weniger inhibitorisches Potential als FF auf. Der Effekt der CF ließ eventuell auf das antagonistische Wechselspiel zwischen Chlorogensäure (CGA) und Quercetin zurückführen, die sich vermutlich in ihrer Wirkung überlagerten. Durch die polare (CFp) und unpolare Copigmentfraktion (CFu) wurde der Phosphorylierungsstatus des EGFRs nicht gehemmt. Freies Cyanidin (Cy) konnte den Rezeptor supprimieren, wohingegen sein Glucosid Cyanidin-3-glucosid die Aktivität des EGFRs nicht beeinflusste. Im

Gegensatz dazu konnte CGA eine stimulierende Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus des EGFRs zugewiesen werden. Frühere Untersuchungen aus diesem Arbeitskreis bestätigten diese Aktivierung (Daten entnommen aus Diplomarbeit Christine Krumböck). Daher stellte sich nun die Frage, ob CGA in Coinkubation mit AF, FF und Cy deren Supprimierung des Rezeptors aufhobte. Mittels Western Blot Analyse gelang es zu zeigen, dass die hemmenden Effekte dieser Fraktionen und von Cy teilweise kompensiert wurden. Daraus konnte geschlossen werden, dass das inhibitorische Potential der Subfraktionen und des HBE durch diesen antagonistischen Effekt beeinflusst wurde und somit für die unterschiedliche Hemmleistung der Fraktionen aufgrund konzentrationsbedingter Unterschiede der CGA beitrug. Diese Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass für eine angestrebte Unterdrückung der EGFR-Aktivität von Naturstoffextrakten eine Anreicherung von CGA kontraproduktiv sein könnte.

Im Bezug auf die Wachstumshemmung wies AF im Gegensatz zur FF den stärksten Effekt auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Inhibierung des MAPK-Signalweges durch die Hemmung des EGFRs in diesem Falle nur einen untergeordneten Einfluss auf das Zellwachstum hatte und somit die zellwachstumshemmende Eigenschaft der Fraktionen und des HBE womöglich über die Hemmung eines anderen Signalweges erfolgte. PF und CF zeigten einen ähnlichen Effekt. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in dem gewählten Testsystem der Anthocyananteil des HBE eine untergeordnete Rolle für die Unterdrückung der EGFR-Phosphorylierung spielte. Die Bioaktivität des HBE hinsichtlich des EGFR-Hemmpotentials war ein Resultat diverser antagonistischer und synergistischer Effekte weiterer Polyphenole und konnte keiner einzelnen Verbindung zugeordnet werden. Die Inhibierung des MAPK-Signalweges durch die Hemmung des EGFRs hatte keinen direkten Einfluss auf das Zellwachstum in den gewählten Zeitfenstern. Es konnte somit angenommen werden, dass die zellwachstumshemmende Eigenschaft der Fraktionen und des HBE entweder über die Hemmung eines anderen Signalweges oder aber zu einem anderen Zeitpunkt erfolgte.

English summary

In addition to lifestyle, environmental and genetic predisposition nutrition plays a crucial role in tumor development. Initiation and progression of tumorigenesis are associated with modification of specific signaling pathways, controlling proliferation, differentiation and induction of apoptosis. A major aim of chemoprevention research is to identify food constituents inhibiting these pathways.

Polyphenols are a broad class of plant constituents known to inhibit the activation of various receptors and hence are able to influence downstream signal transduction (Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007b; Teller et al. 2009a). In particular, extracts of berries and apples, rich in bioactive polyphenols, were in the focus of numerous studies. It was shown that particularly anthocyanins, a class of intensively colored polyphenols are capable to inhibit receptor tyrosine kinases, a group of receptors associated with tumor growth.

In this work anthocyanin-rich bilberry extract, various subfractions, isolated by the research group of Prof. Winterhalter (Institute of Food Chemistry, TU Braunschweig) and selected single compounds were investigated on their chemopreventive profile using different proliferation-associated *in vitro* endpoints. Focus was laid on polyphenol induced inhibition of EGFR activity (epidermal growth factor receptor) and tumor cell growth. All tests were performed using the human colon carcinoma cell line HT29 in the presence of catalase (100 U/ml).

Complex bilberry extracts have been shown previously to inhibit the EGFR activity *in vitro* (unpublished data from the research group of Prof. Marko). In order to identify potent substance classes, a bilberry extract, containing > 25 % anthocyanins (Symrise Holzminden, Germany) was fractionated by liquid-liquid extraction in a first attempt (Prof. Winterhalter, Institute of Food Chemistry TU Braunschweig). The resulting EGFR inhibitory activity could not be attributed to a specific class of compounds, because anthocyanins (and presumably other bioactive compounds) were omnipresent in all subfractions (Diplomarbeit Christine Krumböck, 2010). Therefore, HBE was fractionated again by membrane chromatography (Sartobind) to specifically separate the anthocyanin proportion.

Studies with the new fractions demonstrated that the anthocyanin-free fraction (FF) has a stronger impact on the activity of EGFR than the anthocyanin-rich fraction (AF). This anthocyanin-free fraction subsequently was separated into a fraction containing mostly anthocyanin polymers (PF) and a fraction with diverse polyphenols (CF). Both of these

subfractions exhibited a clearly weaker inhibitory potential than FF. Further subfractions of CF, CFp and CFu, did not inhibit the phosphorylation status of the EGFR. Cyanidin (Cy), an anthocyanidin, was found to potently suppress the EGFR activity, whereas its corresponding anthocyanin, cyanidin-3-glucoside, had no inhibitory potential in equimolar concentrations. In contrast, CGA exhibited an inducing effect on the EGFR phosphorylation – an effect that was in line with previous studies from our research group (Diplomarbeit Christine Krumböck). The question arose whether CGA neutralizes the inhibiting effects of AF, FF or Cy on the EGFR activity. Therefore a coincubation with CGA and AF, FF and Cy respectively was performed to investigate the effect on the receptors activity. It revealed that the inhibitory effects of the tested substances were diminished partially due to CGA. Therefore it can be assumed that CGA is, at least in part, responsible for compensating effects in subfractions enriched with this substance.

Concerning tumor cell growth inhibition due to the subfractions, a different inhibition pattern appeared. In contrast to the investigations on EGFR activity AF had a stronger inhibitory effect on cell growth compared to FF. Consequentially; both effects seem not to depend on each other. Thus cell growth inhibition due to the extract is mainly caused by anthocyanins, not regulated by EGFR signaling but conceivably by another pathway. Cell growth inhibition by PF and the CF also had a rather weak effect.

In summary the anthocyanin content in the bilberry extract seems to play a minor role in suppression of EGFR activity. Instead the extracts bioactivity is assembled by additive and compensating effects of further polyphenols. The inhibition of the MAPK signaling pathway as a result of the inhibition of EGFR did not directly influence cell growth in the selected time frame. Therefore, it can be assumed that the cell growth inhibitory properties of the extract and its fractions occur either via inhibition of other signaling pathways or within a different time period.

6 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden sowohl die Methoden und Materialien als auch die Geräte, die für die Messungen benötigt wurden, beschrieben.

6.1 Zellkultur

In vitro Methoden sind vielfach verwendete Verfahren um physiologische, biologische und pharmakologische Aktivitäten von Zellen zu untersuchen.

6.1.1 Verwendete Zelllinie

HT29 (ACC 299):

Hierbei handelt es sich um eine humane Adenokarzinomzelllinie, die 1964 aus einem Tumor einer 44 Jahre alten Frau etabliert wurde. HT29-Zellen wachsen adhärent, wobei ihre Verdopplungszeit 40 bis 60 Stunden beträgt. Der Karyotyp der Zelle ist hypertriploid (DSMZ, Braunschweig).

Diese Zelllinie wird als Monolayer in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat) in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wird mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS (Fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

6.1.2 Mediumwechsel

Da bestimmte Zusätze und Bestandteile des Mediums nach einer gewissen Zeit aufgebraucht werden oder sich zersetzen, muss in regelmäßigen Abständen ein Mediumwechsel stattfinden. Durch Anhäufung von Stoffwechselendprodukten ändert sich der pH-Wert des Mediums, das in einem Farbumschlag des Indikators Phenolrot zu orange und gelb sichtbar wird (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Das verbrauchte Medium wird dazu mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch ein frisches, auf 37 °C erwärmtes Medium ersetzt.

6.1.3 Passagieren von Monolayerkulturen

Haben die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-90 % erreicht, wird eine Subkultivierung der Zellen notwendig (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Durchführung:

- Das verbrauchte Medium wird mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt.

- Daraufhin werden die Zellen mit 10 ml warmen 1 % PBS gewaschen um etwaige Medienreste zu entfernen. Anschließend wird die Waschlösung mit einer sterilen Pasteurpipette abgezogen.
- Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen, werden diese mit ca. 2 ml Trypsin überschichtet und für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Die Zellen werden durch leichtes Klopfen an der Seite der Zellkulturflasche zur Gänze vom Boden gelöst.
- Die Zellen werden resuspendiert, dadurch vereinzelt und in ein steriles Tube übergeführt.
- Ca. 2 ml Zellsuspension werden zurück in die Zellkulturflasche gegeben und mit 40 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) aufgefüllt, das zuvor auf 37 °C erwärmt wurde.
- Die restliche Zellsuspension kann nun zum Ausstreuen [vgl. Kap. 6.1.7] verwendet werden.

Die Zellkulturflasche wird nach jeder zweiten Zellpassage ersetzt. Die Passagenzahl sollte maximal 30 betragen. Daraufhin wird die Zelllinie verworfen und Zellen mit niedriger Passagenzahl in Kultur genommen werden (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Reagenzien:

- **10 x PBS (phosphate buffered saline):**

1710 mM NaCl

100 mM Na₂HPO₄

34 mM KCl

18 mM KH₂PO₄

Mit H₂O_{bidest.} auffüllen, pH7,4; die 1 x verdünnten Lösungen autoklavieren

- **Trypsin-Lösung:**

500 mg Trypsin

250 mg EDTA

100 ml 10 x PBS

Mit H₂O_{bidest.} auf 1000 ml auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert 7,0-7,4; steril filtrieren (Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,22 µm), zu je 5 ml aliquotieren, Lagerung bei -20 °C

6.1.4 Einfrieren von Zellen

Durch das Einfrieren bei -80 °C im Biofreezer können Zellen auf längere Sicht gelagert werden. Allerdings muss ein Frostschutzmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugesetzt werden, das sowohl die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle unterdrückt als auch die partielle Dehydratation des Cytoplasmas verhindert. DMSO bindet und ersetzt teilweise das Zellwasser, wodurch es als Frostschutzmittel fungiert (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Durchführung:

- Die Zellen werden wie im Kap. 6.1.3 abtrysiniert.
- Als Frostschutz werden je 500 µl einer Mischung aus 2,8 ml FKS und 1,2 ml DMSO (DMSO-Endkonzentration entspricht 10 %) in Kryoröhrchen vorgelegt.
- Schnelle Aufgabe von je 1 ml Zellsuspension.
- Sofortiges Einfrieren für 24 h bei -20 °C.
- Zwischenlagerung für 24 h bei -80 °C.
- Anschließend können die Zellen in flüssigem Stickstoff Langzeit gelagert werden.

Eine lange Lagerung von Zellen ist bei schonendem Einfrieren in flüssigem Stickstoff möglich. Die Lagerungstemperatur muss dabei unter -130 °C gehalten werden, damit keine Eiskristallbildung erfolgt. Diese würde die Zellen irreversibel schädigen (Lindl and Gstraunthaler 2008).

6.1.5 Auftauen von Zellen

Durchführung:

- Das Auftauen der Zellen muss schnell erfolgen.
- Die gefrorenen Zellen werden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und rasch in 5 ml Zellkulturmedium mit 20 % FKS übergeführt.

- Die Zellsuspension wird anschließend bei Raumtemperatur mit 120 g abzentrifugiert und der Überstand dekantiert.
- Im Anschluss werden die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium mit 20 % FKS resuspendiert und in eine 25 cm² große Zellkulturflasche überführt.
- Nach dem Erreichen einer gewissen Zelldichte wird das Medium auf 10 % FKS reduziert und die Zellen in größeren Zellkulturflaschen (175 cm²) kultiviert.

6.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgt unter einem Phasenkontrastmikroskop mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Hämocytometer) durch mikroskopische Auszählung der Zellen (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Die Zellsuspension wird mit dem Farbstoff Trypanblau versetzt. Hierbei wird das Prinzip der Vitalfärbung mittels Trypanblau als Test auf die Lebensfähigkeit von Zellen angewendet. Trypanblau färbt tote Zellen blau, indem es durch die defekten Zellmembranen in das Zytosol eindringen kann. Im Gegensatz dazu sind die lebenden Zellen als weiße Punkte unter dem Lichtmikroskop erkennbar.

Durchführung:

- Sowohl die Neubauer Zählkammer als auch das Deckglas werden vorsichtig mit 70%igem Ethanol gereinigt.
- Anschließend wird das angehauchte Deckglas so auf die Neubauer Zählkammer platziert, dass sich sog. Newton'sche Ringe bilden. Nun kann sichergestellt werden, dass die Tiefe der Zählkammer 0,1 mm beträgt (Lindl and Gstraunthaler 2008).
- Abtrypsinierung der Zellen wie im Kap. 6.1.3.
- Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung.
- Nach mehrmaligem Resuspendieren wird die Pipette mit der Suspension an den Rand der Kammer gesetzt, wo diese aufgrund von Kapillarkräften hineingesogen wird. Es gilt zu beachten, dass die Kammer nicht über- oder unterfüllt wird, da sonst das Volumen aufgrund der Oberflächenspannung nicht mehr korrekt wäre.
- Daraufhin wird die Zellzahl lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei nur die lebenden Zellen berücksichtigt werden. Die Neubauer-Zählkammer ist aus neun Quadraten zu je 1 mm² aufgebaut. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich ein daraus resultierendes Volumen von 0,1 µl. Die vier Eck-

Quadrate (siehe Abbildung 35) werden ausgezählt, wobei nur die lebenden Zellen, die durch die Vitalfärbung weiß erscheinen, mit einbezogen werden. Im Gegensatz dazu sind die toten Zellen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit durch Trypanblau blau gefärbt. Die daraus resultierenden vier Werte werden gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor als auch mit 10^4 multipliziert. Daraus ergibt sich die Anzahl der Zellen pro ml Suspension.

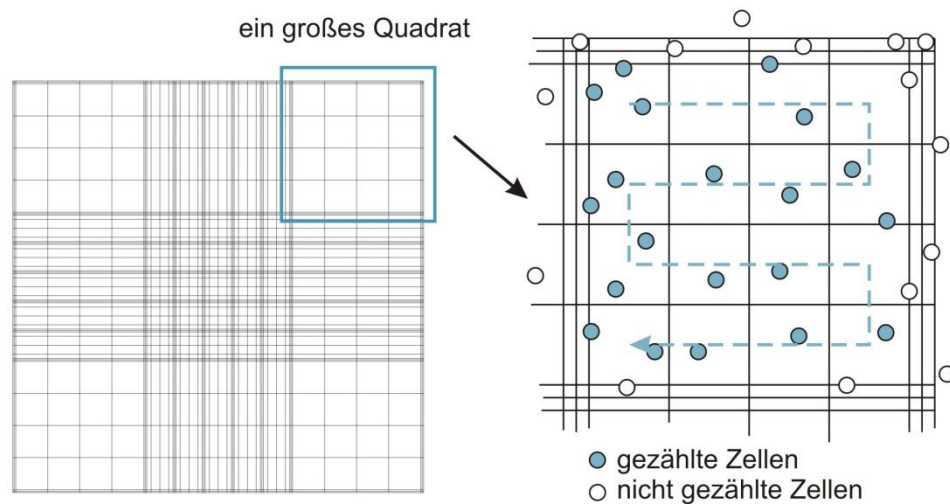


Abbildung 35: Netzeinteilung einer Neubauer-Zählkammer und das Auszählschema eines großen Quadrates (Lindl and Gstraunthaler 2008)

6.1.7 Ausstreuen von Zellen

Die Zellsuspension wird mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Zellzahl verdünnt und die Zellen in Kulturschalen ausgestreut. Durch das kreuzförmige Hin- und Herbewegen der Kulturflaschen wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (Lindl and Gstraunthaler 2008).

6.1.8 Substanzinkubation

Die zu untersuchenden Testsubstanzen werden zuerst in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, da sie schlecht wasserlöslich sind und anschließend in Zellkulturmedium homogenisiert. Die Endkonzentration von DMSO beträgt 1 % im Zellkulturmedium. Bei jedem Versuch wird als Negativkontrolle daher eine 1%ige DMSO-Lösung mitgeführt, die im Weiteren als DMSO-Kontrolle bezeichnet wird.

Durchführung:

- Lösen der Testsubstanzen in DMSO und homogenisieren in DMEM.

- Das alte Medium wird von den Zellen abgezogen und durch ein neues, welches die gelösten Testsubstanzen enthält, ersetzt.
- Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank für die, dem Assay entsprechende Zeit.

6.1.9 Mycoplasmascreening

Unter Mycoplasmen versteht man die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten (Razin et al. 1998). Aufgrund ihrer geringen Größe (0,2-2 µm) sind sie im Stande Sterilfilter zu passieren. Sie können in den Stoffwechsel der befallenen Zellen eingreifen. Dies kann zu unerwünschten Artefakten führen und die Interpretation der Versuchsergebnisse beeinflussen (Lindl and Gstraunthaler 2008). Deshalb ist es sinnvoll die Zellkultur in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen zu untersuchen.

Die schnellste Nachweismethode von Mycoplasmenkontaminationen stellt der DAPI-Test dar. Hierbei wird die Mycoplasmen-DNA mit dem Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid), das speziell an die DNA bindet, angefärbt. Dabei werden die Mycoplasmen als gleichmäßig geformte, hell leuchtende Punkte oder als Ansammlungen sichtbar (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Durchführung:

- Passagieren von Zellen [vgl. Kap. 6.1.3].
- Vorlegen von 10 ml 10 % FKS-haltigem Medium in einer Petrischale, in der zuvor ein „super-frost“ Objektträger gelegt wurde.
- Ausstreuen von Zellen (2-3 Tropfen), anschließend Kultivierung im Brutschrank für 24 h.
- Entfernung des Mediums.
- Durch Zugabe von -20 °C kaltem Methanol kommt es zur Fixierung der Zellen am Boden. Diese werden dann für 15 min im Methanolbad gelagert.
- Einige Tropfen der DAPI/SR 101-Lösung werden auf den Objektträger pipettiert, die spezifisch genomische DNA anfärbt.
- Nun werden die Zellen mit einem Deckglas, möglichst luftblasenfrei, bedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine Mycoplasmenkontamination lässt sich durch gleichmäßig geformte, kleine, hell leuchtende blaue Punkte erkennen (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Reagenzien:

- **DAPI/SR 101-Lösung:**

200 mM TRIS/HCl pH 7,6

200 mM NaCl

8 µM DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)

50 µM SR 101 (Sulforhodamin 101)

In H₂O_{bidest.} lösen

6.2 Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von EGFR mittels Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot ist eine Methode, bei der zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran übertragen und anschließend die zu untersuchenden Proteine durch eine immunologische Reaktion mit Hilfe von Antikörpern spezifisch und hochempfindlich nachgewiesen werden.

6.2.1 Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation

Durchführung:

- Es werden 1-2 Millionen HT29-Zellen in mittleren Petrischalen (d = 10 cm) ausgestreut und für 48 h bzw. 72 h mit 10 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) kultiviert.
- Es findet eine weitere Kultivierung für 24 h unter serumreduzierten Bedingungen statt (1 % FKS).
- Die Substanzinkubation erfolgt unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in 5 ml serumfreien Medium am Tage der Aufarbeitung. Die Inkubationsdauer beträgt 45 min bei 37 °C im Brutschrank, wobei die Substanzen in DMSO gelöst sind (DMSO-Endkonzentration: 1 %).
- Nach 30 min wird mit dem spezifischen Ligand EGF für 15 min stimuliert.

6.2.2 Gewinnung der Proteine

Die komplette Aufarbeitung der Zellen bis zur Hitze-Denaturierung erfolgt auf Eis und wird möglichst rasch durchgeführt.

Durchführung:

- Nach der Inkubation werden die Petrischalen schnell auf Eis gestellt und das Medium abgeschüttet.

- Anschließend werden sie zweimal mit je 3 ml kaltem 1 % PBS gewaschen und die PBS-Rückstände mit einer Pipette vollständig abgezogen.
- Pro Petrischale werden je 200 µl RIPA-Puffer zupipettiert um die Zellen zu lysieren.
- Die Zellen werden abgeschabt und das Zelllysate in einen Handhomogenisator überführt und mittels tight-pistill durch 40-50 Hübe aufgeschlossen.
- Das gewonnene Zelllysate wird in ein Eppendorfgefäß übergeführt und bei 4 °C für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert um die nichtlöslichen Zellbestandteile abzutrennen.
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellett (nichtlösliche Zellbestandteile) verworfen.

Reagenzien:

- **RIPA-Puffer:**

50 mM TRIS
 250 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 mM NaF
 1 % (v/v) Igepal

Mit H₂O_{bidest.} auf 100 ml auffüllen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen

Direkt vor der Anwendung werden folgende Bestandteile hinzugesetzt und der Puffer auf Eis gelagert:

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
 1 mM Na₃VO₄
 1 µM Protease Inhibitor Mix (Roche)

6.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine photometrische Methode zur quantitativen Analyse von Proteinen. Diese Methode basiert auf der starken Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 (siehe Abbildung 36) an Zellproteine unter sauren Bedingungen. Dabei lagert sich der Farbstoff unspezifisch an die basischen bzw. apolaren Seitenketten der Proteine an, wobei es zur Komplexbildung und zu einem Farbumschlag von braun nach blau kommt. Durch das Binden des Farbstoffes an die Zellproteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm.

Eine Standardreihe mit BSA (bovine serum albumin) wird erstellt, um anhand der gemessenen Absorptionswerte nach Abzug des Leerwertes die Proteine bestimmen zu können. Die Konzentrationen liegen in einem Größenbereich zwischen 0,1 und 1 mg/ml BSA.

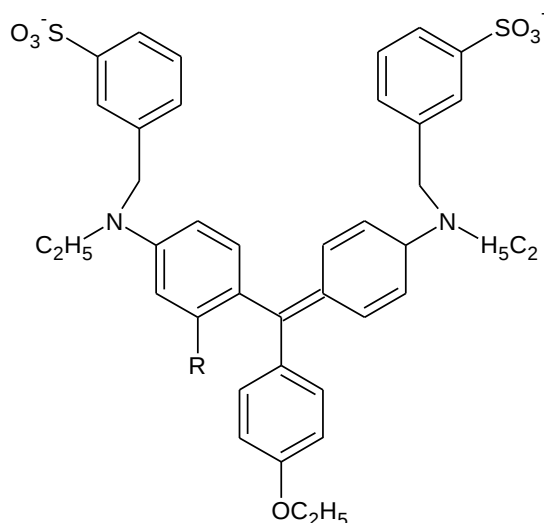


Abbildung 36: Struktur des Coomassie Brilliant Blue G250

Durchführung:

- von dem in 6.2.2 erhaltenem Zelllysats werden 10 µl mit 90 µl H₂O_{bidest.} verdünnt.
- Von dieser Verdünnung werden 10 µl mit 1 ml filtriertem Bradford-Reagenz versetzt und gevortext.
- Ebenso werden je 10 µl der BSA-Standards mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt.
- Als Negativkontrollen werden 10 µl H₂O_{bidest.} bzw. 10 µl RIPA-Puffer (1:10 verdünnt) ebenfalls mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt.
- Anschließend werden von jeder Probe jeweils 200 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert, wobei eine Dreifachbestimmung durchgeführt wird.
- Die Absorption wird mittels Mikrotiterplattenlesegerät (Viktor³ V Multilable Counter, Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Auswertung:

- Die Auswertung erfolgt mittels Excel. Dabei wird sowohl von den Werten der Standardreihe der H₂O-Blankwert als auch der Wert des RIPA-Puffers von Probenwerten abgezogen und eine Kalibrierfunktion erstellt.
- Durch lineare Regression wird die Proteinmenge berechnet.

- Laut dem errechneten Pipettierschema werden in der darauffolgenden SDS-PAGE in jede Geltasche 60 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Reagenzien:

- **Bradford-Reagenz:**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250

50 ml Ethanol

100 ml H₃PO₄ (85%)

Mit H₂O_{bidest.} auf 1 l auffüllen und nach vier Wochen abfiltrieren. Es wird im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und muss einen Monat vor Gebrauch angesetzt werden.

6.2.4 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Dabei werden die Proteine proportional zu ihrem Ladungs-/Masse-Quotienten beschleunigt und aufgrund ihrer Reibung, die größen- sowie formabhängig ist, abgebremst (Müller-Esterl 2004; Löffler et al. 2007).

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgt die Auftrennung der Proteine in Relation zu ihrem Molekulargewicht, genauer in Abhängigkeit zu ihrem mittleren Molekülradius. Durch Polymerisierung von Monomeren wird ein hochvernetztes Polyacrylamidgel hergestellt, indem die Trennung erfolgt. Um eine optimale Trennleistung zu erzielen, kann die Porengröße des Geles durch die Einstellung des Vernetzungsgrades variiert werden (Löffler et al. 2007).

Die Proteine werden zunächst mittels Natriumdodecylsulfat (SDS, siehe Abbildung 37), einem anionischen Detergens, denaturiert. Es bindet an die hydrophoben Bereiche des Proteins, wodurch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen aufgehoben wird. Dabei wird die physiologische Proteinfaltung zerstört.

Die Nettoladungen der Proteine, die aus den Seitenkettenladungen der einzelnen Aminosäuren resultieren, werden durch die negative Nettoladung des Detergens-Moleküls überdeckt. Dadurch wird die ursprüngliche Ladung der Proteine vernachlässigbar und alle Moleküle erhalten dasselbe Masse/Ladungsverhältnis. Nun werden die Proteine ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei größere Proteine aufgrund des Molekularsiebeffekts des Geles stärker gebremst werden als kleine und daher langsamer zur Anode wandern (Müller-Esterl 2004).

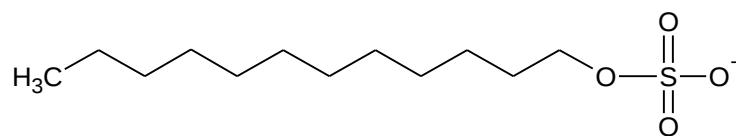


Abbildung 37: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat (SDS)

Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten und man erhält ein Proteingemisch, welches aus aufgefalteten und ausschließlich aus negativ geladenen Polypeptidketten besteht (Müller-Esterl 2004; Löffler et al. 2007).

Durch Mitführen bekannter Referenzproteine (Marker) können Proteinmassen bei der Elektrophorese abgeschätzt werden (Müller-Esterl 2004).

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

Zu charakterisierendes Protein	Molekulargewicht (kDa)	Polyacrylamidanteil des Trenngels [%]
EGFR/pEGFR	170	7
α -Tubulin	54	12

Tabelle 7: Pipettierschemata der Trenn- und Sammelgele (für je 1 Gel)

	7 %-iges Trenngel	12 %-iges Trenngel	Sammelgel
H ₂ O _{bidest.} [ml]	3,97	2,69	1,58
0,5 TRIS [ml]	-	-	0,66
1,5 M TRIS [ml]	1,92	1,92	-
Acrylamid (30%) [ml]	1,80	3,08	0,33
SDS 10% [μ l]	76,8	76,8	26,4
APS 10 % [μ l]	38,4	38,4	26,4
TEMED [μ l]	3,84	3,84	2,64

Gießen der Trenn- und Sammelgele:

- Zunächst werden die Glasplatten mit 70 % Ethanol entfettet und die Kammern entsprechend der Anleitung zusammengebaut.

- Es werden für das Trenngel $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, TRIS, Acrylamid und SDS vorgelegt, anschließend APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) als Radikalstabilisator hinzugegeben und gut durchmischt (siehe Tabelle 7).
- Nun werden die Kammern zügig mit dem Trenngel mittels einer Pipette befüllt, wobei die Höhe ca. 6 cm betragen sollte.
- Anschließend werden die Gele mit n-Butanol überschichtet um die Auspolymerisierung der Gele zu verbessern und um eine einheitliche Geloberfläche zu erhalten.
- Nach dem Auspolymerisieren der Gele, Dauer ca. 30 min, wird n-Butanol abgegossen, zwei Mal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült und die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier aufgesogen.
- Die Kämme werden, noch nicht bis zur Gänze, eingesetzt, damit die Bildung der Geltaschen beim Einfüllen vom Sammelgel ermöglicht wird.
- Das Sammelgel wird gemäß Tabelle 7 zusammenpipettiert und über das Trenngel geschichtet. Beim Befüllen ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Geltaschen bilden. Nun werden die Kämme bis zum Anschlag in das Gel gedrückt und das Gel für ca. 1 h auspolymerisieren gelassen.
- Daraufhin werden die Kämme vorsichtig entfernt und eventuell vorhandene Luftblasen und Gelreste in den Probestaschen mit einer Kanüle abgesaugt.
- Durch die Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kap. 6.2.3) werden nun die Proteinlösungen entsprechend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt, um einen Proteingehalt von 40 µg pro Geltasche zu erhalten.
- Anschließend wird den Proben SDS-Probenpuffer (6x) hinzugefügt und diese bei 95 °C und 950 rpm für 8 min im Thriller denaturiert.
- Auftragen von 20 µl der jeweiligen Probe pro Probestasche (siehe Abbildung 38).

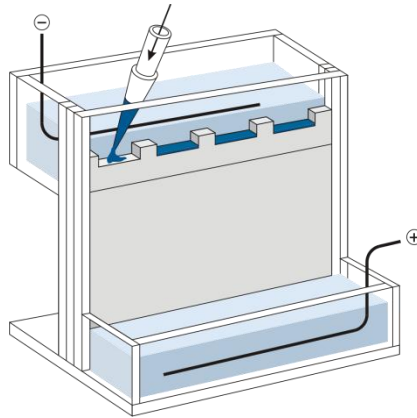


Abbildung 38: Schematischer Aufbau einer Elektrophoresekammer

- Nun werden die Proteinlösungen vorsichtig mit 1 x Laufpuffer überschichtet, die Elektrophoresekammern zur Gänze mit 1 x Laufpuffer befüllt und die Elektrophorese gestartet.
- Die Gelelektrophorese beginnt mit 120 V für 30 min, danach wird die Spannung auf 140 V für 1,5 h erhöht.

Reagenzien:

- **10 x Laufpuffer:**

2 M Glycin
250 mM TRIS
1 % SDS

Der pH-Wert wird auf 8,3 eingestellt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 2 l aufgefüllt.

- **Acrylamid (30%):**

Wässrige Lösung mit 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

- **TRIS Puffer (1,5 M):**

1,5 M TRIS

Den pH-Wert auf 8,8 einstellen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 200 ml auffüllen.

- **TRIS Puffer (0,5 M):**

0,5 M TRIS

Den pH-Wert auf 6,8 einstellen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 200 ml auffüllen.

- **6 x SDS-Probenpuffer:**

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

Auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auffüllen und zu 1 ml aliquotieren. Vor dem Gebrauch

werden die Aliquots mit 52,6 µl β-Mercaptoethanol versetzt.

- **Ammoniumperoxodisulfat (APS)–Lösung:**
10 % (w/v) APS in H₂O_{bidest}
- **SDS-Lösung:**
10 % (w/v) SDS in H₂O_{bidest}
- **N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)-Lösung**

6.2.5 Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese werden die Proteine vom Gel auf eine dünne Nitrocellulose-Membran übertragen (geblottet), da sie in der Gelmatrix für die Antikörpermoleküle unzugänglich sind (Müller-Esterl 2004; Löffler et al. 2007).

Für den Transfer wird das Gel auf die Membran platziert und anschließend eine Spannung senkrecht zur Gelebene angelegt. Dabei werden die Proteine unspezifisch auf der Membran gebunden, wodurch ein Abdruck des Proteinmusters auf der Membran entsteht. Anschließend werden die freien Bindungsstellen der Matrix mit Milchpulverprotein abgesättigt, damit eine unspezifische Bindung der Antikörper-Proteine an die Membran verhindert wird (Müller-Esterl 2004).

Durchführung:

- Pro Gel werden zwei Whatman-Paper in der Größe der Membran zugeschnitten und im Blotting Puffer ebenso wie die Nitrocellulosemembranen eingeweicht.
- Auf je ein Whatman-Paper wird eine Nitrocellulosemembran gelegt.
- Nach Beendigung der Gelelektrophorese werden die Gele mithilfe des Spacers vorsichtig aus den Glasplatten gelöst, im Blotting Puffer gewaschen und auf die Membran platziert.
- Anschließend wird auf jedes Gel ein weiteres Whatman-Paper gelegt und durch Walzen mögliche Luftblasen entfernt.
- Der Blot findet für 1,15 h mit 150 V bei max. 1000 mA statt.

Reagenzien:

- **2 x Blottingpuffer:**

78 mM Glycin
96 mM TRIS
0,07 % SDS
40 % Methanol

Mit H₂O_{bidest.} auf 5 l auffüllen.

- **20 x TBS-Puffer:**

2,6 M NaCl
400 nM TRIS

Den pH-Wert auf 7,6 einstellen und mit H₂O_{bidest.} auf 2 l auffüllen.

6.2.6 Quantifizierung der Rezeptoraktivität

Die aufgetrennten Proteine werden mittels Immunodetektion quantifiziert. Dazu werden zunächst primäre Antikörper eingesetzt, die spezifisch an das zu untersuchende Protein (EGFR und pEGFR) binden. Anschließend wird mit den Sekundärantikörpern, die spezifisch gegen die Primärantikörper gerichtet sind, inkubiert. Erstere sind mit dem Enzym HRP (horseradish peroxidase) konjugiert, das in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol oxidiert und somit die Freisetzung von Licht katalysiert. Dieses wird mittels einer Chemolumineszenz-Messung detektiert und gibt Aufschluss über die Menge bzw. den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors (Müller-Esterl 2004).

Durchführung:

- Die Nitrocellulosemembran wird in Milchpulverlösung für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Dabei werden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran durch das im Milchpulver enthaltene Casein abgesättigt.
- Anschließend wird mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert, der zuvor in Milchpulverlösung in entsprechender Verdünnung (zumeist 1:1000) angesetzt wurde.
- Die Nitrocellulosemembranen werden drei Mal mit 15 ml Waschpuffer (1 x TBS, 0,1 % TWEEN) für je 5 min gewaschen um den unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen.

- Die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur.
- Nach dreimaligem Waschen mit 15 ml Waschpuffer (1 x TBS, 0,1 % TWEEN) für jeweils 5 min, werden die Nitrocellulosemembranen in 4 ml ECL-Lösung für 1 min inkubiert.
- Die Detektion erfolgt mit CCD-Imager (LAS-4000, Fujifilm) und die Quantifizierung mittels Multi Gauge V3.2. Die Lösungsmittelkontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO) wird bei der Auswertung auf 100 % gesetzt und die zu untersuchenden Substanzen als „Test-over-control“ (T/C) in [%] angegeben.

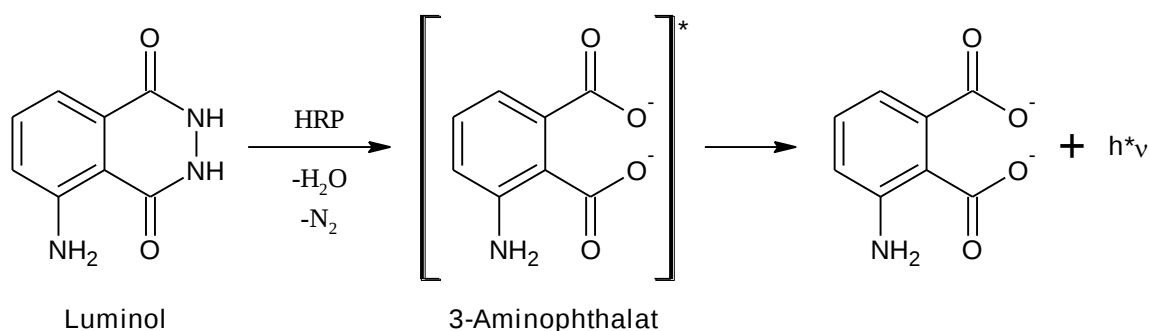


Abbildung 39: Reaktion von Luminol mit H₂O₂, katalysiert durch das Enzym HRP (horseradish peroxidase)

Reagenzien:

- **Blockingpuffer:**
 - 5 % Milchpulver
 - 0,01 % Tween 20
 - In 1 x TBS lösen
- **Waschpuffer:**
 - 250 ml 20 x TBS
 - 0,01 % Tween 20
 - Mit H₂O_{bidest.} auf 5 l auffüllen
- **Western-Lightning™ – ECL (PerinElmer)**
 - 2 ml H₂O₂-Lösung
 - 2 ml Luminol-Lösung

Primärantikörperinkubation und Verdünnung:

EGFR (mouse):	1:1000 in Milchpulver
pEGFR (goat):	1:1000 in Milchpulver
α-Tubulin (mouse):	1:2000 in Milchpulver

Sekundärantikörperinkubation und Verdünnung:

Goat Anti-Mouse AK 1:2000 in Milchpulver

Mouse Anti-Goat AK 1:2000 in Milchpulver

6.3 SRB-Assay: Test auf Wachstumshemmung

Der Sulforhodamin-B-Assay ist ein Standardverfahren, mit dem sowohl zytotoxische als auch zellwachstumshemmende Effekte einer Testsubstanz erfasst werden.

Die zellwachstumshemmenden Eigenschaften einer Substanz werden mit einer Negativkontrolle verglichen. Durch den lipophilen Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin B werden die Zellproteine angefärbt. Sulforhodamin B ist ein rotgefärbtes Aminoxanthen, das zwei Sulfonsäuregruppen trägt (siehe Abbildung 40). Dieser bindet in seiner protonierten Form an die fixierten Proteine und kann unter schwach basischen Bedingungen (pH 10) wieder abgelöst werden. Anschließend wird die Intensität des Farbstoffes, der sein Adsorptionsmaximum bei ca. 565 nm besitzt, photometrisch detektiert (Skehan et al. 1990).

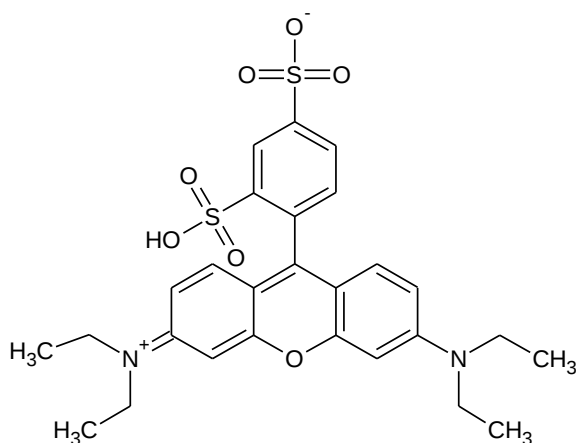


Abbildung 40: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Sulforhodamin B

Durchführung:

- Ausstreuen von 5000 HT29-Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte. Als Medium wird DMEM mit 10 % FKS und 1 % P/S verwendet. Diese werden anschließend für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ anwachsen gelassen.
- Dann erfolgt die Substanzinkubation in DMEM (10 % FKS, 1 % P/S, 100 U/ml Katalase) für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Negativkontrolle wird 1%ige DMSO-Lösung im Zellkulturmedium verwendet.
- Abstoppen des Zellwachstums mit 100 µl 50%-iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA)

- Für 1 h werden die Zellen bei 4 °C inkubiert, damit die Zellen am Boden fixiert werden.
- Anschließend zweimal vorsichtig mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ waschen um das restliche Medium und Zellrückstände zu entfernen.
- Trocknung der 24-Well-Platten für ca. 24 h bei Raumtemperatur.
- Anfärben der fixierten Zellen mit 300 μl 0,4%-iger SRB-Lösung für 1 h.
- Abschütteln des Reagenzes.
- Nach zweimaligem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und einmal mit 1%iger Essigsäure und anschließender Trocknung, wird der zellgebundene Farbstoff mit TRIS-Base bei pH 10 gelöst.
- Die Intensität des Farbstoffes wird photometrisch bei 570 nm mittels Mikroplattenlesegerät (Victor³ V) detektiert, wobei die Farbstoffmenge relativ zur Zellproteinmenge ist.

Auswertung:

Die erhaltenen Adsorptionswerte werden dem Nalimov-Test unterzogen, gemittelt und auf den Mittelwert der beiden Kontrollen bezogen, wodurch man den T/C-Wert (test over control) in Prozent erhält. Dieser Wert bringt das Verhältnis der Zellproteinmenge der Probe im Vergleich zur Kontrolle zum Ausdruck.

Reagenzien:

- **1%ige Essigsäure**
- **Sulforhodamin-B-Lösung:**
0,4 g Sulforhodamin-B in 100 ml 1%-iger Essigsäure aufgelöst
- **50%ige Trichloressigsäure (TCA)**
- **10 mM TRIS-Base:**
2,42 g TRIS in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auflösen, auf pH 10,0 einstellen und auf 2 l auffüllen

Nalimov-Test:

Man kann mittels Nalimov-Test eine Aussage darüber treffen, ob ein bestimmter Messwert x^* in eine erwartete Messreihe passt oder die Erwartungen nicht erfüllt. Die Statistik errechnet sich nach folgender Formel:

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

Man darf x^* als statischen Ausreißer mit einer statistischen Sicherheit von $(1 - \alpha)$ sehen, wenn $r^* \geq r(FG/\alpha)$ gilt. Die Anzahl der Freiheitsgrade ergibt sich zu $FG = n - 2$ (Lozan and Kausch 2003).

6.4 Materialien

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorfreaktionsgefäße
Glaspipetten
Kulturflaschen
Multipipettenaufsatz
Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)
Pipettenspitzen (5ml)
Pasteurpipetten
Petrischalen (d = 10 cm)
Rotiprotect-LATEX-Handschuhe
Rotiprotect-NITRIL-Handschuhe
Inkubationsröhrchen (13, 15, 50 ml)
TC-Platte, 24-Loch, steril
Whatman Nitrocellulose Transfer Membran
Whatman Papiere
Zellschaber, 25 cm, steril

Chemikalien:

Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Bromphenolblau, Na-Salz
n-Butanol
Coomassie-Brillantblau G 250
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Essigsäure (100%)
Ethanol p.A.
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
Glycerin
Glycin
Kaliumchlorid
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2HPO_4)
Katalase
 β -Mercaptoethanol
Methanol
Milchpulver
Natriumchlorid

Hersteller:

Sarstedt AG & Co
VWR International S.A.S.
Sarstedt AG & Co
Eppendorf
Sarstedt AG & Co
Eppendorf
Carl Roth GmbH & Co KG
Sarstedt AG & Co
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Sarstedt AG & Co
VWR International S.A.S.
Pall Life Sciences
Whatman Inc.
Sarstedt AG & Co

Hersteller:

Carl Roth GmbH & Co KG
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Carl Roth GmbH & Co KG
VWR International S.A.S.
Carl Roth GmbH & Co KG
Carl Roth GmbH & Co KG

Natriumfluorid	Merck KGaA
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumorthovanadat (NaO_3VO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Protease Inhibitor Mix	Roche Diagnostics GmbH
Phenylmethysulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co KG
Phosphorsäure (85%)	Merck KGaA
Rotiphorese® Gel 30 (30 %wässrige Lösung Acrylamid mit 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co KG
Salzsäure (37%)	Merck KGaA
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH & Co KG
Sulforhodamin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin(TEMED)-Lösung	Carl Roth GmbH & Co KG
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Western Lightning™ – ECL	Perkin Elmer
Testsubstanzen:	Hersteller:
Heidelbeerextrakt (HBE)	Firma Kaden, Biochemicals GmbH
HBE-Anthocyanfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Filtratfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Polymerfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Polare Polymerfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Unpolare Polymerfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Copigmentfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Polare Copigmentfraktion	Technische Universität Braunschweig
HBE-Unpolare Copigmentfraktion	Technische Universität Braunschweig
Cyanidin	Extrasynthese
Cyanidin-3-O-glucosid	Carl Roth GmbH & Co KG
Chlorogensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Quercetin-dihydrat	Carl Roth GmbH & Co KG
Tyrphostin AG1478	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Antikörper:

Anti-EGFR antibody (mouse)	Santa Cruz
Anti-pEGFR antibody (goat)	Santa Cruz
Anti- α -Tubulin antibody (mouse)	Santa Cruz
Goat anti-mouse antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz
Mouse anti-goat antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz

Hersteller:**Zellkultur:****Hersteller:**

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	Gibco [®] , Invitrogen
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco [®] , Invitrogen
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ, Braunschweig
Penicillin/Streptomycin	Gibco [®] , Invitrogen
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin	Gibco [®] , Invitrogen
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Calbiochem

6.5 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Systec DX-150	Systec GmbH
Biofreezer	VipTM Series	Sanyo
Blotter	Trans-Blot [®] Cell, 49 BR 3584	Bio Rad
Bunsenbrenner	Fuego basic	WLD-TEC
Brutschrank	Heracell 240 i, CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific
Eismaschine	MF 46	Scotsman Frimont
Geldokumentationsgerät	LAS-4000, Luminescent Image Analyser	Fujifilm Software: Image Reader LAS 4000; Auswertung: Multi Gauge V3.2
Gelelektrophorese	Bio Rad Modell 45-2010-i	Peqlab Biotechnology GmbH
Handhomogenisator		Wheaton
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr Comfort (4 °C, - 20 °C)	Liebherr

Magnetrührer	IKA® RCT basic, safety control	IKA
Mikrotiterplattenleser	Victor3V 1240 Multilable Counter	Perkin Elmer
Mikroskop	Inversmikroskop 40C	Axiovert Zeiss
Neubauer-Zählkammer		Marientfeld
pH-Meter		
Pipetten, Pipettus, Multipette	Mettler Toledo Seven Easy	Mettler Toledo
Power Station	Electrophorese Supply EV231	Power PeQlab
Schüttler	PumpenVakuumsaugpumpe Laboport®	IBS Integra biosciences
Sterilbank	Hera Safe KS 18	Thermo Fischer Scientific
Trockenschrank	Binder, ATP line™ ED (E2)	Binder GmbH
Vortexer	Bio Vortex V1, Peqlab Biotechnologies Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Analysenwaage New Classic MF, ML204/01	Mettler Toledo
	Analysenwaage Micro	Sartorius AG
	Grobwaage New Classic MF, ML6001/01	Mettler Toledo
	Mikro 200	
Wasserbad	GD 100	Grant
Zentrifuge	Tischzentrifuge Mikro 220R	Hettich Zentrifugen

7 Literaturverzeichnis

- Afaq F**, Zaman N, Khan N, Syed DN, Sarfaraz S, Zaid MA, Mukhtar H (2008) Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling pathway by delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables. *Int J Cancer* 123 (7):1508-1515. doi:10.1002/ijc.23675
- Agullo G**, Gamet L, Besson C, Demigne C, Remesy C (1994) Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Lett* 87 (1):55-63. doi:0304-3835(94)90409-X [pii]
- Aherne SA**, O'Brien NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18 (1):75-81. doi:S0899900701006955 [pii]
- Ali BH**, Mousa HM, El-Mougy S (2003) The effect of a water extract and anthocyanins of hibiscus sabdariffa L on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 17 (1):56-59. doi:10.1002/ptr.1084
- Alia M**, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006) Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* 45 (1):19-28. doi:10.1007/s00394-005-0558-7
- Arteaga CL**, Johnson DH (2001) Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Curr Opin Oncol* 13 (6):491-498
- Bazley LA**, Gullick WJ (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12 Suppl 1:S17-27. doi:12/Supplement_1/S17 [pii] 10.1677/erc.1.01032
- Beecher GR** (1999) Phytonutrients' role in metabolism: effects on resistance to degenerative processes. *Nutr Rev* 57 (9 Pt 2):S3-6
- Beecher GR** (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 133 (10):3248S-3254S
- Beerli RR**, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE (1995) Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 15 (12):6496-6505
- Bellion P**, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2009) Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol Nutr Food Res* 53 (10):1226-1236. doi:10.1002/mnfr.200800456
- Ben-Levy R**, Peles E, Goldman-Michael R, Yarden Y (1992) An oncogenic point mutation confers high affinity ligand binding to the neu receptor. Implications for the generation of site heterogeneity. *J Biol Chem* 267 (24):17304-17313
- Bhatia N**, Agarwal C, Agarwal R (2001) Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr Cancer* 39 (2):292-299. doi:10.1207/S15327914nc392_20

- Bhattaram** VA, Graefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H (2002) Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine* 9 Suppl 3:1-33
- Bosetti** C, Bravi F, Talamini R, Parpinel M, Gnagnarella P, Negri E, Montella M, Lagiou P, Franceschi S, La Vecchia C (2006) Flavonoids and prostate cancer risk: a study in Italy. *Nutr Cancer* 56 (2):123-127. doi:10.1207/s15327914nc5602_1
- Bravo** L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56 (11):317-333
- Breinholt** VM, Offord EA, Brouwer C, Nielsen SE, Brosen K, Friedberg T (2002) In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem Toxicol* 40 (5):609-616. doi:S0278691501001259 [pii]
- Burgess** AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12 (3):541-552. doi:S1097276503003502 [pii]
- Cao** G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22 (5):749-760. doi:S0891-5849(96)00351-6 [pii]
- Chandrasekharan** NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21):13926-13931. doi:10.1073/pnas.162468699 162468699 [pii]
- Cheyrier** V (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 81 (1 Suppl):223S-229S. doi:81/1/223S [pii]
- Chinery** R, Beauchamp RD, Shyr Y, Kirkland SC, Coffey RJ, Morrow JD (1998) Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 58 (11):2323-2327
- Ciardiello** F (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 60 Suppl 1:25-32; discussion 41-22
- Citri** A, Skaria KB, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284 (1):54-65. doi:S0014482702001015 [pii]
- Cooke** D, Schwarz M, Boocock D, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH (2006) Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--relationship with tissue anthocyanin levels. *Int J Cancer* 119 (9):2213-2220. doi:10.1002/ijc.22090
- Croft** KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854:435-442

- D'Archivio M**, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 43 (4):348-361
- Dashwood WM**, Orner GA, Dashwood RH (2002) Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 296 (3):584-588. doi:S0006291X02009142 [pii]
- de Bono JS**, Rowinsky EK (2002) Therapeutics targeting signal transduction for patients with colorectal carcinoma. *Br Med Bull* 64:227-254
- Depeint F**, Gee JM, Williamson G, Johnson IT (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 61 (1):97-103
- DeYulia GJ, Jr.**, Carcamo JM (2005) EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases. *Biochem Biophys Res Commun* 334 (1):38-42. doi:S0006-291X(05)01282-9 [pii] 10.1016/j.bbrc.2005.06.056
- Duthie SJ**, Jenkinson AM, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG (2006) The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur J Nutr* 45 (2):113-122. doi:10.1007/s00394-005-0572-9
- Dutta PR**, Maity A (2007) Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett* 254 (2):165-177. doi:S0304-3835(07)00049-3 [pii] 10.1016/j.canlet.2007.02.006
- Ennis BW**, Lippman ME, Dickson RB (1991) The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 9 (5):553-562
- Faria A**, Pestana D, Teixeira D, de Freitas V, Mateus N, Calhau C (2010) Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytother Res* 24 (12):1862-1869. doi:10.1002/ptr.3213
- Ferguson PJ**, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ (2004) A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J Nutr* 134 (6):1529-1535
- Fiander H**, Schneider H (2000) Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett* 156 (2):117-124. doi:S0304383500003682 [pii]
- Fridrich D**, Kern M, Fritz J, Pahlke G, Kohler N, Winterhalter P, Marko D (2007a) The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Mol Nutr Food Res* 51 (2):192-200. doi:10.1002/mnfr.200600186
- Fridrich D**, Kern M, Pahlke G, Volz N, Will F, Dietrich H, Marko D (2007b) Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol Nutr Food Res* 51 (5):594-601. doi:10.1002/mnfr.200600189
- Fridrich D**, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D (2008) Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the

- ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol Nutr Food Res* 52 (7):815-822. doi:10.1002/mnfr.200800026
- Fry DW** (2003) Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res* 284 (1):131-139. doi:S0014482702000952 [pii]
- Fuller SJ**, Sivarajah K, Sugden PH (2008) ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 44 (5):831-854. doi:S0022-2828(08)00343-X [pii] 10.1016/j.yjmcc.2008.02.278
- Gerber HP**, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273 (46):30336-30343
- Graus-Porta D**, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16 (7):1647-1655. doi:10.1093/emboj/16.7.1647
- Graus-Porta D**, Beerli RR, Hynes NE (1995) Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 15 (3):1182-1191
- Grunwald V**, Hidalgo M (2003) Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 95 (12):851-867
- Gschwind A**, Fischer OM, Ullrich A (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4 (5):361-370. doi:10.1038/nrc1360 nrc1360 [pii]
- Guillem JG**, Hsieh LL, O'Toole KM, Forde KA, LoGerfo P, Weinstein IB (1988) Changes in expression of oncogenes and endogenous retroviral-like sequences during colon carcinogenesis. *Cancer Res* 48 (14):3964-3971
- Halliwell B** (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344 (8924):721-724. doi:S0140-6736(94)92211-X [pii]
- Halliwell B**, Clement MV, Ramalingam J, Long LH (2000) Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 50 (4-5):251-257. doi:10.1080/713803727
- Hammerstone JF**, Lazarus SA, Schmitz HH (2000) Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 130 (8S Suppl):2086S-2092S
- Hanahan D**, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1):57-70. doi:S0092-8674(00)81683-9 [pii]
- Harari D**, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1999) Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18 (17):2681-2689. doi:10.1038/sj.onc.1202631

- Harborne** JB (1988) Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Prog Clin Biol Res* 280:17-27
- Harborne** JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (6):481-504. doi:S0031942200002351 [pii]
- Harnly** JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S (2006) Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem* 54 (26):9966-9977. doi:10.1021/jf061478a
- Hayes** JD, Ellis EM, Neal GE, Harrison DJ, Manson MM (1999) Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress. *Biochem Soc Symp* 64:141-168
- Hayes** JD, McMahon M (2001) Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 174 (2):103-113. doi:S0304383501006954 [pii]
- Hazzalin** CA, Mahadevan LC (2002) MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (1):30-40. doi:10.1038/nrm715 nrm715 [pii]
- Hertog** MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1994) Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer* 22 (2):175-184. doi:10.1080/01635589409514342
- Hertog** MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20 (1):21-29. doi:10.1080/01635589309514267
- Hilger** RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25 (6):511-518. doi:10.1159/000068621 68621 [pii]
- Hollman** PC, Katan MB (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37 (9-10):937-942. doi:S0278-6915(99)00079-4 [pii]
- Hou** DX, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M (2004) Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. *J Biomed Biotechnol* 2004 (5):321-325. doi:S1110724304403040 [pii] 10.1155/S1110724304403040
- Hou** Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS (2005) Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res* 65 (17):8049-8056. doi:65/17/8049 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-05-0480
- Howell** AB (2002) Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42 (3 Suppl):273-278. doi:10.1080/10408390209351915
- Hsu** CL, Huang SL, Yen GC (2006) Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54 (12):4191-4197. doi:10.1021/jf0609882

- Hubbard** SR, Miller WT (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19 (2):117-123. doi:S0955-0674(07)00024-5 [pii] 10.1016/j.ceb.2007.02.010
- Ioku** K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J (1995) Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1234 (1):99-104
- Iwai** K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida K, Fujita T (2004) In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J Agric Food Chem* 52 (15):4893-4898. doi:10.1021/jf040048m
- Janmaat** ML, Giaccone G (2003) Small-molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncologist* 8 (6):576-586
- Jorissen** RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284 (1):31-53. doi:S0014482702000988 [pii]
- Joshi** SS, Kuszynski CA, Bagchi D (2001) The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr Pharm Biotechnol* 2 (2):187-200
- Justesen** U, Knuthsen P, Leth T (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 799 (1-2):101-110
- Kang** SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD (2003) Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett* 194 (1):13-19. doi:S0304383502005839 [pii]
- Karamouzis** MV, Badra FA, Papavassiliou AG (2007) Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (5):851-856. doi:S1357-2725(06)00348-7 [pii] 10.1016/j.biocel.2006.11.017
- Karin** M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270 (28):16483-16486
- Karin** M, Hunter T (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5 (7):747-757. doi:S0960-9822(95)00151-5 [pii]
- Kern** M, Fridrich D, Reichert J, Skrbek S, Nussler A, Hofem S, Vatter S, Pahlke G, Rufer C, Marko D (2007) Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol Nutr Food Res* 51 (9):1163-1172. doi:10.1002/mnfr.200700004
- Kern** M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 49 (4):317-328. doi:10.1002/mnfr.200400086

- Knekt** P, Jarvinen R, Seppanen R, Helleovaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146 (3):223-230
- Knox** YM, Hayashi K, Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Shiina R, Tsukui A, Terahara N, Azuma M (2001) Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses. *Acta Virol* 45 (4):209-215
- Kolch** W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2:289-305
- Korpelainen** EI, Alitalo K (1998) Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 10 (2):159-164. doi:S0955-0674(98)80137-3 [pii]
- Kowalczyk** E, Krzesinski P, Kura M, Szmigiel B, Blaszczyk J (2003) Anthocyanins in medicine. *Pol J Pharmacol* 55 (5):699-702
- Krishnan** K, Brenner DE (1996) Chemoprevention of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 25 (4):821-858
- Kuhnau** J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24:117-191
- Kuo** SM (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110 (1-2):41-48. doi:S0304-3835(96)04458-8 [pii]
- Kuo** SM (1997) Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit Rev Oncog* 8 (1):47-69
- Lamy** S, Beaulieu E, Labbe D, Bedard V, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Beliveau R (2008) Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling. *Carcinogenesis* 29 (5):1033-1041. doi:bgn070 [pii] 10.1093/carcin/bgn070
- Lamy** S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, Lafleur R, Durocher Y, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Beliveau R (2006) Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis* 27 (5):989-996. doi:bgi279 [pii] 10.1093/carcin/bgi279
- Lapidot** T, Walker MD, Kanner J (2002) Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem* 50 (11):3156-3160. doi:jf011522g [pii]
- Lee** LT, Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Nair MP, Kanadaswam C, Lee MT (2002) Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res* 22 (3):1615-1627
- Lemmon** MA, Schlessinger J (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141 (7):1117-1134. doi:S0092-8674(10)00665-3 [pii] 10.1016/j.cell.2010.06.011
- Lewis** TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139

- Lien** EJ, Ren S, Bui HH, Wang R (1999) Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* 26 (3-4):285-294. doi:S0891-5849(98)00190-7 [pii]
- Lindl** T, Gstraunthaler G (2008) *Zell- und Gewebekultur*. 6 edn.,
- Löffler** G, Petrides P, Heinrich P (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8.Auflage edn. Springer Medizin Verlag Heidelberg,
- Long** LH, Clement MV, Halliwell B (2000) Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 273 (1):50-53. doi:10.1006/bbrc.2000.2895 S0006-291X(00)92895-X [pii]
- Lozan** J, Kausch H (2003) *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*, vol 1. 3 edn. Parey Buchverlag, Berlin,
- Manach** C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79 (5):727-747
- Manach** C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81 (1 Suppl):230S-242S. doi:81/1/230S [pii]
- Manson** MM (2003) Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med* 9 (1):11-18. doi:S1471491402000023 [pii]
- Mantena** SK, Baliga MS, Katiyar SK (2006) Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27 (8):1682-1691. doi:bgl030 [pii] 10.1093/carcin/bgl030
- Marais** R, Marshall CJ (1996) Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 27:101-125
- Marko** D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G (2004) The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol Nutr Food Res* 48 (4):318-325. doi:10.1002/mnfr.200400034
- Mazza** G (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35 (4):341-371. doi:10.1080/10408399509527704
- McDougall** GJ, Ross HA, Ikeji M, Stewart D (2008) Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. *J Agric Food Chem* 56 (9):3016-3023. doi:10.1021/jf073469n
- McGhie** TK, Walton MC (2007) The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 51 (6):702-713. doi:10.1002/mnfr.200700092
- Meiers** S, Kemeny M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D (2001) The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem* 49 (2):958-962. doi:jf0009100 [pii]

- Mitchell** JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR (1994) Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 113 (3):1008-1014
- Mitsiades** CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, Hideshima T, Chauhan D, Joseph M, Libermann TA, Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Hofmann F, Anderson KC, Kung AL (2004) Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 5 (3):221-230. doi:S1535610804000509 [pii]
- Müller-Esterl** (2004) *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 1. Auflage edn. Spektrum Akademischer Verlag,
- Mutschler** T, Vaupel (2007) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 6. Auflage edn. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart,
- Nemeth** K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42 (1):29-42. doi:10.1007/s00394-003-0397-3
- Ness** AR, Powles JW (1997) Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol* 26 (1):1-13
- Noroozi** M, Angerson WJ, Lean ME (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 67 (6):1210-1218
- Oda** K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005) A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1:2005 0010. doi:msb4100014 [pii] 10.1038/msb4100014
- Olayioye** MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19 (13):3159-3167. doi:10.1093/emboj/19.13.3159
- Olsson** ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD (2004) Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J Agric Food Chem* 52 (24):7264-7271. doi:10.1021/jf030479p
- Osherov** N, Levitzki A (1994) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem* 225 (3):1047-1053
- Pearson** G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22 (2):153-183
- Prenzel** N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8 (1):11-31
- Prior** RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF (2001) Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.)

- using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 49 (3):1270-1276. doi:jf001211q [pii]
- Ranelletti** FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Rumi C, Piantelli M (1992) Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 50 (3):486-492
- Razin** S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (4):1094-1156
- Reade** CA, Ganti AK (2009) EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: potential role of cetuximab. *Biologics* 3:215-224
- Robinson** MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9 (2):180-186. doi:S0955-0674(97)80061-0 [pii]
- Ross** JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34. doi:10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957 111401.144957 [pii]
- Ryan** PD, Goss PE (2008) The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist* 13 (1):16-24. doi:13/1/16 [pii] 10.1634/theoncologist.2007-0199
- Scalbert** A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130 (8S Suppl):2073S-2085S
- Schaeffer** HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19 (4):2435-2444
- Schlessinger** J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103 (2):211-225. doi:S0092-8674(00)00114-8 [pii]
- Schmidt** BM, Howell AB, McEniry B, Knight CT, Seigler D, Erdman JW, Jr., Lila MA (2004) Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *J Agric Food Chem* 52 (21):6433-6442. doi:10.1021/jf049238n
- Schroeter** H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 23 (5):861-880. doi:S0197458002000751 [pii]
- Schulze** WX, Deng L, Mann M (2005) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1:2005 0008. doi:msb4100012 [pii] 10.1038/msb4100012
- Sebastian** S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A (2006) The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta* 1766 (1):120-139. doi:S0304-419X(06)00032-1 [pii] 10.1016/j.bbcan.2006.06.001
- Seeram** NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* 54 (25):9329-9339. doi:10.1021/jf061750g

- Seeram NP, Nair MG (2002)** Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *J Agric Food Chem* 50 (19):5308-5312. doi:jf025671q [pii]
- Shaikh M, Martini S, Quiney JR, Baskerville P, La Ville AE, Browse NL, Duffield R, Turner PR, Lewis B (1988)** Modified plasma-derived lipoproteins in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 69 (2-3):165-172
- Shimizu M, Deguchi A, Joe AK, McKoy JF, Moriwaki H, Weinstein IB (2005)** EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 5 (1):69-78
- Shin SY, Rath O, Choo SM, Fee F, McFerran B, Kolch W, Cho KH (2009)** Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci* 122 (Pt 3):425-435. doi:122/3/425 [pii] 10.1242/jcs.036319
- Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS (1998)** Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 64 (4):353-356. doi:10.1055/s-2006-957450
- Singer E, Landgraf R, Horan T, Slamon D, Eisenberg D (2001)** Identification of a heregulin binding site in HER3 extracellular domain. *J Biol Chem* 276 (47):44266-44274. doi:10.1074/jbc.M105428200 M105428200 [pii]
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990)** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82 (13):1107-1112
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987)** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (4785):177-182
- Statistik-Austria**
http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/.
 abgerufen am 20.09.2011
- Teillet F, Boumendjel A, Boutonnat J, Ronot X (2008)** Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med Res Rev* 28 (5):715-745. doi:10.1002/med.20122
- Teller N, Thiele W, Boettler U, Sleeman J, Marko D (2009a)** Delphinidin inhibits a broad spectrum of receptor tyrosine kinases of the ErbB and VEGFR family. *Mol Nutr Food Res* 53 (9):1075-1083. doi:10.1002/mnfr.200800524
- Teller N, Thiele W, Marczylo TH, Gescher AJ, Boettler U, Sleeman J, Marko D (2009b)** Suppression of the kinase activity of receptor tyrosine kinases by anthocyanin-rich mixtures extracted from bilberries and grapes. *J Agric Food Chem* 57 (8):3094-3101. doi:10.1021/jf803094a

- Thiele** W, Sleeman JP (2006) Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J Biotechnol* 124 (1):224-241. doi:S0168-1656(06)00037-X [pii] 10.1016/j.jbiotec.2006.01.007
- Thomasset** S, Berry DP, Cai H, West K, Marczylo TH, Marsden D, Brown K, Dennison A, Garcea G, Miller A, Hemingway D, Steward WP, Gescher AJ (2009) Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 2 (7):625-633. doi:2/7/625 [pii] 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0201
- Tzahar** E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16 (10):5276-5287
- Wang** H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL (1999) Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod* 62 (2):294-296. doi:10.1021/np980501m np980501m [pii]
- Wang** LS, Stoner GD (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* 269 (2):281-290. doi:S0304-3835(08)00396-0 [pii] 10.1016/j.canlet.2008.05.020
- Warner** TD, Mitchell JA (2002) Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21):13371-13373. doi:10.1073/pnas.222543099 222543099 [pii]
- Watzl** B, Rechkemmer G (2001) Validity of dietary assessment. *Am J Clin Nutr* 74 (2):273-274
- Watzl** GR (2001) Phenolsäuren. *Ernährungsumschau* Heft 10, 48
- Weinstein** (1988) The origin of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications of cancer prevention and treatment. *Cancer research*:48
- Wells** A (1999) EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31 (6):637-643. doi:S1357272599000151 [pii]
- Wilkinson** MG, Millar JB (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14 (14):2147-2157. doi:10.1096/fj.00-0102rev 14/14/2147 [pii]
- Williams** CA, Grayer RJ (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 21 (4):539-573. doi:10.1039/b311404j
- Wingens** M, Jacobs-Oomen S, van der Woning SP, Stortelers C, van Zoelen EJ (2006) Epidermal growth factor mutant with wild-type affinity for both ErbB1 and ErbB3. *Biochemistry* 45 (14):4703-4710. doi:10.1021/bi060087m
- Yang** CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21:381-406. doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.381 21/1/381 [pii]

- Yarden Y**, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2):127-137. doi:10.1038/35052073
- Yarden Y**, Ullrich A (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57:443-478. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002303
- Yi W**, Fischer J, Krewer G, Akoh CC (2005) Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J Agric Food Chem* 53 (18):7320-7329. doi:10.1021/jf051333o
- Zhou Y**, Brattain MG (2005) Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis. *Cancer Res* 65 (13):5848-5856. doi:65/13/5848 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-04-3509

8 Curriculum Vitae

Angaben zur Person:

Nachname/Vorname:	Brunner Melanie-Andrea
Wohnort:	Troststraße 54-56/T21 1100 Wien
Staatsangehörigkeit:	Österreich
Geburtsdatum:	04.10.1987
Geburtsort:	Wien
Familienstand:	ledig
Religionsbekenntnis:	römisch-katholisch

Schulbildung:

16.06.2006	Allgemeine Hochschulreife Abschluss der Matura mit Fachbereichsarbeit in Psychologie mit dem Thema: „Wissenschaftliche Erkenntnisse im Bereich des psychischen Phänomens Stottern“
09/1998 - 06/2006	Theresianische Akademie Favoritenstraße 15, 1040 Wien
09/1994 – 06/1998	Volksschule in Mistelbach Bahnzeile 1, 2130 Mistelbach

Studium:

01.03.11 – 31.01.12	Diplomarbeit an der Universität Wien am Institut Lebensmittelchemie und Toxikologie mit dem Thema „Identifizierung von bioaktiven Verbindungen eines anthocyanreichen Heidelbeerextraktes“
13.11.2008	Abschluss des ersten Abschnittes
seit 01.10.06	Diplomstudium Pharmazie an der Universität Wien

9 Anhang

Tabelle 8: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch AF

EGFR	DMSO	100	200	AAF	200 HBE	1 μ M Tyr
P22 I	100	92,7842	138,8405	n.d.		129,1501
P22 II	100	92,7363	113,4845	n.d.		n.d.
P23 I	100			n.d.		241,8750
P23 II	100	96,5947	119,5003	n.d.		n.d.
P24 I	100	104,2290	131,1932	145,1473	117,8454	163,6532
P24 II	100	84,0470	76,3186		47,6885	n.d.
P25 I	100		159,2288	145,8542	139,2983	156,8425
P25 II	100	108,4422	109,5349	152,6444	149,2429	n.d.
$\bar{x}$	100	96,4722	122,5107	147,8819	113,5187	172,8802
σ	0	8,7796	12,2572	4,1395	45,8008	48,3561

pEGFR	DMSO	100	200	AAF	200 HBE	1 μ M Tyr
P22 I	100	98,4987	94,9039	n.d.		10,6763
P22 II	100	75,5570	113,7836	n.d.		n.d.
P23 I	100	49,8182	53,2932	n.d.		9,5224
P23 II	100	113,9046	122,6669	n.d.		n.d.
P24 I	100	68,95080	46,9137	32,4124	23,2400	3,9370
P24 II	100	95,0474	84,1426	84,8129	45,1152	n.d.
P25 I	100	79,44028	63,6833	67,7015	55,6940	7,0032
P25 II	100					
$\bar{x}$	100	83,0310	82,7696	61,6423	41,3497	7,7847
σ	0	21,2404	29,5002	26,7206	16,5514	2,9887

Tabelle 9: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch FF

EGFR	DMSO	100	200	AFF	200 HBE	1 μ M Tyr
P26 I	100	178,0433	128,3289	111,0938	183,3800	185,6915
P26 II	100	71,4070	61,8078	66,0292	78,4261	
P27 I	100	214,0297	133,7265			
P27 II	100	119,7134	63,3355	74,2646	88,5794	
P28 I	100	147,3454	126,7899	91,7522	103,2430	163,6547
P28 II	100	128,8253	97,2886	82,8927	76,3564	185,6915
$\bar{x}$	100	143,2273	101,8795	85,2065	85,2065	105,9970
σ	0	49,3165	33,0054	17,3627	17,3627	44,5472

pEGFR	DMSO	100	200	AFF	200 HBE	1 μ M Tyr
P26 I	100	49,5920	38,1868	27,3010	53,9027	3,1167
P26 II	100	62,0446	44,8018		52,8616	n.d.
P27 I	100	24,7004		37,4115	37,6353	0,4340
P27 II	100	81,3029	62,9501	29,9740	60,0879	n.d.
P28 I	100	39,3106	38,9982	30,8355	31,8436	2,2744
P28 II	100	97,7351			125,7000	n.d.
$\bar{x}$	100	59,1142	46,2342	31,3805	60,3385	1,9417
σ	0	27,0542	11,5267	4,2930	33,7547	1,3719

Tabelle 10: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch PF

EGFR	DMSO	100	200	APF	200 HBE	1 μ M Tyr
P29 I	100	121,9459	92,3944	118,7915	113,1832	177,4306
P29 II	100	91,2953	70,3679	58,6777	61,5246	n.d.
P30 I	100	107,4893	87,6779	87,3306	86,4811	n.d.
P30 II	100	91,8491	83,6055	60,4205	49,0920	n.d.
P31 I	100	124,7533		105,9273	78,4582	n.d.
P31 II	100	99,9800	99,6276	74,5329	53,7297	n.d.
$\bar{x}$	100	106,2188	86,7347	84,2801	73,7448	177,4306
σ	0	14,5644	10,9180	24,4488	24,0728	0

pEGFR	DMSO	100	200	APF	200 HBE	1 μ M Tyr
P29 I	100	68,0639		52,2345	36,2037	4,1059
P29 II	100	85,8248	103,0076	59,3622	60,3519	n.d.
P30 I	100	92,7494	73,7422	61,3325	66,9104	n.d.
P30 II	100	84,2395	88,1481	54,4748	43,9830	n.d.
P31 I	100	73,1243	87,3622	52,88116		n.d.
P31 II	100	101,9943	89,60172	57,3173	38,8470	n.d.
$\bar{x}$	100	84,3327	88,3732	52,2671	49,2592	4,105889
σ	0	12,4524	10,3779	3,6682	13,6135	0

Tabelle 11: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch CF

EGFR	DMSO	100	200	CF	200 HBE	CGA	1 μ M Tyr
P32 I	100	112,4011	68,4685	79,8421	92,6695	n.d.	137,2257
P32 II	100	120,0767	84,9418	81,8408	83,3233	n.d.	
P32 III	100	120,2358	96,6625	71,5381	55,8216	n.d.	
P33 I	100	98,4253	103,5764	84,3237	123,9970	n.d.	182,4835
P33 II	100			99,5571	101,9292	n.d.	
P33 III	100	104,6755	94,9390	101,5979	47,3953	n.d.	
P11 I	100			n.d.	188,9123	90,5531	184,9997
P11 III	100	96,6646	86,8796	n.d.	102,3937	89,9008	116,6943
P12 I	100	89,0525	90,9821	n.d.	81,4014	92,9468	103,2636
P12 II	100	112,4448	97,2662	n.d.	85,2065	91,5714	115,6952
P12 III	100	78,6685	64,2054	n.d.	58,9760	73,8661	130,6584
$\bar{x}$	100	103,6272	83,5468	86,4500	92,9114	87,7676	138,7172
σ	0	14,2002	13,3088	11,7733	39,0340	7,8558	32,6515

pEGFR	DMSO	100	200	CF	200 HBE	CGA	1 μ M Tyr
P32 I	100	126,8493	93,9377	72,8887	62,5514	n.d.	14,6594
P32 II	100	145,6972	141,7891	89,5479		n.d.	
P32 III	100	128,0165	82,5848	49,1214	40,3221	n.d.	
P33 I	100	98,1679	90,1068	60,9977	80,8174	n.d.	13,7092
P33 II	100	125,8723				n.d.	
P33 III	100	71,7227	71,6243	42,7988	32,1017	n.d.	
P11 I	100	80,2802	64,2146	n.d.	75,1205	100,4797	3,5493
P11 III	100	97,9185	83,5439	n.d.	70,7023	119,5000	2,0629
P12 I	100	136,7478	118,3681	n.d.	63,1137	122,5985	6,6667
P12 II	100	138,9035	125,9611	n.d.	58,6744	135,4804	4,3247
P12 III	100	118,2123	114,3676	n.d.	63,5702	127,3347	4,8656
$\bar{x}$	100	115,3080	98,6528	63,0709	60,7749	121,0787	7,1197
σ	0	24,6525	25,2545	18,7568	15,6819	12,9968	5,0280

Tabelle 12: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch CFp

EGFR	DMSO	50	100	200	200 HBE	1 μ M Tyr
P13 II	100	116,6721	138,3164	116,4591	109,3081	135,7696
P13 III	100		143,9372	140,6456	120,3309	148,8644
P16 I	100	126,3208	76,2441	148,0352	186,8538	245,6580
P16 II	100	108,1285	76,0396	108,9697	105,6023	232,0955
P16 III	100	108,5832	97,7110	125,2833	144,1609	229,8808
$\bar{x}$	100	114,9261	106,4500	127,8786	133,2512	198,4537
σ	0	8,5504	29,4426	14,5875	29,9898	46,3380

pEGFR	DMSO	50	100	200	200 HBE	1 μ M Tyr
P13 II	100	80,7846	91,4186	106,7521	63,1633	2,5057
P13 III	100	102,8908	117,0244	107,5093	65,6058	6,1690
P16 I	100	76,1015	65,2820	91,7108	40,3480	2,7461
P16 II	100	159,2900	122,7422			5,7339
P16 III	100	135,9763	124,2753	119,0957	69,8037	6,2166
$\bar{x}$	100	111,0087	104,1485	106,2670	59,7302	4,6742
σ	0	35,8900	25,4424	11,2285	11,4395	1,6827

Tabelle 13: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch CFu

EGFR	DMSO	50	100	200	200 HBE	1 μ M Tyr
P14	100	80,1527	71,1451	93,0581	97,6847	148,8745
P16	100	94,6981	115,3211	101,3363	94,6158	133,7232
P18	100	132,7731	112,8096		141,4554	
P20	100	64,7186	86,4406	104,9963	97,7508	126,1605
$\bar{x}$	100	93,0856	96,4291	99,7969	107,8767	136,2527
σ	0	29,1527	21,3251	6,1162	22,4335	11,5664

pEGFR	DMSO	50	100	200	200 HBE	1 μ M Tyr
P14	100	88,3573	80,6338	88,1454	42,2416	3,5456
P16	100	92,9354	119,7817	130,1137	89,1405	9,3654
P18	100	135,8379	56,0305	50,1539	33,3872	0,2899
P20	100	71,0420	94,2411	140,5484	63,7491	4,5873
$\bar{x}$	100	97,0431	87,6718	102,2403	57,1296	4,4471
σ	0	27,5282	26,6139	41,4572	24,8587	3,7552

Tabelle 14: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch Cy

EGFR	DMSO	1 μ M Cy	10 μ M Cy	50 μ M Cy	100 μ M Cy	200 μ M Cy	1 μ M Tyr
P19	100	130,6517	131,5740	160,7821		138,8564	183,6464
P23	100	79,9918	105,3545	85,8578	84,9116	99,5394	160,8746
P21	100	94,5828	93,1096	81,3424	92,2281	108,2968	143,8502
P25	100	109,0967	114,8888	92,1921	88,7389	90,3193	134,3369
$\bar{x}$	100	103,5807	111,2317	1053,0436	88,6262	109,2530	155,6770
σ	0	21,6076	16,2289	37,4245	3,6595	21,0564	21,6377

EGFR	DMSO	1 μ M Cy	10 μ M Cy	50 μ M Cy	100 μ M Cy	200 μ M Cy	1 μ M Tyr
P19	100	87,6598	101,0192	86,6933	58,3930	45,8902	3,1553
P23	100	108,8435	77,1458	91,6781	86,8743	78,3174	1,3072
P21	100	109,9194	115,2677	90,5366			11,6200
P25	100	134,7308	127,5159		79,1473	50,9975	6,3299
	100	110,2884	105,2372	89,6360	74,8049	58,4017	5,6031
σ	0	19,2502	21,6323	2,6116	14,7289	17,4355	4,5159

Tabelle 15: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch Cy-3-Glc

EGFR	DMSO	10 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M	1 μ M Tyr
P33 I	100	120,5832	101,8334	74,9737	83,6873	111,0658
P33 II	100	110,1414	96,4209	109,2485	101,2102	115,8391
P33 III	100	84,3146	90,0679	74,3254	89,2188	
P11	100	89,7808	92,8871	100,8795	98,2530	
P12	100	102,1999	82,3739	82,5795	72,4757	138,1472
P16	100	66,0345		90,1683	74,5762	108,6817
P17	100	111,4413		119,9640	72,3130	139,2746
P13 I	100	77,4802	93,4982	92,6964	91,1951	146,6968
P13 II	100	90,4916	89,4194		84,9633	157,8313
$\bar{x}$	100	94,7186	92,3573	93,1044	85,3214	131,0766
σ	0	17,7232	6,0750	16,2281	10,7346	19,1970

pEGFR	DMSO	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	1 µM Tyr
P33 I	100	112,8720	107,9032	97,7877	116,2779	6,7882
P33 II	100					11,8552
P33 III	100	107,2148	138,5481	109,8456	127,5002	15,4391
P11	100	108,6212	102,5348	95,7342	117,5371	1,9865
P12	100	116,2960	103,4683	94,3061	105,3529	8,7858
P16	100	87,1143	106,1899	116,6399	89,5706	4,0400
P17	100	98,2705	108,4839	104,6772	97,4742	9,0153
P13 I	100	87,6321	71,9893	89,0798	78,9313	13,0803
P13 II	100	100,2761				19,7476
$\bar{x}$	100	102,2871	105,5882	101,1529	104,6635	10,0820
σ	0	10,9404	19,3355	9,6709	17,1476	5,5900

Tabelle 16: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch CGA

EGFR	DMSO	0,1 µM CGA	1 µM CGA	10 µM CGA	30 µM CGA	100 µM CGA	300 µM CGA	1 µM Tyr
P13 I	100	81,1582	108,1571		n.d.		n.d.	135,0626
P13 II	100	107,6033	89,5473	97,4320	n.d.	106,3634	n.d.	93,5068
P 13 III	100	89,5012	77,6779	93,1764	n.d.	72,7399	n.d.	84,5312
P22	100	n.d.	n.d.		109,5793	92,8736	110,9215	181,7526
P26	100	n.d.	n.d.	78,2968	85,3026	80,5224	72,9943	109,3235
P23	100	n.d.	n.d.	93,4574	96,5861	108,5131	114,7305	144,8819
P27	100	n.d.	n.d.	117,1973	158,0930	110,6358	91,3882	166,9551
$\bar{x}$	100	92,7542	91,7941	95,9120	112,3902	95,2747	97,5086	130,8591
σ	0	13,5193	15,3633	13,9569	32,0424	15,9084	19,2779	36,7710

pEGFR	DMSO	0,1 µM CGA	1 µM CGA	10 µM CGA	30 µM CGA	100 µM CGA	300 µM CGA	1 µM Tyr
P13 I	100	70,6291	84,8934		n.d.	59,7140	n.d.	3,7631
P13 II	100	107,4035	125,1355	149,4503	n.d.	160,1212	n.d.	5,8515
P 13 III	100	117,3460	109,2932	112,7025	n.d.	133,6539	n.d.	8,0354
P22	100	n.d.	n.d.	102,7085	147,2854	95,7540	119,8436	12,4577
P26	100	n.d.	n.d.	126,1204	101,8769	126,9414	176,2149	
P23	100	n.d.	n.d.	181,5999	190,2957	162,4255	115,5471	5,8893
P27	100	n.d.	n.d.	109,1964	135,8182	65,2123	221,8062	9,8585
$\bar{x}$	100	98,4596	108,6393	130,2963	143,8190	114,8318	158,3529	7,6426
σ	0	24,6092	18,0693	30,1072	36,4932	42,1925	50,5328	3,1490

Tabelle 17: Daten zur Modulation des EGF-Rezeptors durch AF, FF, Cy in Coinkubation mit 30 μ M CGA

EGFR	DMSO	FF	FF + CGA	AF	AF + CGA	Cy	Cy + CGA	CGA	1 μ M Tyr
P29 I	100	101,9485	111,0781	96,4691	84,6623	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P29 II	100	112,7006	117,0412	137,3910	102,9056	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P31 I	100			86,2801	78,7799	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P31 II	100		116,5796	119,5435	92,7430	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P26 I	100	128,3289	n.d.	138,8406	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P26 II	100	61,8078	n.d.	113,4845	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P27 I	100	133,7265	n.d.	119,5003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P27 II	100	63,3355	n.d.	131,1932	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P28 I	100	126,7899	n.d.	109,5349	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P28 II	100	97,2886	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 32 I	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	99,1940	108,9844	107,0450	132,8649
P32 II	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	107,2717	132,0710	120,0092	139,3483
P34 I	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	83,5249	98,8034	127,0740	97,2037
P34 II	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	112,0596	87,7907	118,1146	94,2419
P23	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	99,5393	n.d.	109,5793	n.d.
P21	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	108,2968	n.d.	85,3026	n.d.
P25	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	90,3193	n.d.	96,5861	n.d.
$\bar{x}$	100	103,2408	114,8997	116,9152	89,7727	100,0294	106,9124	109,1015	115,9147
σ	0	28,1553	3,3176	17,8193	10,4603	10,2725	18,8737	14,4378	23,4965

pEGFR	DMSO	FF	FF + CGA	AF	AF + CGA	Cy	Cy + CGA	CGA	1 μ M Tyr
P29 I	100	57,0602	60,3128	72,3694		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P29 II	100	61,6546	61,0648	72,3299	96,0819	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P31 I	100		67,2968		80,1461	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P31 II	100		50,8400	76,5300	81,3036	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P26 I	100	38,1868	n.d.	94,9039	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P26 II	100	44,8018	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P27 I	100		n.d.	53,2932	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P27 II	100	62,9501	n.d.	46,9137	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P28 I	100	38,9982	n.d.	84,1426	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P28 II	100	n.d.	n.d.	63,6833	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 32 I	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		96,4705	141,6760	
P32 II	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	76,7840	102,6433	132,2858	72,7037
P34 I	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	70,5554	73,7919	117,8105	70,5554
P34 II	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	94,5195	76,4364		83,2915
P23	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	78,3174		147,2854	50,7186
P21	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45,8903		101,8769	64,5612
P25	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50,9975		135,8182	48,7217
$\bar{x}$	100	50,6086	59,8786	70,5208	85,8439	69,5107	87,3355	129,4588	4,7229
σ	0	11,3029	6,7902	15,6922	8,8853	18,2080	14,3760	16,8043	4,0035

Tabelle 18: Mittelwerte der Absorptionen aus den SRB-Assays nach Inkubation mit AF. Die Mittelwerte sind Ausreißer-bereinigt und berechnet als T/C in %.

	DMSO 1	DMSO 2	50	100	200	500	AAF	HBE
P22 I	106,121	93,879	94,784	99,652	77,805	64,365	n.d.	n.d.
P22 II	100,466	99,534	89,031	86,731	77,911	49,848	n.d.	n.d.
P24 I	101,076	98,924	n.d.	103,909	90,372	n.d.	60,175	49,692
P24 II	100,684	99,316	n.d.	107,963	93,026	n.d.	59,859	52,579
P26 I	96,488	103,512	n.d.	95,935	80,832	n.d.	58,948	
P26 II	93,044	106,956	n.d.	86,340	84,755	n.d.	56,477	
P21	107,205	92,795	101,252	94,605	81,933	n.d.	n.d.	95,749
P25	106,514	93,486	110,939	99,960	74,945	n.d.	n.d.	94,694
$\bar{x}$	101,450	98,550	99,002	96,887	82,697	57,107	58,865	51,135
σ	5,037	5,037	9,395	7,649	6,334	10,266	1,675	2,042

Tabelle 19: Mittelwerte der Absorptionen aus den SRB-Assays nach Inkubation mit FF. Die Mittelwerte sind Ausreißer-bereinigt und berechnet als T/C in %.

	DMSO 1	DMSO 2	100	200	AAF	HBE
P24 I	96,323	103,677	122,612	100,346	94,456	68,421
P24 II	98,051	101,949	100,390	87,990	67,929	51,615
P26 I	113,793	86,207	108,075	85,253	85,620	72,529
P26 II	104,797	95,203	89,290	78,632	67,887	72,891
P28 I	94,516	105,484	96,690	103,644	111,336	91,753
P28 II	97,986	102,014	98,085	95,788	103,462	84,902
$\bar{x}$	100,911	99,089	102,524	91,942	88,448	73,685
σ	7,207	7,207	11,557	9,590	18,095	13,922

Tabelle 20: Mittelwerte der Absorptionen aus den SRB-Assays nach Inkubation mit PF. Die Mittelwerte sind Ausreißer-bereinigt und berechnet als T/C in %.

	DMSO 1	DMSO 2	100	200	APF	HBE
P30 I	99,922	100,078	69,126	56,506	54,836	43,085
P30 II	95,723	104,277	80,616	83,592	76,608	56,324
P12 I	96,765	103,235	89,016	91,195	88,019	80,620
P12 II	100,876	99,124	103,413	101,278	106,709	83,690
P20 I	104,389	95,611	117,796	91,802	90,892	73,879
P20 II	112,221	87,779	108,604	90,823	86,371	81,972
$\bar{x}$	101,649	98,351	94,768	85,866	83,906	69,928
σ	6,030	6,030	18,376	15,446	17,263	16,553

Tabelle 21: Mittelwerte der Absorptionen aus den SRB-Assays nach Inkubation mit CF. Die Mittelwerte sind Ausreißer-bereinigt und berechnet als T/C in %.

	DMSO 1	DMSO 2	100	200	CF	HBE
P30 I	96,328	103,672	91,399	68,773	61,336	46,988
P30 II	100,950	99,050	92,067	75,704	66,019	74,561
P12 I	101,464	98,536	103,387	99,781	88,581	86,643
P12 II	100,124	99,876	106,522	110,997	107,902	
P29 I	102,590	97,410	120,275	115,386	106,667	
P29 II	106,313	93,687	126,763	110,885	119,698	53,165
$\bar{x}$	101,295	98,705	106,736	96,921	91,565	65,339
σ	3,257	3,257	14,464	19,923	23,816	18,474

Tabelle 22: Mittelwerte der Absorptionen aus den SRB-Assays nach Inkubation mit CFp. Die Mittelwerte sind Ausreißer-bereinigt und berechnet als T/C in %.

	DMSO 1	DMSO 2	50	100	200	HBE
P20 I	99,802	100,198	103,852	107,871	129,745	
P20 II	98,233	101,767	107,428	109,901	127,089	
P12	111,910	88,090	96,418	76,288	79,832	56,675
P16	100,471	99,529	103,081	93,222	88,460	81,127
P15	106,129	93,871	113,601	113,562	97,725	55,308
P19	112,616	87,384	102,692	102,622	87,480	70,539
$\bar{x}$	104,860	95,140	104,512	100,578	101,722	65,912
σ	6,328	6,328	5,700	13,835	21,460	12,257

Tabelle 23: Mittelwerte der Absorptionen aus den SRB-Assays nach Inkubation mit CFu. Die Mittelwerte sind Ausreißer-bereinigt und berechnet als T/C in %.

	DMSO 1	DMSO 2	50	100	200	HBE
P12	114,168	85,832	102,028	95,257	75,712	70,887
P16	107,864	92,136	94,948	94,690	76,040	79,058
P15	113,509	86,491	111,368	104,359	95,271	76,947
P19	111,363	88,637		107,648	105,135	47,911
P21	104,540	95,460	116,433	116,505	100,105	
P25	104,503	95,497	101,023	100,242	86,306	88,117
$\bar{x}$	109,324	90,676	105,160	103,117	89,761	72,584
σ	4,322	4,322	8,615	8,275	12,420	15,115