

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Department für Lebensmittel und Ernährung  
Lehrstuhl für Biofunktionalität der  
Lebensmittel

**Charakterisierung des  
darmkrebspräventiven Potenzials von Apfelsaft  
und polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen  
*in vitro* und *in vivo***

Diplom-Oecotrophologin  
**Lydia Pan**

Vollständige Vorlage der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael Schemann  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rechkemmer  
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Veronika Somoza

Die Dissertation wurde am 27.09.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt am 02.04.2007 angenommen.

*MEINEN ELTERN UND SVEN*

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren, Prof. Dr. Helmut Bartsch, in der Arbeitsgruppe Chemoprävention, Dr. Clarissa Gerhäuser, angefertigt.

Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert. Förderkennzeichen 01 EA 0106.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Der Apfel und sein Saft .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	„An apple a day...“ – Der gesundheitliche Nutzen des Apfels.....	2
1.1.2	Polyphenolische Inhaltsstoffe des Apfels.....	3
<b>1.2</b>	<b>Chemoprävention .....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Der Prozess der Karzinogenese .....	6
1.2.2	Angriffspunkte der Chemoprävention .....	8
<b>1.3</b>	<b>Darmkrebs.....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms .....	10
1.3.2	Das Mehrstufen-Modell der Kolonkarzinogenese.....	11
<b>1.4</b>	<b>Tiermodell zur genetisch induzierten Karzinogenese im Darm – die <i>Apc<sup>Min/+</sup></i> Maus .....</b>	<b>15</b>
1.4.1	Etablierung und Charakterisierung des <i>Apc<sup>Min/+</sup></i> Maus Modells .....	15
1.4.2	APC – Adenomatöse Polyposis Coli .....	16
1.4.3	Der Wnt/ $\beta$ -Catenin/TCF-Signalweg.....	17
1.4.4	Vergleich zur chemisch induzierten Kolonkarzinogenese – Vor- und Nachteile .....	20
1.4.5	Verbindungen mit protektivem Potenzial in der <i>Apc<sup>Min/+</sup></i> Maus.....	21
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Herstellung und Analytik der Testsubstanzen.....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Polyphenolreiche Extrakte.....	24
2.1.2	Fraktionierungen.....	26
2.1.3	Trüber Apfelsaft .....	31
2.1.4	Reinsubstanzen .....	31
<b>2.2</b>	<b>Testbatterie zum chemopräventiven Screening im Rahmen der „activity-guided fractionation“ .....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Hemmung der Cytochrom P450 1A-Aktivität (betreut durch K. Klimó) .....	33
2.2.2	Induktion der NAD(P)H:Chinonreduktase (betreut durch Dr. C. Gerhäuser) .....	34
2.2.3	Abfangen von 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl Radikalen (betreut durch K. Klimó) .....	35
2.2.4	Abfangen von Superoxidanion-Radikalen gebildet durch Hypoxanthin/Xanthinoxidase (betreut durch K. Klimó) .....	36
2.2.5	Messung der “Oxygen (Peroxy) Radical Absorbance Capacity” (betreut durch R. Niewöhner).....	37

2.2.6	Hemmung der Aromatase (Cytochrom P450 19) (betreut durch K. Klimó)	38
2.2.7	Hemmung der Cyclooxygenase-1-Aktivität (betreut durch J. Knauff)	39
<b>2.3</b>	<b>Zellkulturexperimente</b>	<b>39</b>
2.3.1	Kultivierung	40
2.3.2	Proliferationshemmung	40
2.3.3	Auswertung	41
<b>2.4</b>	<b>Western Blot</b>	<b>41</b>
2.4.1	Durchführung	43
2.4.2	Auswertung	44
<b>2.5</b>	<b><i>Apc</i><sup>Min/+</sup> Maus Interventionsversuch</b>	<b>44</b>
2.5.1	Tiere und Haltungsbedingungen	44
2.5.2	Intervention	45
2.5.3	Sektion und Präparation des Darms	47
2.5.4	Bestimmung der Tumorzahl	47
2.5.5	Verarbeitung des Gewebes für Genexpressionsanalysen	48
2.5.6	Verarbeitung des Gewebes für immunhistochemische Untersuchungen	48
2.5.7	Bestimmung des Hämatokrit	48
2.5.8	Statistische Auswertung	49
<b>2.6</b>	<b>Genotypisierung</b>	<b>49</b>
2.6.1	DNA-Isolierung	50
2.6.2	Qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	51
<b>2.7</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>52</b>
2.7.1	Anfertigung der Paraffinschnitte und HE-Färbung	53
2.7.2	Immunhistochemische Färbung	53
2.7.3	Auswertung	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der im Projekt verwendeten polyphenolreichen Apfelsaftextrakte</b>	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>Identifikation und Charakterisierung aktiver polyphenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe im Rahmen der „activity-guided fractionation“ am Beispiel des Extraktes AS03B</b>	<b>59</b>
3.2.1	AS03B und frühe Sephadex-Fractionen	60
3.2.2	B 3 und CPC-Subfraktionen B 3.1 bis B 3.9	61
3.2.3	B 4 und CPC-Subfraktionen B 4.1 bis B 4.5	63
3.2.4	B 5 und CPC-Subfraktionen B 5.1 bis B 5.9	64
3.2.5	B 6 und CPC-Subfraktionen B 6.1 bis B 6.10	66
3.2.6	B 7 und CPC-Subfraktionen B 7.2 bis B 7.18	67
3.2.7	Aktivitäten identifizierter und isolierter Reinsubstanzen	70

<b>3.3</b>	<b>Weiterführende <i>in vitro</i> Untersuchungen an humanen Kolonkarzinomzelllinien</b> .....	<b>75</b>
3.3.1	Antiproliferative Wirkung .....	76
3.3.2	Induktion von Apoptose .....	80
<b>3.4</b>	<b>Wirkung von Apfeltrübsaft und polyphenolreichem Apfelextrakt auf die genetisch induzierte Karzinogenese im Darm von <i>Apc</i><sup>Min/+</sup> Mäusen</b> .....	<b>82</b>
3.4.1	Flüssigkeits- und Futteraufnahme sowie Entwicklung des Körpergewichtes im Verlauf der Intervention .....	85
3.4.2	Energiebilanz und tägliche Polyphenoldosis .....	86
3.4.3	Einfluss der Interventionen auf die Tumorentstehung im Darm .....	88
3.4.4	Beeinflussung von Hämatokrit und Milzgewicht .....	93
3.4.5	Histopathologische Befunde .....	94
<b>3.5</b>	<b>Einfluss der Interventionen auf die Expression kolonkrebssrelevanter Proteine im Darm</b> .....	<b>97</b>
3.5.1	Beeinflussung der PCNA Expression als Marker für die Proliferation .....	97
3.5.2	Beeinflussung der $\beta$ -Catenin Expression .....	100
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Polyphenolische Inhaltsstoffe des Apfelsaftes</b> .....	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>Chemopräventive Aktivitäten polyphenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe <i>in vitro</i> und Relevanz für die Darmkrebsprävention <i>in vivo</i></b> .....	<b>104</b>
4.2.1	Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus .....	105
4.2.2	Antioxidanzien und Radikalfängereigenschaften .....	109
4.2.3	Hemmung der Tumorpromotion .....	113
4.2.4	Proliferationshemmung und Induktion von Apoptose .....	116
4.2.5	Bioverfügbarkeit – Studien am Tier .....	120
<b>4.3</b>	<b>Krebsprävention durch Apfelsaft und Apfelpolyphenole <i>in vivo</i></b> .....	<b>121</b>
4.3.1	Vergleich zu weiteren Interventionen mit der <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> Maus .....	122
4.3.2	Hemmung der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese durch Apfelsaft und polyphenolische Apfelinhaltsstoffe .....	125
4.3.3	Einfluss von Apfelpolyphenolen auf weitere Tumorarten .....	127
<b>4.4</b>	<b>Relevanz der Ergebnisse für den Menschen</b> .....	<b>128</b>
4.4.1	Gegenüberstellung der Kolonkarzinogenese in Tier und Mensch .....	128
4.4.2	Bioverfügbarkeit - Studien am Menschen .....	130
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b> .....	<b>132</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>136</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAPH	2,2-Azobis-(2-aminopropan) dihydrochlorid
ABC	Avidin Biotin Komplex ( <i>avidin biotin complex</i> )
ACF	Aberrante Krypt Foci ( <i>aberrant crypt foci</i> )
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
AOM	Azoxymethan
APC	Adenomatöse Poliposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Aromatase
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Konzentration zur Verdopplung der Enzymaktivität
CEC	3-Cyano-7-ethoxycumarin
Cox	Cyclooxygenase
CPC	Zentrifugalverteilungschromatographie ( <i>centrifugal partition chromatography</i> )
Cyp	Cytochrom P450
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetra-hydrochlorid
DAD	Dioden-Array-Detektor
DBF	<i>o</i> -Benzyl-fluorescein-benzyl-ester
DCC	<i>deleted in colon cancer</i>
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthrazen
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DPC	<i>deleted in pancreatic cancer</i>
DPPH	1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetat</i> )
EGCG	Epigallocatechin-gallat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	EGF-Rezeptor
ENU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff ( <i>N-ethyl-N-nitrosurea</i> )
ERK	Exogen-regulierte Protein-Kinase ( <i>extracellular-signal regulated kinase</i> )
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FAP	Familiäre Adenomatöse Poliposis Coli
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Gramm
GBP	<i>GSK-3β binding protein</i>
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
H/XO	Hypoxanthin/Xanthinoxidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Hemmkonzentration
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
K-RAS	Kirsten-RAS ( <i>rous avian sarcoma homologue</i> )
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LOH	Verlust der Heterozygotie ( <i>loss of heterozygosity</i> )
LPH	Laktase Phloridzin Hydrolase
LRP	<i>low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOM	<i>Mouse on mouse</i>
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n	Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Experimente
NAD(P)H	$\beta$ -Nikotinamid-adenin-dinukleotid (phosphat)
NP	Normalphase
NSAID	Nicht-steroidale antiinflammatorische Drogen
OD	Optische Dichte
ORAC	<i>oxygen radical absorbance capacity</i>
PAE	Polyphenolreicher Apfelextrakt
PARP	Poly (ADP Ribose) Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDA	Photodiodenarray
PI	Proliferativer Index
PPAR	<i>peroxisome-proliferator-activated-receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QR	NAD(P) :Chinonoxidoreduktase ( <i>quinone reductase</i> )
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	rotations per minute
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAMP	Serin-Alanin-Methionin-Prolin
SC <sub>50</sub>	Halbmaximale Radikalfängerkonzentration
SCF	<i>Skp1/Culling/F-box protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	Standardfehler des Mittels
SMAD	Homolog der Vertebraten zum Drosophila Mad Protein
SOD	Superoxiddismutase
SRB	Sulforhodamin B
t-APC	Truncated APC
TAS	Trüber Apfelsaft

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris-buffered saline</i> )
TBS-T	TBS + Tween
TCA	Trichloressigsäure
TCF/LEF	<i>T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TOSC	<i>total oxyradical scavenging</i>
TrCP	<i>beta-transducin repeat-containing protein</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolet
V	Volt
VE	Vollentionisiert
vs.	<i>versus</i>
WM	Weightmarker
Wnt	Wingless Int-1
WT	Wildtyp
XTT	Natrium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium-5-carboxanilid

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Der Apfel und sein Saft

Weltweit gehört der zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) zählende Kulturapfel (*Malus domestica*) zu den bedeutendsten Fruchtsorten der menschlichen Ernährung. Als eine der ältesten Wild- und Kulturobstarten wurde er bereits um 400 v. Chr. gezüchtet (Fischer, 2003). Mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 17 kg pro Jahr nach Angaben der Zentralen Markt- und Preisberichtsstelle (ZMP) nimmt der Apfel in Deutschland als beliebteste Frucht auch heute noch unter den pflanzlichen Lebensmitteln einen hohen Stellenwert ein. Ähnlich verhält es sich mit einem der wichtigsten Produkte dieser Frucht – dem Apfelsaft. Mit einem Verbrauch von 12.8 l pro Kopf im Jahr 2004 ist er in Deutschland der am häufigsten konsumierte Fruchtsaft (Sennewald, 2005).

Unter den heute über 20000 global bekannten Apfelsorten sind in Deutschland ca. 1600 Sorten existent, von denen 30 bis 40 im Handel zum Verkauf angeboten werden (Hilbrand & Baumgartner, 2000). Die zum direkten Verzehr geeigneten Tafeläpfel werden von älteren Apfelmultisorten, sogenannten Mostobstsorten, die vor allem in der Saftproduktion zum Einsatz kommen, unterschieden. In Tabelle 1 sind einige in Deutschland bedeutende Sorten aufgeführt.

**Tabelle 1: Wirtschaftlich bedeutende Tafel- und Mostobstsorten in Deutschland.**

<b>Tafelobstsorten</b>	<b>Mostobstsorten</b>
Golden Delicious	Rheinischer Bohnapfel
Jonagold	Kaiser-Wilhelm-Apfel
Granny Smith	Brettacher Sämling
Melrose	Winterrambur
Gala	Bittenfelder
Braeburn	Schafnase

### 1.1.1 „An apple a day...“ – Der gesundheitliche Nutzen des Apfels

Ergebnissen einer Vielzahl epidemiologischer Studien zufolge korreliert der regelmäßige Konsum von Obst und Gemüse invers mit dem Auftreten verschiedener Krebserkrankungen (Steinmetz & Potter, 1996; WCRF, 1997). In einem finnischen Studienkollektiv reduzierte der Verzehr von Äpfeln das Auftreten verschiedener Zivilisationskrankheiten. Die Mortalität durch ischämische Herzkrankheiten war bei erhöhtem Apfelkonsum mit einem relativen Risiko (RR) von 0.75 signifikant herabgesetzt ( $p = 0.007$ ). Die Verminderung des Lungenkrebsrisikos auf ein RR von 0.40 ( $p = 0.001$ ) korrelierte in derselben Studie besonders stark mit der Aufnahme von Äpfeln (Knekt et al., 2002). Auch zwei amerikanische Untersuchungen zeigten einen inversen Zusammenhang zwischen dem Apfelkonsum und Krebserkrankungen der Lunge auf. Frauen, die am Tag mehr als eine Portion Äpfel und Birnen zu sich nahmen, reduzierten ihr Lungenkrebsrisiko deutlich (RR = 0.63; 95 % Konfidenzintervall = 0.43-0.91) (Feskanich et al., 2000; Le Marchand et al., 2000). Die Entstehung von Darmkrebs scheint ebenfalls durch die regelmäßige Aufnahme von Äpfeln beeinflussbar zu sein. In einer Fall-Kontroll-Studie aus Uruguay wurde eine 60 %ige Reduktion des relativen Risikos für Kolorektalkrebs bei einer 3maligen oder häufigeren Aufnahme von Äpfeln pro Woche gegenüber einer Aufnahme von weniger als einem mal pro Woche beobachtet (RR = 0.4, 95 % Konfidenzintervall 0.25 bis 0.66,  $p$  Trend < 0.001) (Deneo-Pellegrini et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine kürzlich erschienene Metaanalyse von Fall-Kontroll-Studien aus Italien. Der Verzehr von mehr als einem Apfel pro Tag brachte dabei im Vergleich zu weniger als einem Apfel pro Tag ein deutlich geringeres Risiko für Mundhöhlen-, Pharynx-, Ösophagus-, Kolorektal-, Larynx-, Brust-, Ovarial- und Prostatakrebs mit sich. Mit einem Odds Ratio von 0.8 (95 % Konfidenzintervall 0.71 bis 0.9) war das Darmkrebsrisiko um 20 % verringert (Gallus et al., 2005).

Die bisherigen epidemiologischen Befunde wurden durch weiterführende Untersuchungen *in vitro* und an Tiermodellen untermauert. Extrakte aus Äpfeln erwiesen sich dabei als antioxidativ und waren zudem in der Lage, die Proliferation von Leber- und Darmkrebszellen effektiv zu hemmen (Eberhardt et al., 2000). In Studien an Ratten führte die Anreicherung des Futters mit 10 % getrockneten Äpfeln zu einer Erhöhung des antioxidativen Potenzials im Plasma und verhinderte nach Verabreichung von Cholesterin den Anstieg der Lipide im Blut und in der Leber (Leontowicz et al., 2002). Im Besonderen

der Verzehr von Äpfeln inklusive ihrer Schale war für die Aktivitäten von Bedeutung (Wolfe et al., 2003). Die beschriebenen Effekte sind in erster Linie auf die im Apfel und in Apfelprodukten enthaltenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffe zurückzuführen. Eberhardt et al. demonstrierten, dass das antioxidative Potenzial des Apfelextraktes zu weniger als 0.4 % von dem darin enthaltenen Vitamin C ausgeht. Daraus folgte, dass die Kombination verschiedener polyphenolischer Inhaltsstoffe fast für die gesamte antioxidative und proliferationshemmende Aktivität des Apfels verantwortlich war (Eberhardt et al., 2000). Dieser Zusammenhang findet sich ebenfalls in epidemiologischen Studien wieder, die zwischen Polyphenolen und bestimmten Krankheitsrisiken Verbindungen aufzeigen konnten (Arts & Hollman, 2005). Catechinen und anderen Flavonoiden wurde dabei eine potenzielle Rolle in der Prävention von intestinalen Neoplasien zugesprochen (Arts et al., 2002; Hoensch & Kirch, 2005).

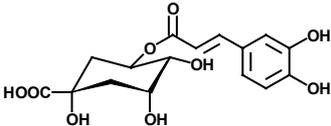
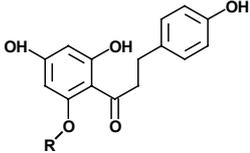
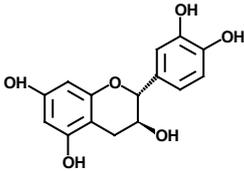
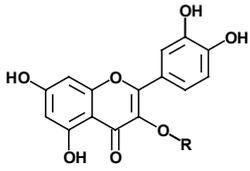
### **1.1.2 Polyphenolische Inhaltsstoffe des Apfels**

Der Gesamtphenolgehalt des Apfels macht 0.01 bis 1 % seines Frischgewichtes aus. In Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie Sorte, Anbaugebiet oder Erntejahr können die polyphenolischen Inhaltsstoffe in Qualität und Quantität stark variieren. Mostäpfel beispielsweise können im Vergleich zu Tafeläpfeln einen bis zu zehn mal höheren Polyphenolgehalt aufweisen (Van Buren, 1970). Die im Apfel enthaltenen Verbindungen können im Wesentlichen in vier Klassen eingeteilt werden, von denen einige wichtige Vertreter in Tabelle 2 aufgeführt sind.

Neben den Phenolcarbonsäuren sind vor allem die zur Gruppe der Flavonoide gehörenden Dihydrochalkone, Flavan-3-ole und Flavonole für den Apfel besonders charakteristisch. Bei den Flavonolen sind es insbesondere die Glykoside des Quercetins, die hier von Bedeutung sind. Zu den Flavan-3-olen zählen neben den monomeren Catechinen auch die polymeren Procyanidine, die einen Anteil von 40-60 % am Gesamtphenolgehalt von Äpfeln haben (Guyot et al., 1998; Alonso-Salces et al., 2004a). Die Polyphenole der beschriebenen Klassen verteilen sich mengenmäßig unterschiedlich in den einzelnen Bestandteilen der Frucht. So befinden sich die genannten Säuren in erster Linie im Fruchtfleisch, während Quercetinderivate vornehmlich in der Schale und Dihydrochalkone

in den Kernen nachgewiesen werden konnten. Catechine und Procyanidine sind in Fruchtfleisch und Schale gleichermaßen vertreten (Guyot et al., 1998).

**Tabelle 2: Polyphenolische Hauptinhaltsstoffe des Apfels.**

1 Phenolcarbonsäuren	2 Dihydrochalkone
<b>Chlorogensäure</b> , Kaffeesäure, Cumaroylchinasäuren, <i>p</i> -Cumarsäure	<b>Phloretin</b> (R = H), Phloretin-2'-glukosid, Phloretin-2'-xyloglukosid
	
3 Flavan-3-ole	4 Quercetin-glykoside
<b>(+)-Catechin</b> , (-)-Epicatechin, Procyanidine	<b>Quercetin</b> (R = H), Quercetin-3-galaktosid, -glukosid, -rutinosid, -rhamnosid, -xylosid
	

Strukturformeln für die jeweils erstgenannten Verbindungen

Der Vergleich zwischen Apfel und Saft zeigt im Hinblick auf die enthaltenen Polyphenole erhebliche Unterschiede. Obwohl Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe auch hier wieder wesentlich von der verwendeten Apfelsorte abhängen, kann durch bestimmte Verfahren bei der Herstellung eine gewisse Modifikation erzielt werden. Die stark variierende Wasserlöslichkeit der Verbindungen führt dazu, dass Quercetin-glykoside, Phloridzin und polymere Procyanidine beispielsweise nur unvollständig in den Saft übergehen und somit der Gesamtphenolgehalt des Saftes im Vergleich zum Apfel weitaus niedriger ist. Durch den Einsatz höherer Temperaturen während der Extraktion kann der Polyphenolgehalt erhöht und das Polyphenolmuster deutlich verändert werden. Direkt nach der Entsaftung sind die extrahierten Polyphenole der Oxidation durch fruchteigene Enzyme ausgesetzt. Eine direkte Pasteurisation des frischen Presssaftes, die zur Inaktivierung dieser Phenoloxidasen führt, kann weiteren Verlusten vorbeugen. Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren finden sich einige der in Tabelle 2 aufgeführten Verbindungen in geringeren Mengen im Apfelsaft wieder. Ausnahmen bilden dabei u.a. Quercetin-3-rutinosid sowie die Procyanidine B5 und C1 (Spanos et al., 1990).

Der Apfel trägt mit durchschnittlich 22 % wesentlich zur gesamten Polyphenolaufnahme über Früchte bei (Vinson et al., 2001). Aufgrund des nicht unbedeutenden Gehaltes an Flavonoiden stellen Äpfel und Apfelsaft somit eine bedeutende Quelle für die Zufuhr dieser sekundären Pflanzenstoffe dar (Hertog et al., 1992; Böhm et al., 1998). Eine steigende Zahl an Untersuchungen, die Flavonoiden im Speziellen sowie auch Polyphenolen im Allgemeinen antikanzerogene Eigenschaften zuweisen, lassen diese Verbindungen inklusive ihrer bedeutendsten Lebensmittelquellen zunehmend in den Fokus der Chemoprävention rücken (Williamson & Manach, 2005).

## **1.2 Chemoprävention**

Epidemiologen beziffern den Anteil an Krebserkrankungen, die durch die Einwirkung externer Faktoren verursacht werden, mit 80 % (Lichtenstein, 2000). Die Tatsache, dass ca. 35 % aller Krebserkrankungen auf den Einfluss der Ernährung zurückzuführen sind, macht diese zu einem wichtigen Ansatzpunkt für die Prävention von Krebs (Doll & Peto, 1981).

Der Begriff der Chemoprävention wurde vor knapp 30 Jahren von Michael B. Sporn geprägt (Sporn et al., 1976). Definitionsgemäß handelt es sich dabei um den Gebrauch von nicht toxischen Naturstoffen, Nahrungsbestandteilen und/oder synthetischen Verbindungen (Pharmaka), um die Krebsentstehung in normalem und präneoplastischem Gewebe zu unterbinden. Ziel ist es dabei, körpereigene Mechanismen darin zu unterstützen, die maligne Transformation gesunder Zellen zu verhindern und den Prozess der Karzinogenese zu verlangsamen, aufzuhalten oder gar rückgängig zu machen (Sporn & Newton, 1979; Kelloff et al., 1994). Lee Wattenberg sprach bereits seit den frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts von der Chemoprophylaxe und leistete im Hinblick auf die Entwicklung chemopräventiver Verbindungen während der folgenden Jahrzehnte Pionierarbeit (Wattenberg, 1966, 1983, 1985, 1992). Zusammen mit anderen Arbeiten auf diesem Gebiet führte dies zur Identifikation einer Vielzahl chemopräventiv wirksamer Nahrungsinhaltsstoffe. Außerdem erlaubte die Aufklärung von Prozessen der Karzinogenese auf molekularer Ebene die Charakterisierung konkreter Mechanismen und Biomarker, die durch diese Verbindungen beeinflusst werden können (Kelloff et al., 1994). Das Chemopräventionskonzept wurde daraufhin erweitert und beschreibt nun die Prävention präkanzeröser Läsionen und die Modulation relevanter Biomarker bzw. die

Verzögerung oder Umkehr der Progression vom prämaligen zum malignen Stadium (Lippman et al., 1998; Mukhtar & Ahmad, 1999). Bis heute wird der Entwicklung chemopräventiver Wirkstoffe sowie der Aufklärung ihrer Wirkprinzipien ein hoher Stellenwert beigemessen (Crowell, 2005; Sporn & Liby, 2005). Nachfolgend werden einige der im Rahmen der Krebsentstehung beeinflussbaren Mechanismen genauer erläutert.

### **1.2.1 Der Prozess der Karzinogenese**

Die Karzinogenese ist ein hochkomplexer Vorgang, bei dem es durch die Akkumulation biochemischer und genetischer Veränderungen zur Entartung von Zellen und letztendlich zur Entstehung eines malignen, invasiven Tumors kommt. Das Einwirken verschiedener Reize chemischer, physikalischer, biologischer oder genetischer Natur ist hier entscheidend. Der aus einer Vielzahl einzelner Schritte bestehende Prozess kann schematisch, wie in Abbildung 1 dargestellt, in drei Phasen gegliedert werden – Initiation, Promotion und Progression (Pitot, 1993).

Bei der Initiation handelt es sich um einen irreversiblen Vorgang von kurzer Dauer, der innerhalb von ein bis zwei Tagen abgeschlossen sein kann. Dabei sind gesunde Zellen Karzinogenen exponiert, die in der Lage sind, das Erbmaterialeiner Zelle zu schädigen. Die Interaktion reaktiver Metabolite mit zellulärer DNA führt zur strukturellen Veränderung von DNA-Molekülen, eine Schädigung, die sich, wenn sie nicht oder nur fehlerhaft repariert wird, schließlich durch die Ausbildung von Mutationen manifestiert. Auch die Oxidation von DNA-Bausteinen durch freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kann Mutationen zur Folge haben. Die Vererbung einer Mutation in einem an der Wachstumsregulation beteiligten Gen durch eine einzelne Zelle legt den Grundstock für das klonale Wachstum eines Tumors (Surh, 1999).

Während der Promotionsphase kommt es zur Expansion des Klons, aus dem durch aktive Proliferation eine prämaligene Tumorzellpopulation gebildet wird. Der beständige Einfluss von Tumorpromotoren, wie Entzündungsmediatoren, Hormonmetaboliten oder ROS, resultiert in unkontrolliertem Zellwachstum. Entscheidend ist dabei die weitere Anhäufung von Mutationen innerhalb der sich ausbreitenden Zellpopulation, die diese dazu befähigt, sich der Kontrolle über Wachstumsregulation, Differenzierung und Apoptose durch inter-

und intrazelluläre Signale zu entziehen. Die Promotionsphase ist zu Beginn noch reversibel und kann sich über einen Zeitraum mehrerer Jahrzehnte erstrecken.

In der Progressionsphase erfolgt die irreversible Umwandlung der initiierten Zellen in maligne Neoplasmen, die zu Tumoren heranwachsen können. Charakteristisch für diese neugebildeten Tumorzellklone sind die Invasivität und das Potenzial zum metastasierenden Wachstum. Dem zu Grunde liegen die Anhäufung weiterer Mutationen sowie veränderte Genexpressionsmuster, die in diesem Stadium vor allem auf die progressive Instabilität des Genoms zurückzuführen sind (Harris, 1991; Pitot, 1993).

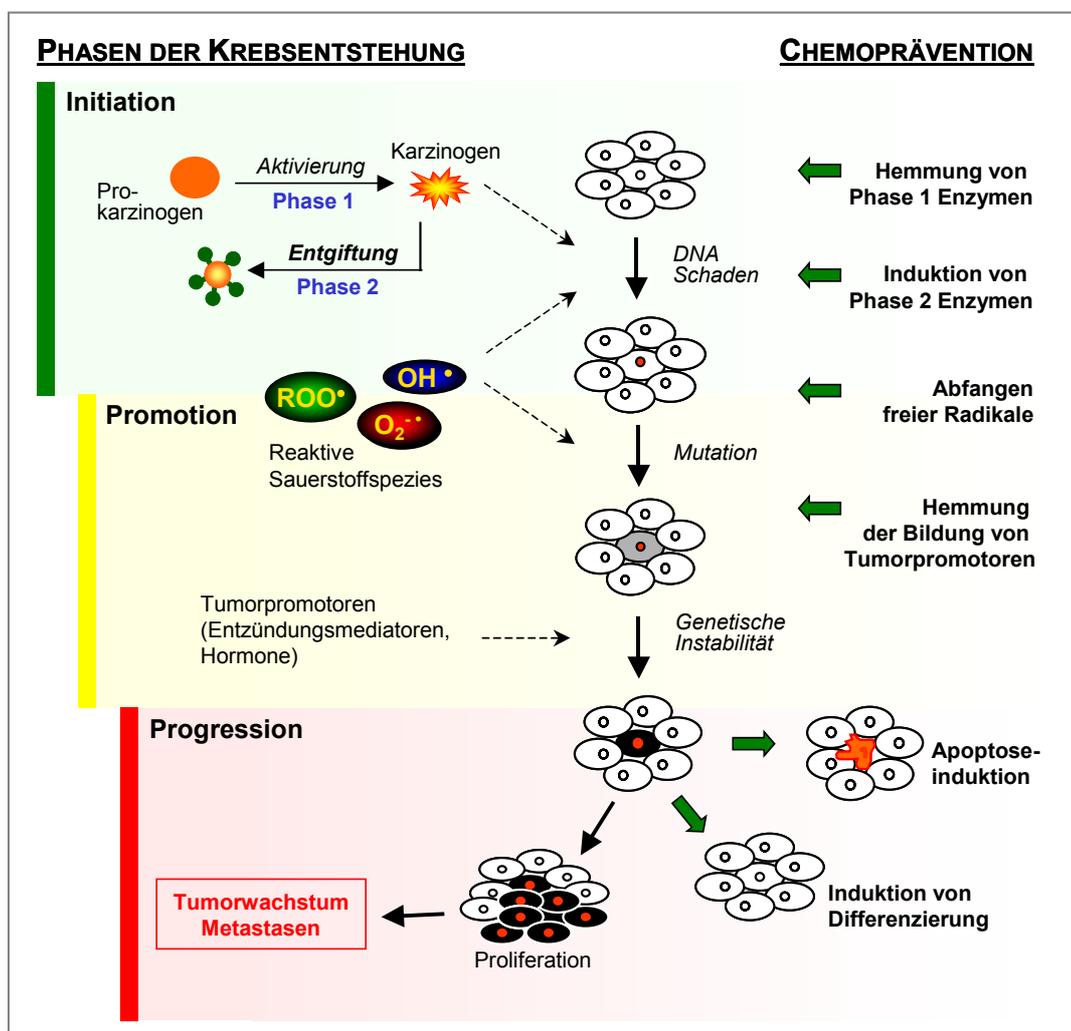


Abbildung 1: Prozess der Krebsentstehung und Angriffspunkte der Chemoprävention.

### **1.2.2 Angriffspunkte der Chemoprävention**

Im Folgenden werden einige Angriffspunkte der Chemoprävention aufgezeigt und erläutert. In Abbildung 1 sind diese der entsprechenden Phase der Karzinogenese, in der sie von Bedeutung sind, gegenübergestellt.

Die Initiationsphase der chemisch induzierten Karzinogenese umfasst bereits die Aufnahme karzinogener Stoffe in den Körper sowie ihren Transport in metabolisierende Gewebe. Einige dieser Verbindungen werden in Form von Vorstufen als sogenannte Prokarzinogene aufgenommen und erst im Fremdstoffmetabolismus der Leber durch das Einwirken von Enzymen der Cytochrom P450 Familie aktiviert. Sie katalysieren in diesem Zusammenhang den Einbau funktioneller Gruppen, wodurch reaktive, meist elektrophile Metabolite gebildet werden, die mit DNA interagieren können. Die effektive Hemmung von Phase 1 Enzymen stellt somit einen Mechanismus dar, der chemopräventiv moduliert werden kann. Ein repräsentatives Mitglied dieser Enzymfamilie ist das Cytochrom P450 1A1, das vor allem in extrahepatischen Geweben wie Lunge, Darm oder Haut exprimiert wird. Die Induktion des Enzyms erfolgt z. B. durch Umweltfaktoren wie Zigarettenrauch und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe aus gegrilltem Fleisch (DiGiovanni & Kleiner, 2004).

Ein weiterer chemopräventiver Eingriff in den Fremdstoffmetabolismus ist die Induktion von Phase 2 Enzymen. Über sie erfolgt die Konjugation reaktiver Metabolite an körpereigene Liganden wie Glutathion, Glucuronsäure, Essigsäure oder Schwefelsäure, wodurch die Bindung an DNA verhindert wird. Die Konjugate können vermehrt ausgeschieden und dadurch entgiftet werden. Die Induktion von Phase 2 Enzymen wird als einer der wesentlichsten Mechanismen zum Schutz vor chemisch induzierter Karzinogenese angesehen (Kensler & Talalay, 2004). Obwohl die NAD(P)H:Chinonreduktase keine Konjugationsreaktionen katalysiert, wird sie ebenfalls zu den Phase 2 Enzymen gezählt. Durch 2-Elektronen Reduktionen trägt sie durch die Umwandlung toxischer, reaktiver Chinone in unschädliche Hydrochinone zu deren Entgiftung bei (Talalay et al., 1995).

ROS spielen wie bereits unter 1.2.1 erwähnt nicht nur bei der Initiation, sondern auch bei der Promotion eine entscheidende Rolle. Im gesunden Organismus wird der Gehalt an ROS und anderen freien Radikalen durch endogene antioxidative Mechanismen kontrolliert, sodass ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien besteht. Als Folge von oxidativem Stress, verursacht durch Erkrankungen des Immunsystems, chronische Entzündungen oder Infektionen, kann dieses Gleichgewicht durch die Überproduktion von ROS gestört werden. Weiterhin werden durch bestimmte Zellorganellen aufgrund einer ungenügenden Sauerstoffverwertung, beispielsweise während der Lipidperoxidation in den Mitochondrien, verstärkt freie Radikale gebildet. Die Beteiligung sauerstofffreier Radikale bei der Aktivierung von Prokarzinogenen kann in den entsprechenden Reaktionen zusätzlich zur Freisetzung von ROS führen (Halliwell et al., 2000). Genotoxische Eigenschaften, die Schädigung von Proteinen sowie die Fähigkeit, als Moleküle der Signalübertragung in der Zelle zu agieren, erklären den karzinogenen Charakter reaktiver Sauerstoffspezies in der Krebsentstehung (Behrend et al., 2003). Das Abfangen von Radikalen sowie die Unterstützung der körpereigenen Kontrollmechanismen stellen somit ebenfalls eine sinnvolle Ergänzung der chemopräventiven Strategie dar.

Neben den freien Radikalen spielen in der Promotionsphase auch Tumorpromotoren eine wesentliche Rolle. Zu ihnen zählen Hormone und hormonähnliche Verbindungen wie Prostaglandine. Diese Entzündungsmediatoren werden durch Cyclooxygenasen aus Arachidonsäure freigesetzt. Da ein Anstieg des Prostaglandinspiegels mit einer erhöhten Zellproliferation bei gleichzeitiger Verminderung der Apoptoseinduktion und der Begünstigung der tumorassoziierten Angiogenese in Verbindung gebracht wird, stellt die Hemmung von Cyclooxygenasen einen geeigneten Chemopräventionsmechanismus dar (Kelloff & Sigman, 2003). Auch die verminderte Bildung von Hormonen kann besonders bei hormonbedingten Krebsarten präventiv wirken. Die Hemmung des ebenfalls zur Cytochrom P450 Familie gehörenden Enzyms Aromatase (Cyp 19) z. B. verhindert die Bildung von 17 $\beta$ -Estradiol aus Testosteron. Bindet das Hormon an den Östrogenrezeptor, werden durch die Beeinflussung der Genexpression vermehrt Proteine synthetisiert, die eine verstärkte Proliferation initiiert Zellen zur Folge haben. Ein weiteres prokanzerogenes Ereignis, das von Estradiol ausgeht, ist seine Umwandlung über 4-Hydroxy-Estradiol in das genotoxische 3,4-Estradiol-Chinon. Das hochreaktive Chinon

kann durch direkte Interaktion mit DNA zu den bereits erwähnten Schädigungen des Erbmateriels führen (Santen, 2002).

Im progressiven Stadium der Tumorentstehung, das fließend aus der späten Promotionsphase hervorgeht, ist die direkte Hemmung der unkontrollierten Proliferation von entscheidender Bedeutung. Bestimmte Verbindungen z. B. lösen in transformierten Zellen Differenzierung aus. Dadurch stellen diese das Wachstum ein (Mata-Greenwood et al., 2001). Die Induktion der Apoptose hingegen dient dazu, kanzeröse Zellen gezielt zu eliminieren und stellt somit einen vielversprechenden Ansatz zur Krebsbekämpfung dar (Sun et al., 2004).

Die genannten Mechanismen stellen lediglich eine Auswahl an Angriffspunkten der Chemoprävention dar. Dennoch bilden sie eine gute Basis für die Identifikation chemopräventiver Substanzen *in vitro*. Im Rahmen einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung (*activity-guided fractionation*) können unter Verwendung entsprechender Testsysteme antikarzinogene Komponenten eines komplexen Gemisches isoliert werden. Die chromatographische Auftrennung eines pflanzlichen Extraktes in einzelne Fraktionen und deren weitere Auftrennung in Subfraktionen kann so anhand der Aktivitäten erleichtert werden (Prochaska, 1997). Die analytische Aufklärung ermöglicht die Zuordnung chemopräventiver Eigenschaften zu einzelnen Stoffklassen oder gar Inhaltsstoffen.

## 1.3 Darmkrebs

### 1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms

Karzinome des Gastrointestinaltraktes stellen in den Industrienationen bei Männern die zweithäufigste, bei Frauen die dritthäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen dar. Westeuropa liegt bei Betrachtung beider Geschlechter mit einer Inzidenz von 72.2 Fällen pro 100.000 Einwohnern hinter Japan, Australien und Nord Amerika weltweit an vierter Stelle (Parkin et al., 2005).

Das Risiko, ein kolorektales Karzinom (KRK) zu entwickeln, steigt mit dem Alter an und erreicht zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt den Höchstpunkt (Ries et al., 2004). Mit

ca. 75 % handelt es sich dabei zum Großteil um sporadische Karzinome. In den verbleibenden 25 % der Fälle liegt eine positive Familienanamnese vor, die auf erbliche Vorbelastungen hinweist. Genetische Mutationen sind dabei lediglich für 5-6 % aller Darmkrebsfälle verantwortlich (www.cancer.gov). Zu den bekanntesten genetischen Dispositionen zählt die Familiäre Adenomatöse Poliposis Coli (FAP). FAP Patienten entwickeln aufgrund eines vererbten, autosomal dominanten Defektes im *APC* (Adenomatöse Poliposis Coli) Gen Hunderte bis Tausende Polypen im Dickdarm, die meistens zwischen dem vierzigsten und fünfzigsten Lebensjahr ins maligne Stadium übergehen (Lynch & de la Chapelle, 2003).

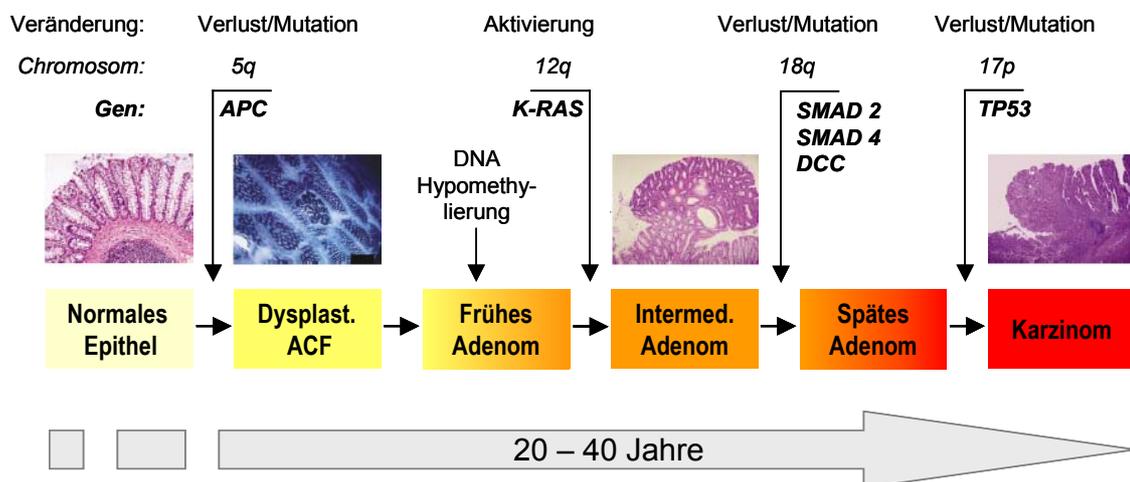
Die Prävalenz des KRKs ist in den Industrienationen wesentlich höher als in nicht-industrialisierten Ländern (Parkin et al., 2005). Deutliche Unterschiede im internationalen Vergleich sowie Daten aus Migrationsstudien ließen die Schlussfolgerung zu, dass das Risiko, an Kolonkrebs zu erkranken, mit bestimmten Umweltfaktoren in Verbindung gebracht werden kann, die für den jeweiligen Lebensstil eines Landes charakteristisch sind (IARC, 1987). Vor allem der Einfluss der Ernährung konnte anhand einer Vielzahl von Fall-Kontroll- und Kohortenstudien belegt werden (Potter et al., 1993; WCRF, 1997). Während der Verzehr von rotem, verarbeitetem Fleisch, tierischen Fetten und Alkohol positiv mit dem Risiko für das KRK korrelierte, führte eine Ernährung reich an Obst und Gemüse und damit an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu einer inversen Assoziation (WCRF, 1997; Potter, 1999; IARC, 2003; Martinez, 2005).

### **1.3.2 Das Mehrstufen-Modell der Kolonkarzinogenese**

Basierend auf dem unter 1.2.1 bereits beschriebenen Prozess der Karzinogenese liegt auch der Pathogenese des Kolonkarzinoms die Akkumulation einer Vielzahl von Mutationen zu Grunde, die in der malignen Transformation epithelialer Zellen resultieren. Fearon und Vogelstein stellten mit der Adenom-Karzinom-Sequenz ein Mehrstufenmodell zur Entstehung des Kolonkarzinoms auf, das die morphologischen und genetischen Veränderungen dieses Vorgangs genauer beschreibt. Danach ist ein Karzinom das Resultat der durch Mutationen bedingten Aktivierung von Onkogenen bei gleichzeitiger Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Obwohl die genetischen Veränderungen dabei des Öfteren in einer bestimmten Reihenfolge auftreten, ist der ausschlaggebende Faktor für

die biologischen Eigenschaften des Tumors die Akkumulation aller Mutationen und weniger ihre genaue Abfolge (Fearon & Vogelstein, 1990). Klinische Daten ergaben, dass Mutationen einzelner Gene häufig mit dem Auftreten bestimmter morphologischer Veränderungen einhergehen. Sie bilden die Basis des Modells und werden im Folgenden genauer erläutert.

Die Tumorsuppressorgene *APC*, *SMAD 2*, *SMAD 4*, *DCC* und *TP53* sowie das Onkogen *K-RAS* zählen zu den wichtigsten Genen, die in der Kolonkarzinogenese von Mutationen betroffen sind. Als Folge verschiedener Veränderungen in diesen Genen entsteht ausgehend vom gesunden Epithelgewebe über mehrere histopathologische Zwischenstufen letztendlich der invasive Tumor (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz der Kolonkarzinogenese. Modifiziert nach (Fearon & Vogelstein, 1990; Fodde et al., 2001).**

Die initiiierende genetische Veränderung der Vogelstein-Sequenz ist die Mutation des auf Chromosom 5q lokalisierten *APC*-Gens. Mehr als 80 % aller Karzinome des Kolons und Rektums weisen diese Mutation auf, die meist zu einer Verkürzung des entsprechenden Proteins führt (Kinzler & Vogelstein, 1996). Die frühesten und kleinsten identifizierbaren Läsionen der Kolonkarzinogenese sind Anhäufungen aberranter Krypten (ACF, *aberrant crypt foci*), die bei dysplastischer Morphologie zum Karzinom entarten können. Der Grad der Dysplasie ist dabei mit dem Auftreten einer Mutation im *APC*-Gen assoziiert (Fodde et al., 2001).

Eine wesentliche Funktion des APC-Proteins besteht in der Regulation von  $\beta$ -Catenin. Beide Proteine stellen wichtige Komponenten des Wnt-Signalweges dar und sind für dessen Kontrolle verantwortlich. APC reguliert dabei den Abbau von  $\beta$ -Catenin oder dessen Transport in den Nukleus. Dort aktiviert es durch Bindungen an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF die Expression von Genen, die vor allem mit dem Wachstum der Zelle in Verbindung stehen. Ein Funktionsverlust des APC-Proteins führt dabei durch die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalweges und damit zum vermehrten Zellwachstum (siehe auch Kapitel 1.4.2). Eine Keimbahnmutation im *APC*-Gen ist, wie bereits erwähnt, für die FAP verantwortlich (Ilyas et al., 1999; Goss & Groden, 2000).

Etwa 50 % aller sporadischen Kolonkarzinome tragen eine Mutation im Onkogen *K-RAS*. Obwohl diese Mutation initiierend sein kann, tritt sie meist in einer einzelnen Zelle eines bereits existierenden Adenoms auf und führt durch klonale Expansion zu dessen Übergang in ein größeres Adenom (Fearon & Vogelstein, 1990). Dieser selektive Wachstumsvorteil wurde meist in Kombination mit einer bereits existierenden Mutation im *APC*-Gen beobachtet und erhöhte dabei den Grad der Dysplasie im Tumor. Das auf Chromosom 12q lokalisierte *K-RAS*-Gen kodiert für ein Protein, das an der Signalübertragung durch Oberflächenrezeptoren beteiligt ist. Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges (Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen) führt zur Expression von Genen, die für die Beeinflussung von Zelladhäsion und Zellzyklus verantwortlich sind. Eine mutationsbedingte Überexpression des K-RAS-Proteins führt durch die konstitutive Aktivierung zur morphologischen Transformation der betroffenen Zellen (Augenlicht, 1998; Ilyas et al., 1999).

In 70 % aller Karzinome und 50 % aller späten Adenome kommt es zum Allelverlust einer gesamten Region auf Chromosom 18q. Erste Vermutungen über betroffene Gene führten dabei zum *DCC*-Gen (*deleted in colon cancer*), das in dieser Region identifiziert wurde. *DCC* kodiert für ein großes Membranprotein, das zur Immunglobulin Superfamilie zählt und als Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor Netrin fungiert. Untersuchungen mit *DCC*-Knockoutmäusen, die keinen signifikant veränderten Phänotyp aufwiesen, ließen jedoch Zweifel an der Bedeutung von *DCC* in der Kolonkarzinogenese aufkommen (Ilyas et al., 1999). Die Identifikation weiterer auf Chromosom 18q lokalisierter

Tumorsuppressorgene führte dazu, dass *SMAD 2* und *SMAD 4* verstärkt als mögliche Kandidaten in Betracht gezogen wurden. *SMAD 4*, auch bekannt als *DPC 4* (*deleted in pancreatic cancer*), und *SMAD 2* kodieren für Signalmoleküle innerhalb des TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) Weges, über den Proliferation, Differenzierung, Motilität, Adhäsion oder Apoptose einer Zelle stimuliert oder gehemmt werden können. Die Inaktivierung der beiden *SMAD*-Gene trägt damit höchstwahrscheinlich zur malignen Progression eines kolorektalen Tumors bei (Fodde et al., 2001).

Veränderungen des *TP53*-Gens treten mit großer Häufigkeit am Ende der Adenom-Karzinom-Sequenz auf und sind damit ebenfalls kennzeichnend für den Übergang des benignen Adenoms zum malignen Karzinom. Sie sind in mehr als 80 % aller kolorektalen Tumore zu finden (Baker et al., 1990). Ist nur ein Allel des auf Chromosom 17p lokalisierten Gens betroffen, wird der Tumorzelle lediglich ein selektiver Wachstumsvorteil verliehen. Erst der Verlust beider Allele amplifiziert diesen Wachstumsvorteil und bedingt die maligne Progression zum Karzinom (Fearon & Vogelstein, 1990). Neben einer Vielzahl von Funktionen obliegt TP53 vor allem die Regulation von Zellzyklus und Apoptose. Der entscheidende selektive Wachstumsvorteil wird in der Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose gesehen (Weber & Zambetti, 2003).

Zusätzlich zu den Mutationen und Verlusten von Genen werden auch epigenetische Veränderungen als frühes Ereignis im Verlauf der Karzinogenese angesehen. Es handelt sich dabei um Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA, die der *APC*-Mutation oder anderen Veränderungen, die am Anfang der Sequenz stehen, folgen können. Die Expression einer Vielzahl von Genen wird durch den Methylierungsstatus in der Promotorregion des Gens kontrolliert. Entsprechend kann es als Konsequenz einer Hypomethylierung zu einer Aktivierung von Onkogenen kommen, wohingegen im Falle einer Hypermethylierung Tumorsuppressorgene inaktiviert würden (Fearon & Vogelstein, 1990; Ilyas et al., 1999).

## 1.4 Tiermodell zur genetisch induzierten Karzinogenese im Darm – die *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus

Das *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell zählt zu den wichtigsten Tiermodellen, die im Rahmen von Untersuchungen zur Prävention intestinaler Krebserkrankungen eingesetzt werden. Studien mit diesem Modell geben Aufschluss über die Relevanz genetischer und umweltassoziierter Faktoren in der Karzinogenese des Darms und tragen zur Aufklärung der darin involvierten molekularen Mechanismen bei. Auch im Bereich der Chemopräventionsforschung werden Interventionsstudien mit *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäusen herangezogen, um die Wirksamkeit potenziell krebspräventiver Stoffe *in vivo* zu beurteilen und die entscheidenden Wirkmechanismen zu identifizieren.

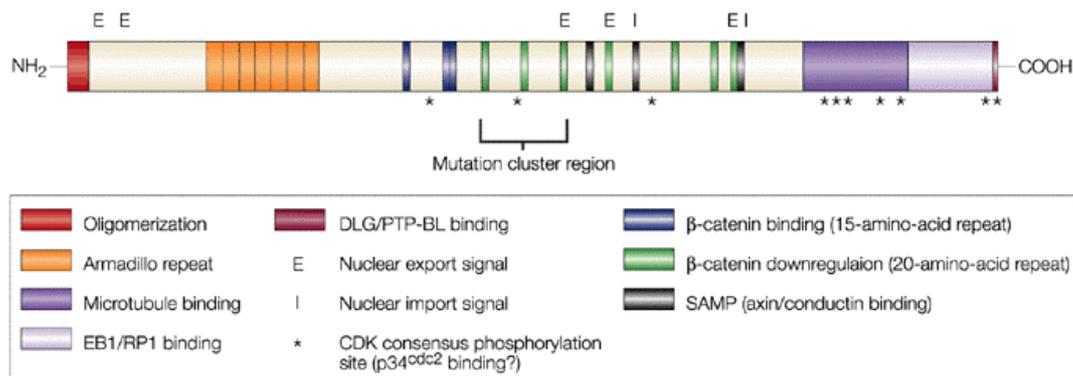
### 1.4.1 Etablierung und Charakterisierung des *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modells

Der Begriff *Apc*<sup>Min/+</sup> beschreibt eine autosomal dominante Mutation des murinen *Apc*-Gens, die die Tiere für die Entwicklung multipler intestinaler Neoplasien (Min) prädisponiert. Moser et al. etablierten dieses Modell durch zufällig chemisch induzierte Karzinogenese unter Verwendung des Keimbahnmutagens N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (*N-ethyl-N-nitrosourea*, ENU). Der daraus hervorgehende Phänotyp entwickelt zahlreiche makroskopisch sichtbare Tumore im gesamten Intestinaltrakt sowie eine mit dem Alter fortschreitende, chronische Anämie, die sich in sinkenden Hämatokritwerten äußert und letztlich zum Tod führen kann (Moser et al., 1990). In Anlehnung an den bei FAP Patienten ähnlichen Phänotyp und die Tatsache, dass eine somatische Mutation des *APC*-Gens auch beim Menschen für sporadische Darmkrebserkrankungen charakteristisch ist, erfolgten Untersuchungen, die bestätigten, dass es sich auch bei der Maus um das *Apc*-Gen handelt, das in mutierter Form für die Ausbildung intestinaler Tumore verantwortlich ist (Su et al., 1992). Während die Mutation beim Menschen vor allem im Kolon zur Tumorbildung führt, sind die Adenome bei der Maus in erster Linie im Dünndarm angesiedelt. Meist handelt es sich dabei um benigne Adenome, die aufgrund der kurzen Lebensdauer der Tiere nur sehr selten zum Karzinom entarten und somit auch keine Metastasen ausbilden (Moser et al., 1992; Halberg et al., 2000).

Die *Apc*-Mutation ist nur durch männliche Tiere vererbbar, da die Weibchen meist zu schwach sind, um die Jungen auszutragen. Homozygote Nachkommen sind aufgrund einer gestörten Embryonalentwicklung nicht lebensfähig und sterben *in utero* (Moser et al., 1995).

#### 1.4.2 APC – Adenomatöse Polyposis Coli

Das menschliche *APC*-Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert. Der Vergleich zur Maus zeigt eine 90 %-ige Homologie. Bei dem resultierenden Genprodukt handelt es sich um ein 312 kDa großes, aus mehreren Domänen bestehendes Protein, dessen Funktionen durch verschiedene konservierte Regionen bestimmt werden (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Das APC-Protein (Fodde et al., 2001).**

APC weist eine Vielzahl an Bindungsstellen auf, über die es mit verschiedenen Proteinen interagieren kann. Im zentralen Bereich des Proteins sind drei aus 15 Aminosäuren bestehende und sieben aus 20 Aminosäuren bestehende Motive lokalisiert, die mit dem β-Cateninprotein assoziieren können. Letztere sind vor allem an der Regulation des β-Cateninspiegels beteiligt. SAMP-Bindungsstellen ermöglichen die Interaktion mit Proteinen der Axin Familie (Axin, Axil und Conductin). Im carboxyterminalen Bereich befinden sich Regionen, die die direkte oder indirekte Bindung an Mikrotubuli ermöglichen. Am aminoterminalen Ende des Proteins befindet sich eine Dimerisierungsdomäne, die wahrscheinlich die Oligomerisierung von APC-Proteinen vermittelt. Im weiteren Verlauf finden sich sieben sogenannte „Armadillo repeats“, benannt nach dem in *Drosophila* vorkommenden β-Cateninhomolog Armadillo. Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass diese Domäne Funktionen des Proteins im Bereich

von Migration und Adhäsion der Zelle unterstützt. Das Protein zeichnet sich zusätzlich durch fünf nukleäre Export- und zwei nukleäre Importsignale sowie zahlreiche Phosphorylierungsstellen für verschiedene Protein-Kinasen aus (Fodde et al., 2001).

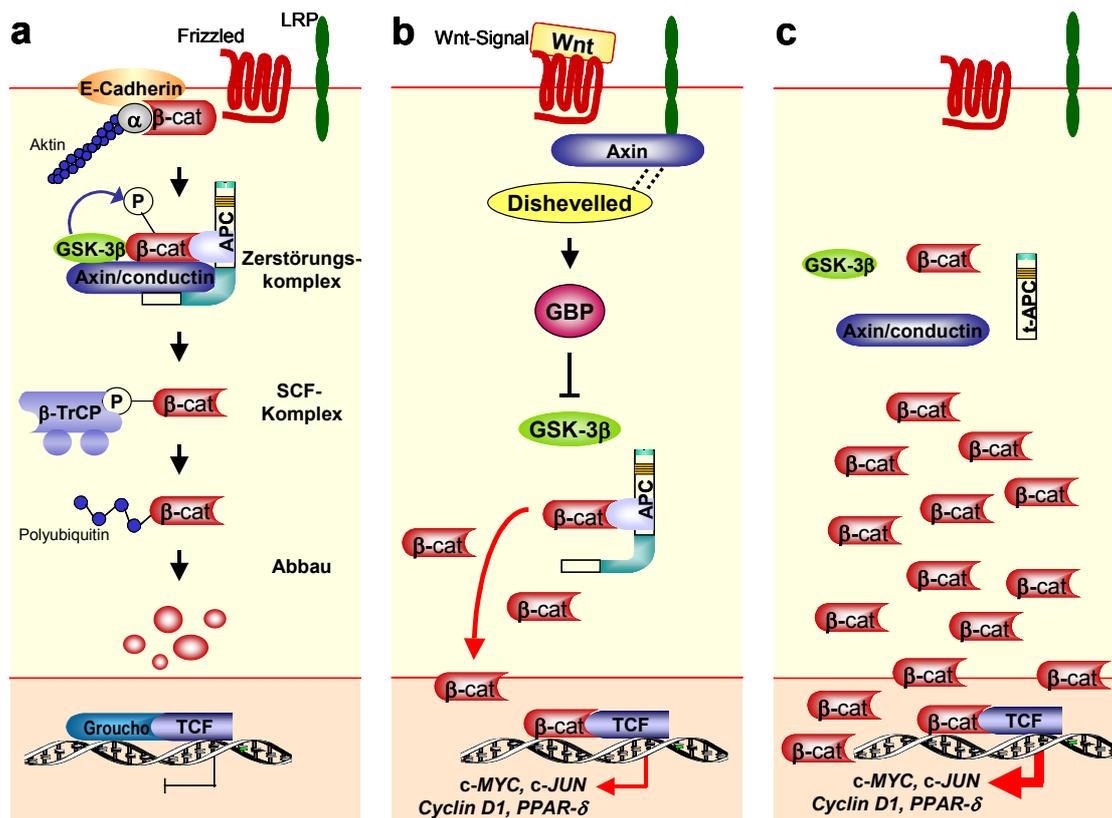
Anhand der biochemischen Charakterisierung des APC-Proteins sowie der Identifikation der entsprechenden Bindungspartner erfolgte nach und nach die Aufklärung seiner Funktion. Als Tumorsuppressor ist APC durch die Beeinflussung verschiedener Prozesse wie Proliferation, Zellzyklusregulation, Differenzierung, Migration und Apoptose wesentlich an der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt (Goss & Groden, 2000; Fodde et al., 2001; Fodde, 2003). Mutationen im *APC*-Gen führen häufig durch eine Verkürzung des Proteins zu einem Funktionsverlust des APC-Proteins. Im Falle der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus kommt es im Codon 850 durch den Basenaustausch von Thymin gegen Adenin zur Bildung eines Stop-Codons, sodass die Transkription an dieser Stelle beendet wird. Die Lokalisation der Mutation kann die Tumorentstehung sowohl bei der Maus als auch beim Menschen stark beeinflussen. Dies zeigte die Etablierung eines Mausmodells, in dem durch homologe Rekombination eine Mutation in Codon 1638 des *Apc*-Gens eingebracht wurde, wodurch die Tiere zwar immer noch intestinale Tumore entwickelten, deren Anzahl im Vergleich zur *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus jedoch deutlich geringer war.

Der entscheidende Auslöser, der zur Entwicklung von Tumoren führt, ist der Verlust der Heterozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) durch somatische Mutation der verbleibenden Kopie des *Apc*-Gens. LOH wurde in 100 % der Adenome in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen nachgewiesen sowie in 80 % der Tumore von FAP Patienten und in den meisten sporadischen Tumoren (Nishisho et al., 1991; Miyoshi et al., 1992; Powell et al., 1992; Levy et al., 1994; Kinzler & Vogelstein, 1996).

### 1.4.3 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin/TCF-Signalweg

In der Karzinogenese wird die Bedeutung des APC-Proteins vor allem in seiner regulatorischen Funktion der  $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkription innerhalb des Wnt-Signalweges gesehen. Die physiologische Bedeutung des Wnt-Signalweges besteht in der Regulation der Embryonalentwicklung sowie der Zellteilung und -differenzierung. Durch die Beteiligung einer Vielzahl multifunktionaler Proteine und deren Zusammenspiel ist dieser Signalweg sehr komplex und entbehrt bis dato einer detaillierten Aufklärung. Sein

Ablauf wird im Folgenden stark vereinfacht beschrieben und bezieht nur eine Auswahl der beteiligten Faktoren in die Darstellung ein. Die Beschreibung der in Abbildung 4 schematisch zusammengefassten Prozesse basiert auf Übersichtsartikeln der Autoren Fodde, Logan und Nusse, Ilyas, Pinto und Clevers sowie der darin jeweils zitierten Literatur (Fodde et al., 2001; Logan & Nusse, 2004; Ilyas, 2005; Pinto & Clevers, 2005).



**Abbildung 4:** Vereinfachtes Schema des Wnt-Signalweges a) in Abwesenheit des Wnt-Signals, b) in Anwesenheit des Wnt-Signals und c) Beeinflussung durch verkürztes APC.

Im Mittelpunkt der Wnt-Signaltransduktion steht das Protein  $\beta$ -Catenin, das erstmals als Bestandteil eines Zell-Zell-Adhäsionskomplexes identifiziert wurde (Wong & Pignatelli, 2002). Durch die direkte Bindung an das Membranprotein E-Cadherin stellt es über die Assoziation mit  $\alpha$ -Catenin eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett her. Mittlerweile ist  $\beta$ -Catenin auch als Transkriptionsfaktor bekannt, dessen Funktion durch die An- bzw. Abwesenheit des Wnt-Signals reguliert wird. In beiden Fällen ist APC von entscheidender Bedeutung.

In Abwesenheit des Wnt-Signals wird freies  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma an APC gebunden. Mit den Proteinen Axin/Conductin und der Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) wird der Zerstörungskomplex gebildet, in dem  $\beta$ -Catenin durch die GSK-3 $\beta$  phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung ermöglicht, dass das Protein vom SCF-Komplex (*Skp1/Culling/F-box protein*) erkannt und an das darin enthaltene F-Box Protein  $\beta$ -TrCP (*beta-transducin repeat-containing protein*) gebunden wird. Diese Ligase katalysiert die Polyubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin, wodurch dieses vom Proteasom identifiziert und abgebaut werden kann. In diesem Fall wird die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkription unterbunden (Abbildung 4a).

Die Bindung eines Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled führt zu einer Inaktivierung der GSK-3 $\beta$ . Frizzled liegt dabei in einem Komplex mit dem Korezeptor LRP (*low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein*) vor, der nach Bindung des Liganden phosphoryliert wird. Anschließend kommt es zu einer Rekrutierung und Interaktion der Proteine Axin und Dishevelled, wodurch Axin aus dem Zerstörungskomplex entfernt wird. Weiterhin interagiert Dishevelled mit dem Protein GBP (*GSK-3 $\beta$  binding protein*), das die Dissoziation der GSK-3 $\beta$  aus dem Zerstörungskomplex fördert und somit die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und damit seinen Abbau verhindert. Das in diesem Zuge stabilisierte  $\beta$ -Catenin akkumuliert nun und wird, wahrscheinlich gebunden an APC, in den Nukleus transportiert. Dort erfolgt durch Komplexbildung mit dem DNA-Bindungsprotein TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor 1*) die Aktivierung der Transkription. In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin wird die transkriptionelle Aktivität von TCF/LEF durch den Korepressor Groucho unterdrückt, der durch  $\beta$ -Catenin freigesetzt wird (Abbildung 4b).

Der Funktionsverlust des APC-Proteins führt dazu, dass es in Abwesenheit des Wnt-Liganden nicht zum Abbau von  $\beta$ -Catenin kommt. Als Folge akkumuliert das Protein im Zytoplasma weit über das physiologische Maß hinaus. Durch die Ausbreitung dieser Akkumulation bis in den Nukleus ergibt sich die konstitutive Aktivierung der Transkription (Abbildung 4c).

Der Signalweg kontrolliert die Expression einer Vielzahl von Genen. Einige kodieren für Proteine des Signalweges selber, wodurch dieser einer genauen Regulation unterliegt. Im

Hinblick auf die Krebsentstehung sind vor allem Proteine von Bedeutung, die in die Prozesse von Proliferation, Apoptose und Zellzyklus eingebunden sind. Dazu zählen unter anderem Cyclin D1, c-MYC, c-JUN und PPAR- $\delta$ . Die Kontrolle des Wnt-Signalweges über die  $\beta$ -Catenin vermittelte Transkription dieser Gene kann durch die Fehlfunktion eines jeden daran beteiligten Faktors außer Kraft gesetzt werden. Die übermäßige oder unzureichende Expression der genannten Proteine verschafft der Zelle den entscheidenden Wachstumsvorteil.

#### **1.4.4 Vergleich zur chemisch induzierten Kolonkarzinogenese – Vor- und Nachteile**

Die Entwicklung des *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modells ermöglichte die Durchführung einer Vielzahl von Studien, die zu einem besseren Verständnis der Kolonkarzinogenese auf molekularer Ebene beitrugen. Ein wesentlicher Vorteil des Modells besteht darin, dass es ohne die Gabe eines Karzinogens in einem relativ kurzen Zeitraum spontan zur Bildung von Tumoren im Darm kommt.

Im Vergleich dazu stehen Modelle zur chemisch induzierten Karzinogenese. Am häufigsten kommen dabei das Karzinogen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) sowie dessen Metabolit Azoxyethan (AOM) zum Einsatz (Druckrey et al., 1967; Corpet & Tache, 2002). Die beiden Prokarzinogene führen spezifisch im Kolon von Labornagern zur Krebsentstehung, da sie über mehrere metabolische Zwischenstufen letztendlich durch Enzyme der Darmflora zu karzinogenen Alkyl-Radikalen aktiviert werden (Onoue et al., 1997; Sohn et al., 2001).

Basierend auf der bereits beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz (siehe Abbildung 2, Kapitel 1.3.2) konnten hinsichtlich der genetischen Veränderungen in beiden Modellen gewisse Übereinstimmungen zur Situation beim Menschen beobachtet werden. Dennoch wurden ebenso Grenzen aufgezeigt, die die Übertragbarkeit auf den Menschen in beiden Fällen in gewisser Weise einschränkt.

Während die beim Menschen initiiierende Mutation des *APC*-Gens die Basis für das hier beschriebene genetische Tiermodell ist, taucht diese Mutation bei der DMH/AOM induzierten Karzinogenese der Ratte nur selten auf (De Filippo et al., 1998). Bei

Betrachtung des *K-RAS*-Gens, das ebenfalls für die Entwicklung eines Tumors beim Menschen charakteristisch ist, zeigen die chemisch induzierten Tumore in den meisten Fällen eine Kongruenz, während die Mutation in Adenomen der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus nicht nachgewiesen wurde (Shoemaker et al., 1997; Dashwood et al., 1998). Die beim Menschen am Ende der Sequenz stehende Mutation des *TP53*-Gens konnte in keinem der genannten Modelle beobachtet werden (Fazeli et al., 1997; De Filippo et al., 1998).

Histopathologisch betrachtet ist die Entwicklung des invasiven Karzinoms über die Zwischenstufen ACF und Adenom im DMH/AOM Modell wiederzufinden, während das Auftreten von ACF und Karzinomen in der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus nur sehr selten ist. Ein weiterer wesentlicher Nachteil des *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modells ist darin zu sehen, dass die Bildung der Adenome vornehmlich im Dünndarm und nicht wie beim Menschen im Kolon stattfindet.

Trotz der bestehenden Differenzen zeigt die Betrachtung der bisher durchgeführten Untersuchungen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse in den Modellen untereinander. Viele Verbindungen, die im Dünndarm der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus die Tumorentstehung hemmten, waren auch im Kolon der DMH/AOM initiierten Ratte protektiv (Corpet & Tache, 2002; Corpet & Pierre, 2003).

#### **1.4.5 Verbindungen mit protektivem Potenzial in der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus**

Die Tatsache, dass Mutation und Verlust des *APC*-Gens nicht nur in der erblich bedingten FAP, sondern auch in 85 % aller sporadischen Karzinome gefunden wurden, macht das *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modell zu einem wichtigen Hilfsmittel in der Identifikation darmkrebspräventiver Wirkstoffe. So wurde bereits eine Vielzahl an Verbindungen in diesem Modell auf ihr chemopräventives Potenzial zur Hemmung der Entstehung intestinaler Tumore untersucht. Einigen polyphenolischen Pflanzeninhaltsstoffen, die z. T. auch in Äpfeln nachgewiesen wurden, konnte dabei eine protektive Wirkung auf die Tumorentstehung nachgewiesen werden. Tabelle 3 enthält eine Auswahl der bereits untersuchten Substanzen.

Die Auswahl an Ergebnissen zeigt, dass sowohl einzelne Verbindungen als auch komplexe Extrakte in physiologisch relevanten Konzentrationen in der Lage waren, die Anzahl an Tumoren im Darm der Mäuse deutlich zu reduzieren.

**Tabelle 3: Einfluss verschiedener Polyphenole auf die Tumorentstehung im *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell (Corpet & Pierre, 2003).**

Verbindung	Dosis <sup>a</sup>	Behandlungseffekt <sup>b</sup> (% Tumore im Vgl. zur Kontrolle)	
		Dünndarm	Kolon
Kaffeesäure-Phenethylster	0.15 %	37*	n.b.
(+)-Catechin	0.10 %	29*	17
Curcumin	0.10 %	36*	n.b.
Epigallocatechin-gallat	0.32 %	55*	n.b.
Quercetin	2.00 %	85	n.b.
Resveratrol	0.20 %	75*	47*
Grüner Tee Extrakt	1.50 %	50*	51

<sup>a</sup>% in Futter oder Flüssigkeit; <sup>b</sup>Behandlungseffekt berechnet als:  $100 \times (\text{Tumorzahl der Behandlungsgruppe}) / (\text{Tumorzahl der Kontrollgruppe})$ ; Prozentwerte < 100 kennzeichnen eine protektive Wirkung; \* = signifikante Effekte; n.b. = nicht bestimmt

## 1.5 Zielsetzung

Diese Arbeit ist Teil des vom BMBF geförderten nationalen Forschungsnetzwerkes „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten der Prävention durch die Ernährung“. Das interdisziplinäre Projekt hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Wirkung von Apfelsaft auf die Entstehung maligner sowie entzündlicher Erkrankungen des Darms zu beleuchten, protektive Inhaltsstoffe zu identifizieren und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzuklären.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit umfasste die Charakterisierung des darmkrebspräventiven Potenzials von Apfelsaft und polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen *in vitro* und *in vivo*. In Zusammenarbeit mit der Forschungsanstalt Geisenheim und der Universität des Saarlandes sollten zunächst aktive Stoffe und Stoffgemische aus polyphenolreichen Apfelsaftextrakten hergestellt werden. Durch den Einsatz einer Reihe von zell- und enzymbasierten Testsystemen sollten im Rahmen einer „*activity-guided fractionation*“ Substanzklassen oder einzelne Verbindungen mit chemopräventivem Potenzial identifiziert werden. Die Ergebnisse sollten Aufschluss darüber geben, welche Mechanismen in den verschiedenen Phasen der Krebsentstehung durch die Apfelinhaltsstoffe modulierbar sein könnten. Weiterhin galt es, die *in vitro*

untersuchten Effekte auf ihre Relevanz *in vivo* zu prüfen. In der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus, einem Modell zur genetisch induzierten Karzinogenese im Darm, sollte der Einfluss von trübem Apfelsaft und polyphenolreichem Apfelextrakt auf die Entstehung intestinaler Tumore untersucht werden. Die gleichzeitige Verwendung gesunder Wildtypmäuse sollte Hinweise auf die Unbedenklichkeit der Interventionen hinsichtlich toxischer Eigenschaften geben. Zur mechanistischen Aufklärung sollte der Einfluss der Behandlungen auf die Zellproliferation und auf Proteine des Wnt-Signalweges im Darm der Tiere betrachtet werden.

Die Charakterisierung chemopräventiver Mechanismen und der erfolgreiche Einsatz potenzieller Wirkstoffe im Tiermodell stellen eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von Interventionsstudien am Menschen dar. Erkenntnisse aus Humanstudien bilden letztlich die Basis, auf der innovative Ernährungskonzepte aufgestellt werden können, um neue Strategien zur Prävention von Darmkrebs zu entwickeln.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Herstellung und Analytik der Testsubstanzen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten polyphenolreichen Extrakte sowie der eingesetzte Apfelsaft wurden von Dr. Frank Will und Prof. Dr. Helmut Dietrich (Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung) hergestellt und analysiert. Die Fraktionierung von zwei Extrakten sowie die Analytik der daraus hervorgegangenen Fraktionen wurde von Frau Henriette Zefner, Arbeitskreis Prof. Dr. Hans Becker (Pharmakognosie und Analytische Phytochemie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die Analytik der Procyanidine erfolgte durch Dr. R.W. Owen und Gerhard Erben (DKFZ, Heidelberg).

#### 2.1.1 Polyphenolreiche Extrakte

##### *Extrakt AS02*

Ausgangsmaterial für die Herstellung des Extraktes war ein klarer Direktsaft aus verschiedenen Apfelsorten der Ernte 2002. Die Äpfel stammten vom Fachgebiet Obstbau der Forschungsanstalt Geisenheim bzw. wurden von lokalen Produzenten zugekauft. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung der verwendeten Obstsorten nach Gewichtsanteilen in % aufgeführt.

**Tabelle 4: Gewichtsanteile der für den AS02 Extrakt verwendeten Obstsorten.**

Sorte	Gewichtsanteil (%)
Topaz	25 %
Winterrambur	22.5 %
Gemischtes Tafelobst	20 %
Bohnapfel	17.5 %
Bittenfelder	15 %

Zur Herstellung des Saftes wurden die Äpfel zunächst unter Verwendung einer Hammermühle (Bellmer; Niefern, Deutschland) zerkleinert und der Saft anschließend in einer HP-L 200 Horizontalpresse (Bucher; Niederweningen, Schweiz) extrahiert. Nach Zentrifugation mittels eines Separators (SA R 3036, Westfalia; Oelde, Deutschland) wurde der Saft pasteurisiert (85°C, 30 s) und in sterile Tanks eingelagert. Der so gewonnene Trübsaft wurde bei 85°C in 0.75 l Flaschen abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Gewinnung des Extraktes erfolgte aus Klarsaft, der durch enzymatischen Pektinabbau und anschließende Cross-Flow Mikrofiltration (Bucher-Abcor; Niederweningen, Schweiz; Ausschlussgrenze 0.2 µm) aus dem Trübsaft hergestellt wurde. Mittels Festphasenextraktion wurden die Polyphenole aus 100 l Saft an 5 l des lebensmittelrechtlich zugelassenen Adsorberharzes XAD 16HP (Rohm & Haas; Chauny, Frankreich) adsorbiert und Zucker, organische Säuren sowie Mineralien durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Die Polyphenole wurden mit 96 %igem Ethanol eluiert, durch Einengung des ethanolschen Extraktes in die wässrige Phase überführt und abschließend gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 65 g.

#### *Extrakt AS03B*

Im Gegensatz zum Extrakt AS02 wurde in diesem Fall kein direkter Saft (A-Saft) verwendet, sondern ein Tresterextraktionssaft (B-Saft). Zur Herstellung dieses Saftes wurden ausschließlich die Tafelobstsorten Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold der Ernte 2003 verwendet, die von der VOG Ingelheim bezogen wurden. Mit Hilfe einer Schneidmühle (Seepex; Bottrop, Deutschland) wurden 1200 kg der oben genannten Äpfel zerkleinert und in einer Bandpresse (Flottweg; Vilsbiburg, Deutschland) ausgepresst. Der resultierende A-Saft wurde in der weiteren Verarbeitung nicht berücksichtigt. Stattdessen wurden 500 kg des verbleibenden Tresters mit 400 l entmineralisiertem Wasser versetzt und unter Verwendung von jeweils 300 g/t der Pektinasepräparate Rohapect MA-1 und Rohapect AF-2 sowie des Cellulasepräparates Rohament CL (AB Enzymes; Darmstadt, Deutschland) über 2 h bei 50°C unter kontinuierlichem Rühren enzymiert (Will et al., 2000). Nach anschließender Separation erfolgte die Adsorption der Polyphenole mit einer Adsorberanlage im Pilotmaßstab (Bucher-Guyer; Niederweningen, Schweiz). Die mit 55 l Adsorberharz (P-495, Bucher-Alimentech; Auckland, Neuseeland) gefüllte Anlage wurde mit 550 l des

Tresterextraktionssaftes beschickt und mit 200 l entmineralisiertem Wasser gespült. Nach der Elution mit 50 l 96 %igem Ethanol wurde der polyphenolreiche Extrakt wie bereits beschrieben eingengt, in die wässrige Phase überführt und anschließend gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 260 g Extrakt AS03B. Ziel der Herstellung dieses Extraktes war die Anreicherung von Dihydrochalkonen und Quercetinderivaten bei gleichzeitiger Abreicherung von Phenolcarbonsäuren. Letztere durchlaufen während der Tresterextraktion eine verstärkte Oxidation.

#### *Extrakt AS04*

Aufgrund der schlechten Ernte im Jahr 2003 konnte kein weiterer geeigneter A-Saft zur Extraktproduktion hergestellt werden. Um dennoch ausreichend Material von einem dem AS02 ähnlichen Extrakt zur Verfügung stellen zu können, wurde eine Mischung folgender Säfte verwendet: 250 l des zur Herstellung des Extraktes AS02 verwendeten Saftes, 50 l des zur Herstellung des AS03B verwendeten Tresterextraktionssaftes sowie je 200 l verschiedener Mostapfelsäfte der Sorten Schafnase, Bohnapfel und Winterrambur. Die Adsorption der Polyphenole aus 900 l Saft erfolgte wie bereits für den Extrakt AS03B beschrieben mit einer Ausbeute von 824 g.

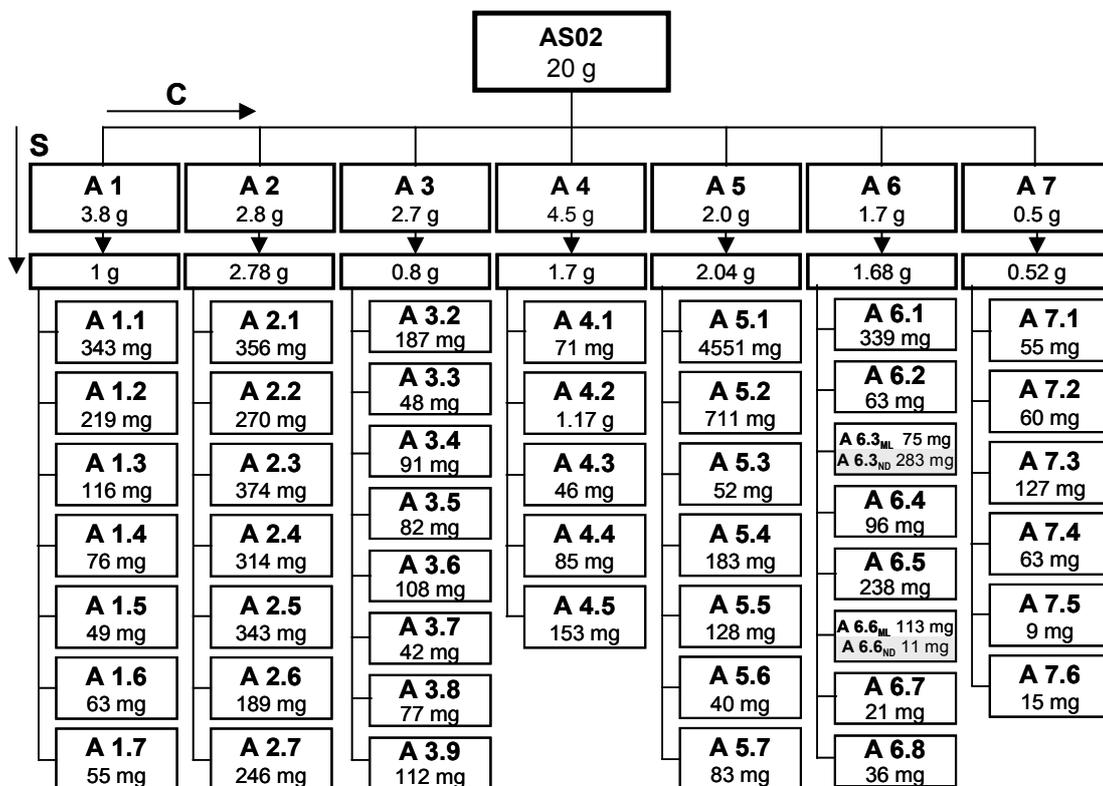
#### *Analytik der Polyphenole in den Extrakten*

Die quantitative Bestimmung der polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffe wurde mit einer Lösung von 1 g/l des Extraktes in 10 % wässrigem MeOH gelöst durchgeführt. Die Trennung der Polyphenole erfolgte unter Verwendung eines 1090 HPLC/DAD Systems (Hewlett-Packard; Böblingen, Deutschland) ausgestattet mit einer 250 x 4.6 mm Aqua 5 µm C18 Säule sowie einer 4 x 3 mm C18 ODS Vorsäule (Phenomenex; Aschaffenburg, Deutschland). Als Eluenten wurden Acetonitril und 2 % Essigsäure verwendet. Zur Auswertung wurden Flavanole und Dihydrochalkone bei 280 nm, Phenolcarbonsäuren bei 320 nm und Quercetinderivate bei 360 nm detektiert (Schieber et al., 2001).

### **2.1.2 Fraktionierungen**

Die Fraktionierung der Extrakte AS02 und AS03B erfolgte unter Verwendung der Methoden der Zentrifugalverteilungschromatographie (CPC) sowie der Säulen-

chromatographie an Sephadex-LH20-Gel. Bei Verwendung der CPC erfolgt eine Trennung in Abhängigkeit von der Polarität der Verbindungen. Polare Substanzen befinden sich in früheren Fraktionen. Das Sephadex-LH20-Gel trennt nach der Größe, wobei kleinen Verbindungen zuerst und komplexe Verbindungen erst später von der Säule gelöst werden. Während im Falle des AS02 zunächst Fraktionen über CPC gewonnen wurden, die anschließend über die Sephadex-Säule subfraktioniert wurden (siehe Abbildung 5), erfolgte die Auftrennung des AS03B erst über die Sephadex-Säule mit anschließender CPC-Trennung (siehe Abbildung 6).



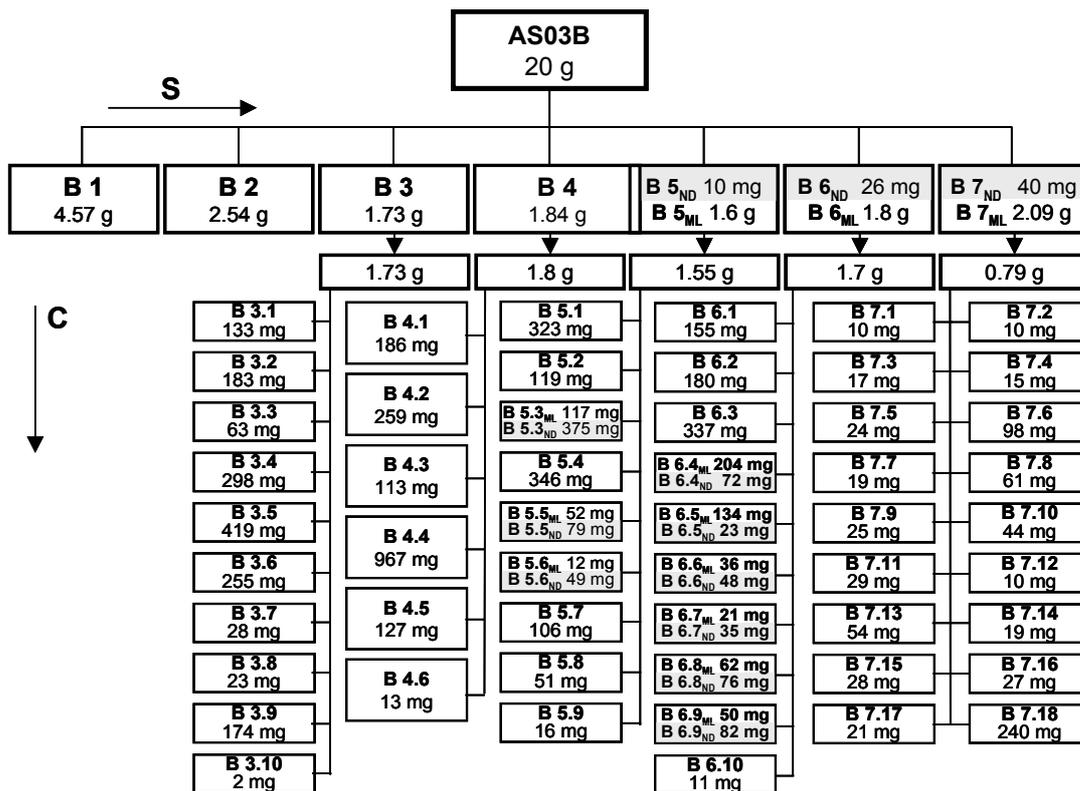
**Abbildung 5: Trennschema der Fraktionierung der AS02 durch CPC-Trennung (C) und anschließender säulenchromatographischer Trennung an Sephadex-LH20 Gel (S).** Bei grau unterlegten Feldern handelt es sich um Reinsubstanzen, die spontan ausgefallen sind.

Die Kontrolle der Trennleistung der jeweils ersten Trennung erfolgte in beiden Fällen unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie. Die methodische Erläuterung der Trennungen wurde im Rahmen der Dissertation von Frau Henriette Zeßner (Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2005) beschrieben und ist im Folgenden als Zitat wiedergegeben.

### *Centrifugal Partition Chromatography*

„Die Umdrehungszahl des 1 l Rotors wurde nach Befüllung mit stationärer Oberphase auf 800 U/min eingestellt. Die Befüllung mit mobiler Unterphase erfolgte bei 10 ml/min. Bis zur Gleichgewichtseinstellung des Systems wurden 450 ml der stationären Phase durch mobile Phase verdrängt. Der Druck innerhalb des Systems betrug bei dieser Flussgeschwindigkeit 10 bar. Die Injektion der Probe, die in ca. 15 ml Unterphase gelöst wurde, erfolgte ebenfalls bei einem Fluss von 2 ml/min. Der Fluss wurde direkt nach der Injektion der Probe wieder auf 10 ml/min erhöht. Jeweils kurz vor Beginn der Probenelution begann sich das Phasenverhältnis des eluierten Lösungsmittelgemisches umzudrehen, sodass fast nur stationäre Phase aus dem System verdrängt wurde. Dieses umgedrehte Phasenverhältnis zeigte sich auch noch über den Beginn der Probenelution hinaus. Um ein weiteres Ausbluten der stationären Phase zu verhindern, wurde der Fluss der mobilen Phase jeweils nach Auftreten des umgedrehten Phasenverhältnisses auf 7 ml/min herabgesetzt. Der Druck innerhalb des Systems verminderte sich dadurch auf ca. 7 bar, und das Phasenverhältnis zwischen mobiler und stationärer Phase normalisierte sich wieder dahingehend, dass nur noch mobile Phase eluiert wurde.

Die Trennung wurde bei 7 ml/min jeweils so lange durchgeführt, bis der angeschlossene UV-Detektor, der die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm vermaß, keine Absorption mehr aufwies. Nach Beendigung der Trennung wurde die stationäre Phase aus dem System zurückgewonnen.“



**Abbildung 6:** Trennschema der Fraktionierung des AS03B an Sephadex-LH20 Gel (S) mit anschließender Subfraktionierung durch CPC (C). Bei grau unterlegten Feldern handelt es sich um Reinsubstanzen, die spontan auskristallisiert sind.

### Säulenchromatographie

„Die Säulenchromatographie erfolgte an Sephadex-LH20 Gel der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden. Zunächst erfolgte die Trennung an offenen Glassäulen. Die Durchflussrate des Eluenten wurde durch den Quellungsgrad des Gels und die Schwerkraft bestimmt. Später wurde an geschlossenen Mitteldrucksäulen mit einem definierten Fluss von 3-6 ml/min gearbeitet. Dafür wurde eine Glassäule ECO, 25 x 2000 mm, der Firma Kronlab (Sinsheim) verwendet, die mit einer Sinterglasfritte (10-16 µm) ausgestattet war. Das Fließmittel wurde mit einer Altex-Pumpe, Modell 110 A, gefördert. Vor Aufgabe der Probe auf die Säule wurde die Probe in dem jeweiligen Fließmittel gelöst, und eventuelle Schwebstoffe wurden bei 3000 U/min über 10 min abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde danach über Glaswatte filtriert. Die Aufgabe der Proben auf das Gelbett erfolgte bei den offenen Glassäulen mittels Einsickermethode, wobei die aufzutrennende Probe in möglichst wenig Fließmittel gelöst als konzentrierte Startbande auf das Gelbett aufgegeben wurde. Die Elution wurde gestartet, nachdem die Probe gerade vollständig in das Gelbett

eingesickert war. Die Aufgabe auf das geschlossene Mitteldrucksystem erfolgte über Injektion der Probenlösung in ein Rheodyne Aufgabesystem, an das eine 50-ml-Probenschleife angeschlossen war. Das Eluat wurde jeweils durch einen zeitgesteuerten Fraktionssammler in Fraktionen, die ca. 5 ml umfassten, eingeteilt.“

Die beschriebene CPC-Methode enthält die Standardbedingungen der AS02-Fraktionierung. Im Rahmen der Subfraktionierung der Fraktionen des AS03B wurden die Bedingungen teilweise variiert. Die ausführliche Darstellung der Methoden erfolgte im Rahmen der Dissertation von Frau Henriette Zeßner (Zeßner, 2005).

#### *Analytik der Extrakte, Fraktionen und Subfraktionen*

Zur qualitativen Bestimmung der polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffe wurden die Fraktionen in 50 % wässrigem MeOH gelöst. Die Trennung der Polyphenole erfolgte über Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines *Separation Module 2690 „Alliance“* (Waters; Milford, USA) ausgestattet mit einer 250 x 4.6 mm Aqua 5 µm C18 Säule (Phenomenex; Aschaffenburg, Deutschland). Als Eluenten wurden Acetonitril und 0.1 % Trifluoressigsäure verwendet. Zur Auswertung mit Hilfe eines Photodiodenarray-(PDA)-Detektors 996 (Waters; Milford, USA) wurden Flavanole und Dihydrochalkone bei 280 nm, Phenolcarbonsäuren bei 320 nm und Quercetinderivate bei 360 nm detektiert. Da sich das verwendete Umkehrphasensystem bei der Analytik der letzten Fraktion des AS03B als ungeeignet erwies, und es sich hierbei aufgrund der späten Eluierung von der Sephadex-LH20 Säule vermutlich um polymere Procyanidine handelte, wurde für die Analytik dieser Fraktion eine Normalphasen-HPLC verwendet. Ein 1090 HPLC/DAD System (Hewlett Packard; Böblingen, Deutschland) wurde dazu mit einer 250 x 4.6 mm Luna Si 5 µm Säule (Phenomenex; Aschaffenburg, Deutschland) ausgestattet, wobei die Trennung unter Verwendung der Fließmittel Dichlormethan, Methanol und 50 % Essigsäure in Wasser erfolgte. Die Procyanidine wurden bei 280 nm detektiert (Zeßner, 2005).

Die Analytik der Procyanidin-Subfraktionen B 7.1 bis B 7.18 erfolgte zunächst über dünnschichtchromatographische Untersuchungen, wobei ein Fließmittelsystem aus Toluol, Aceton und Essigsäure verwendet wurde. Zur Detektion wurde die Platte mit einer 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimidlösung und nachfolgend mit einer Natriumcarbonatlösung

besprüht (Zeßner, 2005). Ferner wurden die Molekulargewichte der in den Subfraktionen enthaltenen Verbindungen über Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie erfasst. Dies wurde an einer Tripel-Quadrupol-Anlage (Finnigan-MAT; San Jose, CA, USA) durchgeführt, die mit einer Nanoelektrosprayquelle ausgestattet war. Es wurde mit den Lösungsmitteln Methanol und 0.5 % Ameisensäure gearbeitet. Diese Untersuchungen wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum, Zentrale Spektroskopie, durch Herrn Gerhard Erben durchgeführt.

### **2.1.3 Trüber Apfelsaft**

Der für das Projekt verwendete naturtrübe Apfelsaft wurde vorwiegend aus Tafeläpfeln der Sorten Topaz und Jonagold hergestellt, die von verschiedenen Anbietern bezogen wurden. Die Herstellung erfolgte analog zur Herstellung des Saftes, aus dem der AS02 Extrakt gewonnen wurde. Die Analytik stimmte ebenfalls mit der der Extrakte überein.

### **2.1.4 Reinsubstanzen**

Ein Großteil der in den Extrakten, Fraktionen und Subfraktionen detektierten Verbindungen wurde entweder von Fr. Zeßner zur Verfügung gestellt oder als Referenzsubstanzen kommerziell erworben (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Herkunft der getesteten Reinsubstanzen.**

4-Cumaroylchinasäure <i>p</i> -Cumarsäure Ferulasäure (-)-Epicatechin Procyanidin B1 Procyanidin B2 Procyanidin C1 Procyanidin-Tetramer Procyanidin-Pentamer Phloridzin Phloretin-2`-xyloglukosid Quercetin Quercetin-3-arabinofuranosid Quercetin-3-arabinopyranosid Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid) Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin) Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin) Quercetin-3-rutinosid (Rutin) Quercetin-3-xylosid (Renoutrin)	Von H. Zeßner isoliert und zur Verfügung gestellt
(+)-Catechin Chlorogensäure (-)-Epicatechin Kaffeesäure Phloridzin Phloretin Quercetin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid) Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin) Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

## 2.2 Testbatterie zum chemopräventiven Screening im Rahmen der „activity-guided fractionation“

### Materialien

2,2-Azobis-(2-aminopropan) dihydrochlorid (AAPH)	Polyscience (Warrington, PA, USA)
NADP+ (β-Nikotinamid-adenin-dinukleotid Phosphat)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
CEC (3-Cyano-7-ethoxycumarin)	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
DBF ( <i>o</i> -Benzyl-fluorescein-benzyl-ester)	Natutec GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Humane Aromatase (Cyp 19)	Gentest, BD (Heidelberg, Deutschland)
Xanthinoxidase	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Alle weiteren Chemikalien, Enzyme und Substrate wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Photometer SpectraMax 340 PC	Molecular Devices (München, Deutschland)
Fluorimeter SpectraMax Gemini XS	
Fluorimeter Cytofluor 4000	PerSeptive Biosystems (Framingham, MA, USA)
Photometer $\mu$ Quant UV	Deelux Labortechnik (Gödenstorf, Deutschland)
Clark-Sauerstoff-Elektrode	Hansatech Ltd. (Kings Lynn, UK)

### 2.2.1 Hemmung der Cytochrom P450 1A-Aktivität (betreut durch K. Klimo)

#### *Puffer und Lösungen*

<b>Cyp-Phosphatpuffer, pH 7.4</b>	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
<b>Cyp-Reaktionspuffer</b>	Endkonzentration
CEC	5 $\mu$ M
NADP <sup>+</sup>	1.3 mM
Glukose-6-Phosphat	3.3 mM
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	0.5 U

#### *Durchführung*

Die Hemmung des Phase I Enzyms Cytochrom P450 1A (Cyp 1A) wurde unter Verwendung einer modifizierten Methode nach Crespi (Crespi et al., 1997) untersucht. Hierzu wurden Homogenate von H4IIE Rattenhepatomzellen verwendet, die zur Induktion von Cyp 1A 39 h mit 10  $\mu$ M  $\beta$ -Naphthoflavon behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen, in Cyp-Phosphatpuffer aufgenommen, in Aliquots von 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für jedes Experiment wurde ein Aliquot des Homogenats bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, unter Verwendung einer 18 gauge Kanüle homogenisiert und 1:10 verdünnt im Test eingesetzt. 90  $\mu$ l des verdünnten Zelllysats wurden mit 100  $\mu$ l Cyp-Reaktionspuffer in eine 96-Lochplatte pipettiert. Abschließend erfolgt die Zugabe von je 10  $\mu$ l Testsubstanz in acht Konzentrationen einer 1:1 Reihenverdünnung in 10 % DMSO bzw. dem als Positivkontrolle verwendeten  $\alpha$ -Naphthoflavon in einer Verdünnungsreihe von 3.9 bis 500 nM in Triplikaten. Die Dealkylierung von 3-Cyano-7-ethoxycumarin zu 3-Cyano-7-hydroxycumarin wurde anhand der zeitabhängigen Substratumsatzrate über einen Zeitraum von 40 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  am Cytofluor (Anregung bei 408/20 nm, Emission bei 460/40 nm) bestimmt. Anschließend

erfolgte eine Normalisierung der Werte auf den Proteingehalt, der unter Verwendung der BCA Methode (Smith et al., 1985) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt wurde. Die optische Dichte (OD) wurde dabei bei 562 nm im Photometer gemessen.

## 2.2.2 Induktion der NAD(P)H:Chinonreduktase (betreut durch Dr. C. Gerhäuser)

### *Puffer und Lösungen*

<b>Chinonreduktase-Reaktionspuffer</b>	Endkonzentration
BSA (Bovines Serum Albumin)	0.06 %
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	0.9 mM
Tris-HCl	25 mM
Tween-20	0.01 %
FAD (Flavin-adenin-dinukleotid)	5 µM
Glukose-6-Phosphat	1 mM
NADP+	30 µM
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	2 U/ml
Menadion (gelöst in Acetonitril)	50 µM

<b>Digitonin-Lösung</b>	Endkonzentration
EDTA, pH 7.8	20 mM
Digitonin	0.8 %

<b>Kristallviolett-Färbelösung</b>	Endkonzentration
Kristallviolett	0.2 %
Ethanol	2 %

<b>Kristallviolett-Solubilisierungslösung</b>	Endkonzentration
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0.5 %
Ethanol	50 %

### *Durchführung*

Zur Identifikation von Substanzen, die in der Lage sind, Phase 2 Enzyme zu induzieren, fand eine modifizierte Methode nach Prochaska zur Messung der NAD(P)H:Chinonreduktaseaktivität (QR) in kultivierten Hepa 1c1c7 Maushepatomzellen Verwendung (Prochaska et al., 1992). Die Zellen wurden in 96-Lochplatten mit  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in 200 µl  $\alpha$ -MEM/10 % FCS (Foetales Kälberserum) pro Loch ausgesät und für 24 h präinkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und 10 µl Testsubstanz in 10 %

DMSO (acht serielle 1:1-Verdünnungen, Endkonzentrationen 0.4 – 50  $\mu\text{M}$ ) sowie als Positivkontrolle  $\beta$ -Naphthoflavon in einer Endkonzentration von 0.15 – 2  $\mu\text{M}$  in Duplikaten zugegeben. Nach 48 h wurde das Medium verworfen, die Platten drei mal mit PBS gewaschen und die Zellen bei 37°C für 10 min in 50  $\mu\text{l}$  Digitonin-Lösung lysiert. Die Platten wurden für weitere 10 min bei RT geschüttelt, und im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Chinonreduktase-Reaktionspuffer pro Loch. Die NADP-abhängige, Menadiol-vermittelte Reduktion des im Puffer enthaltenen MTTs in blaues Formazan wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Die Induktion der QR-Aktivität wurde aus dem Verhältnis der spezifischen Enzymaktivität behandelter Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt, woraufhin die Berechnung des CD-Wertes (Konzentration zur Verdopplung der spezifischen QR-Aktivität) erfolgte. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde parallel an identisch behandelten Platten eine Kristallviolett-Färbung vorgenommen (Prochaska et al., 1992). Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  Kristallviolett-Färbelösung in jedes Loch gegeben und nach 15-minütiger Inkubation bei RT überschüssiger Farbstoff durch Spülen mit Wasser entfernt. Die an die Zellmembranen gebundene Farbe wurde unter Verwendung der Solubilisierungslösung 1 h bei 37°C gelöst, und die OD bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen.

### **2.2.3 Abfangen von 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl Radikalen (betreut durch K. Klimo)**

Das Radikalfängerpotenzial wurde photometrisch durch Reaktion mit freien 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) Radikalen modifiziert nach van Amsterdam bestimmt (van Amsterdam et al., 1992). DPPH besitzt aufgrund seiner Struktur mit einem ungepaarten Elektron ein Absorptionsmaximum bei 517 nm, was sich in der tiefvioletten Färbung der gelösten Substanz ausdrückt. Durch Paarung des einzelnen Elektrons, beispielsweise durch Übertragung eines Wasserstoff-Atoms von einem Radikalfänger auf das DPPH-Radikal, entsteht ein hypsochromer Effekt, der photometrisch messbar ist.

Im 96-Loch-Mikrotiterplattenformat wurden 10  $\mu\text{l}$  der Testsubstanzen als Duplikate in acht seriellen 1:1 Verdünnungen (in 100 % DMSO) mit 190  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  DPPH für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Radikalfängerpotenzial wurde nach photometrischer Messung bei 515 nm mit der Lösungsmittelkontrolle (0 % Radikalfang) und der Positivkontrolle

Vitamin C (250  $\mu$ M Endkonzentration, 100 % Radikalfang, als Blank verwendet) verglichen und daraus die halbmaximale Radikalfängerkonzentration  $SC_{50}$  (half-maximal scavenging concentration) berechnet.

#### 2.2.4 Abfangen von Superoxidanion-Radikalen gebildet durch Hypoxanthin/Xanthinoxidase (betreut durch K. Klimo)

##### *Puffer und Lösungen*

H/XO-Reaktionspuffer, pH 8	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
EDTA	0.1 mM
Hypoxanthin	50 $\mu$ M
XTT (Natrium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid)	25 $\mu$ M
Xanthinoxidase	1.5 U/ml

##### *Durchführung*

Superoxidanion-Radikale wurden in Hypoxanthin/Xanthinoxidase (H/XO) Reaktionspuffer durch Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure durch Xanthinoxidase generiert. Die Quantifizierung erfolgte über die Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes XTT zum orangenen Formazan, das bei 480 nm photometrisch erfasst werden kann. Durch die kinetische Messung über 5 min wurden  $V_{max}$ -Werte ermittelt. Aus den Werten von fünf seriellen 1:1 Verdünnungen erfolgte die Berechnung der  $SC_{50}$ . Die Testsubstanzen wurden in Duplikaten getestet. Als Kontrolle wurde Superoxiddismutase (SOD) in einer Endkonzentration von 30 U/ml verwendet. Um einen direkten hemmenden Effekt der Substanzen auf die Xanthinoxidase auszuschließen, wurde unter identischen Bedingungen die Bildung von Harnsäure ohne Zugabe von XTT bei 290 nm im  $\mu$ Quant gemessen. Im Reaktionsgemisch wurden 50  $\mu$ M Hypoxanthin durch 100  $\mu$ M Xanthin ersetzt. Allopurinol wurde als bekannter Hemmstoff der Xanthinoxidase als Positivkontrolle eingesetzt. Die Methode wurde nach Ukeda (Ukeda et al., 1997) modifiziert und an das 96-Loch-Plattenformat angepasst.

### 2.2.5 Messung der “Oxygen (Peroxy) Radical Absorbance Capacity” (betreut durch R. Niewöhner)

#### *Puffer und Lösungen*

ORAC-Puffer, pH 7.4	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	75 mM
Fluorescein	0.21 µM

#### *Durchführung*

Das Potenzial von Testsubstanzen, Peroxylradikale abzufangen, wurde anhand des modifizierten *oxygen radical absorbance capacity*-Tests (ORAC) nach Cao und Prior (Cao & Prior, 1999), ebenfalls angepasst an das 96-Loch-Plattenformat, bestimmt. Hierbei wurde Fluorescein als redox-sensitives, fluoreszierendes Indikatormolekül verwendet. Die Freisetzung von Peroxylradikalen erfolgte durch 2,2-Azobis-(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH). 170 µl ORAC-Puffer wurden dazu mit 10 µl Testsubstanz in Quadruplikaten versetzt. Als Positivkontrolle wurde das wasserlösliche Vitamin E Analog Trolox in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt. Durch Zugabe von 20 µl 190.81 mM AAPH zum Puffer wurde die Reaktion initiiert und die Abnahme der Fluoreszenz bei 37°C über einen Zeitraum von ca. 120 min im Cytofluor (Anregung bei 530/25 nm, Emission bei 585/30 nm) kontinuierlich bis zum vollständigen Fluoreszenzverlust gemessen. Die Ergebnisse der Testsubstanzen, die in einer Endkonzentration von 1 µM bzw. im Falle der Extrakte und Fraktionen von 0.4 µg/ml vorlagen, wurden zur Positivkontrolle in Relation gesetzt und als ORAC-Einheiten ausgedrückt, wobei eine Einheit dem Schutz des Fluoreszenzabfalls von Fluorescein durch 1 µM Trolox entspricht.

## 2.2.6 Hemmung der Aromatase (Cytochrom P450 19) (betreut durch K. Klimo)

### *Puffer und Lösungen*

<b>Aromatase Kofaktor-Verdünnungspuffer, pH 7.4</b>	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NADP <sup>+</sup>	5.2 mM
Glukose-6-Phosphat	13.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	13.2 mM
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	1.6 U/ml

<b>Aromatase Enzym-Substratgemisch, pH 7.4</b>	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
Humane rekombinante Aromatase (Cyp 19)	2 nM
DBF (O-benzyl fluorescein benzyl ester)	0.4 µM

### *Durchführung*

Die Identifikation von potenten Inhibitoren der Aromatase erfolgte unter zu Hilfenahme der Methode nach Stresser (Stresser et al., 2000) mittels rekombinanter humaner Aromatase sowie dem Substrat DBF. Das Substrat wird durch die Aromatase dealkyliert, wodurch es zur Bildung eines Fluoresceinmonobenzylesters kommt, der nach Hydrolyse mit NaOH fluorimetrisch bestimmt werden kann.

Die Bestimmung der Aromataseaktivität erfolgte in 100 µl des Kofaktor-Verdünnungspuffers. Nach Vorinkubation des Gemisches bei 37°C für 10 min wurden 10 µl der Testsubstanzen (acht serielle 1:1 Verdünnungen, Endkonzentration von 0.4 - 50 µM) in Duplikaten sowie 10 % DMSO als Negativkontrolle bzw. Ketoconazol in Endkonzentrationen von 0.4 - 25 µM als Positivkontrolle hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe des Aromatase Enzym-Substratgemisches gestartet und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2.2 N NaOH gestoppt. Um ein adequates Signal/Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurde die Platte weitere 2 h bei 37°C inkubiert, bevor die Messung im SpectraMax Fluorimeter (Anregung bei 490 nm, Emission bei 530 nm, mit einem cutoff von 515 nm) erfolgte. Die Ergebnisse wurden in % Hemmung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben und zur Berechnung von IC<sub>50</sub> Werten verwendet.

### 2.2.7 Hemmung der Cyclooxygenase-1-Aktivität (betreut durch J. Knauff)

#### *Puffer und Lösungen*

Cox-Reaktionspuffer, pH 7.4	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M
Hydrochinon	1 mM
Hämin	0.01 mM
Cyclooxygenase-1 (aus Schafsamenblasenmikrosomen)	2 U/ml

#### *Durchführung*

Die Aktivitätsbestimmung der Cyclooxygenase-1 (Cox-1) basiert auf der Messung der Sauerstoffmenge, die während der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen verbraucht wird (Jang et al., 1997).

Das Reaktionsgemisch (988 µl) wurde für 90 s mit 10 µl Testsubstanz bzw. DMSO als Negativkontrolle bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 50 mM Arachidonsäure in Ethanol (Endkonzentration 100 µM) gestartet und der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe einer Clark-Sauerstoff-Elektrode für 20 s gemessen. Zur Berechnung wurde die über den Sauerstoffverbrauch erfasste Cox-1-Aktivität der DMSO Kontrolle gleich 100 % gesetzt und die Werte für die Testsubstanzen in % der Kontrolle ausgedrückt.

## 2.3 Zellkulturexperimente

#### *Materialien*

McCoy's 5A Medium, modifiziert	Sigma (Steinheim, Deutschland)
FCS (Foetales Kälberserum, Gold)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco BRL Invitrogen (Eggenstein, Niederlande)
SRB (Sulforhodamin B)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
TCA (Trichloressigsäure)	Karl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

*Puffer und Lösungen*

<b>PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4</b>	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	120 mM
KCl	2.7 mM

<b>SRB-Lösung</b>	Endkonzentration
SRB	0.4 %
Essigsäure	1 %

**2.3.1 Kultivierung**

Die Zellkulturexperimente wurden mit den humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT116 sowie der daraus durch homologe Rekombination generierten p21(-/-) Zelllinie 8054 (Waldman et al., 1995) durchgeführt, die von Prof. Bert Vogelstein (John Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Zellen wurden in McCoy's 5A Zellkulturmedium unter Zusatz von 5 % FCS bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage unter Verwendung von Trypsin-EDTA passagiert.

**2.3.2 Proliferationshemmung**

HCT116 Zellen ( $2.5 \times 10^4$ /ml) und 8054 Zellen ( $3.5 \times 10^4$ /ml) wurden in 96-Loch-Platten (200 µl/Loch) in McCoy's 5A Medium ausgesät. Nach 24 h erfolgte im Anschluss an einen Mediumwechsel die Behandlung mit den in DMSO gelösten Testsubstanzen. Die Zellen wurden dabei in sechs Konzentrationen, hergestellt durch serielle 1:1 Verdünnungen jeder Substanz, in Duplikaten mit einer Endkonzentration von 0.5 % DMSO für 72 h inkubiert. Zusätzlich erfolgte als Negativkontrolle die Behandlung mit 0.5 % DMSO und mit Xanthohumol (0.4 bis 50 µM) als Standardsubstanz. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium verworfen und die Zellen für 30 min mit 50 µl 10 % Trichloressigsäure (TCA) bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Platten mit Leitungswasser gespült und getrocknet. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 75 µl SRB-Lösung für 15 min bei RT. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrfaches Spülen mit 1 % Essigsäure entfernt und die Platte wiederum getrocknet. Der gebundene Farbstoff wurde anschließend in

10 mM Tris Base (200 µl/Loch) gelöst und im Photometer bei 515 nm gemessen (Skehan et al., 1990). Zur Bestimmung der Zellzahl zum Zeitpunkt der Behandlung wurde eine Platte mit unbehandelten Zellen 24 h nach Aussaat fixiert.

### 2.3.3 Auswertung

Die Berechnung der antiproliferativen Aktivität basierte auf dem Verhältnis der Absorption behandelter Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, nachdem die Werte um die Absorption zum Zeitpunkt der Behandlung korrigiert wurden. Dies ermöglichte die Differenzierung zwischen zytostatischen und zytotoxischen Effekten.

Die Ergebnisse von mindestens fünf seriellen Verdünnungen wurden herangezogen, um mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 und Table Curve, Jandel (Version 2.0) IC<sub>50</sub>-Werte zu berechnen.

## 2.4 Western Blot

### Materialien

Milchpulver Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Streptavidin HRP Hyperfilm™	Amersham (Braunschweig, Deutschland)
Biotinylierter SDS WM Standard Mix	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
PVDF Membran Miniblotapparatur, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Minigelelektrophorese-Set, Mini-Protean 3 cell	Bio-Rad (München, Deutschland)
Titan-Ultraschall-Desintegrator, Vibra cell	Sonics Materials (Danbury, Connecticut, USA)
Entwicklermaschine, Curix 60	AGFA-Gevaert (Köln, Deutschland)

### Lösungen und Puffer

1 x SDS-Probenpuffer (Lagerung bei RT)	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 6.8	62.5 mM
SDS	2 % (w/v)
Glycerin	10 %
DTT	50 mM
Bromphenol-Blau	0.01 % (w/v)

<b>SDS-Polyacrylamidgel</b> (1.5 mm Dicke)		Sammelgel [ml]	Trenngel [ml]		
			10 %	11 %	12 %
	Wasser	2.5	7.0	6.3	5.8
30 % / 1 %	Acrylamid/Bisacrylamid	2.0	5.6	6.3	6.8
1.5 M	Tris-Puffer, pH 6.8	1.5			
0.5 M	Tris-Puffer, pH 8.8			4.25	
10 %	SDS	0.06		0.17	
10 %	APS	0.03		0.1	
	TEMED	0.006		0.01	

<b>10 x Laufpuffer (Lagerung bei RT)</b>		Endkonzentration
Tris-Base		250 mM
SDS		10 % (w/v)
Glycin		1.92 M
Vor Gebrauch 1:10 mit VE-Wasser verdünnen		

<b>Transferpuffer (Lagerung bei 4°C)</b>		Endkonzentration
Tris-Base		25 mM
Glycin		192 mM
SDS		0.025 % (w/v)
Methanol		15 % (v/v)

<b>TBS-T-Puffer (Lagerung bei RT)</b>		Endkonzentration
Tris-HCl, pH 7.4		10 mM
NaCl		100 mM
Tween-20		0.05 %

<b>Chemilumineszenz-Lösung</b>		Endkonzentration
Tris-HCl, pH 8.5		100 mM
Luminol		125 mM
<i>p</i> -Cumarsäure		0.2 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		0.01 % (v/v)

<b>Strippuffer</b>		Endkonzentration
Tris-Base, pH 6.8		62.5 mM
β-Mercaptoethanol		100 mM
SDS		2 %

<b>Antikörper</b>	Hersteller	Verdünnung	Inkubation
Rabbit-anti-PARP	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)	1 : 1000	ü.N., 4°C
Mouse-anti-Caspase-8	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)	1 : 1000	ü.N., 4°C
Mouse-anti-β-Actin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	1 : 10.000	1 h, RT

### 2.4.1 Durchführung

#### *Behandlung und Lyse der Zellen*

Die HCT116 Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm in einer Dichte von  $5 \times 10^4$ /ml ausgesät und nach 24 h mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach Inkubation für 24, 48 bzw. 72 h wurden die Zellen vom Überstand befreit, zwei mal mit PBS gewaschen und in 450  $\mu$ l SDS-Probenpuffer lysiert. Zur Erfassung bereits abgelöster Zellen wurde der Zellkulturüberstand nach Vereinigung mit dem zum Spülen verwendeten PBS 8 min bei 1500 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 50  $\mu$ l Probenpuffer resuspendiert und mit dem zuvor gewonnenen Lysat vereint. Unter Verwendung eines Ultraschallstabes wurde das Lysat homogenisiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Ausfällung mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) durch die BCA Methode (Smith et al., 1985). Unter Verwendung eines BSA Standards wurde die Reaktion für 60 min bei 37°C durchgeführt, wobei im Anschluss die optische Dichte in Mikrotiterplatten photometrisch bei 562 nm erfasst wurde.

#### *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot*

30 – 50  $\mu$ g Protein wurden nach Denaturierung bei 95°C für 5 min unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt. In Abhängigkeit von der Größe des zu detektierenden Proteins wurden dazu 10 %, 11 % oder 12 % SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer in einer BioRad Elektrophorese Apparatur bei 100 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss mit Hilfe einer BioRad Blotting Apparatur im „Wet-Blot“-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde dazu für 5 min in 100 % Methanol angefeuchtet und 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Gel und Membran wurden übereinandergelegt und von beiden Seiten mit jeweils zwei bis drei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren eingeschlossen, die wiederum zwischen zwei getränkte Schwämme platziert wurden. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 200 V für 1.5 h unter Kühlung mit Eis.

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungen 1 h bei RT mit 5 % Milchpulver in TBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in

TBS-T wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper bei den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Entsprechend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper unter Zusatz von Streptavidin-HRP (1:2500 – 1:5000; zur Visualisierung des Biotin-markierten Proteinmarkers), wobei zwischen beiden Inkubationen wiederum drei mal 5 min mit TBS-T gewaschen wurde. Eine Kontrolle der geladenen Proteinmenge erfolgte durch den Nachweis von  $\beta$ -Actin auf jeder Membran.

#### 2.4.2 Auswertung

Zur Detektion wurde die Membran für 1 min mit 5 ml Chemilumineszenzlösung inkubiert und anschließend in Klarsicht-Haushaltsfolie eingeschlagen, bevor ein Röntgenfilm aufgelegt wurde. Die Expositionsdauer betrug in Abhängigkeit von der Stärke des Signals 1 s bis 30 min, woraufhin der Film mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt wurde.

### 2.5 *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Interventionsversuch

#### Materialien

RNAlater®	Ambion (Huntington, UK)
RNaseZap®	Ambion (Huntington, UK)
Einmalspatel	Corning Inc. (Schiphol-Rijk, Niederlande)
Heparin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatokrit Zentrifuge, Compur M 1101	VET Eickemeyer (Tuttlingen, Deutschland)
Kapillaren, heparinisiert	In vitro Diagnosticum (Deutschland)
Einbettkassetten	Fischer Scientific Int. Inc. (Houston, USA)
Dissektionsmikroskop	Olympus (Planegg, Deutschland)

#### 2.5.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Im Rahmen der Interventionsstudie wurden insgesamt 90 männliche Tiere eingesetzt. Hierbei handelte es sich zum einen um 54 C57BL/6J-*Apc*<sup>Min/+</sup> Mäuse, die von The Jacksons Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen wurden, und zum anderen um 36 Tiere des entsprechenden Wildtypstammes C57BL/6J, bezogen von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Alle Mäuse wurden im Alter von sechs Wochen geliefert. Die Intervention begann nach einer Akklimatisationsphase von einer Woche.

Die Haltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in Gruppen von maximal sechs Tieren pro Käfig im zentralen Tierlabor des DKFZ, wobei ein künstlicher Hell-Dunkel-Lichtzyklus von 12 Stunden herrschte. Gefüttert wurde ein Haltungsfutter ohne Sojaprotein (Typ 1324, Fa. Altromin, Lage, Deutschland), um eventuelle Einflüsse von in Soja enthaltenen Polyphenolen auszuschließen. Futter und Flüssigkeiten standen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten erfolgte unter Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes. Das Versuchsvorhaben wurde vom Regierungspräsidium Karlsruhe unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/G-24/04 genehmigt.

### 2.5.2 Intervention

#### *Behandlungen*

In der Interventionsstudie wurden zwei polyphenolhaltige Formulierungen verwendet. Als natürliche Quelle für Polyphenole in Form eines Lebensmittels wurde ein trüber Apfelsaft (TAS) eingesetzt (siehe 2.1.3). Weiterhin wurde ein polyphenolreicher Apfelextrakt (PAE) verwendet. Dabei handelte es sich um eine 1:1 Mischung der bereits beschriebenen Extrakte AS03B und AS04 (siehe 2.1.1). Durch die Mischung sollte ein möglichst breites Spektrum an Polyphenolen zum Einsatz kommen.

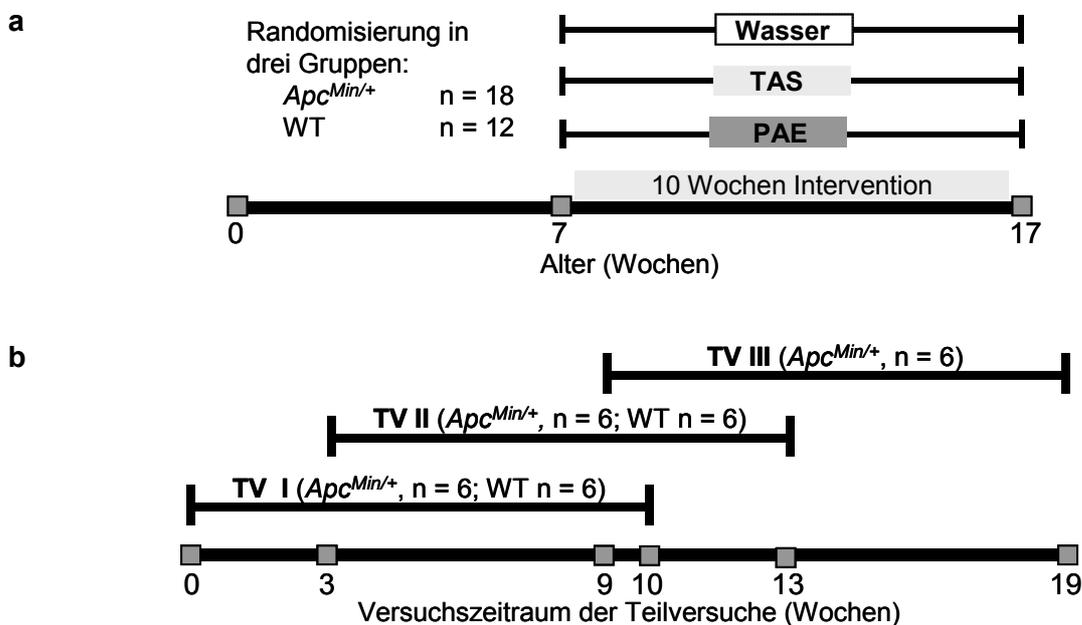
Der naturtrübe Apfelsaft sowie der 0.2 %ig in Trinkwasser gelöste Extrakt wurden anstelle von Wasser verabreicht. Beide Flüssigkeiten wurden täglich erneuert, wobei der Extrakt täglich frisch angesetzt wurde und jeden zweiten Tag eine neue Flasche Saft geöffnet wurde.

#### *Gruppeneinteilung*

Die im Rahmen dieser Studie eingesetzten 90 Tiere setzten sich aus insgesamt sechs Gruppen zusammen. Die Mäuse beider Stämme wurden in je drei randomisierte Gruppen eingeteilt, wobei die Gesamtgruppengröße im Falle des Wildtypstamms (C57BL/6J) 12 und im Falle der C57BL/6J-*Apc*<sup>Min/+</sup> Mäuse 18 Tiere betrug. Neben einer Kontrollgruppe

erhielt dabei je eine Gruppe trüben Apfelsaft und eine Gruppe den 0.2 %ig in Wasser gelösten Polyphenolextrakt anstelle von Wasser (Abbildung 7a).

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Tiere von Seiten des Anbieters musste das gesamte Experiment in drei Teilversuche gegliedert werden, die zeitversetzt durchgeführt wurden (Abbildung 7b). Pro Teilversuch konnten maximal 20  $Apc^{Min/+}$  Mäuse geliefert werden, die in drei Gruppen (Kontroll-, Saft- und Extraktgruppe) mit sechs Tieren pro Gruppe verteilt wurden. Die Gruppeneinteilung der Wildtypmäuse erfolgte entsprechend, wobei diese aufgrund der geringeren Gesamtgruppengröße nur in zwei Teilversuchen mitgeführt wurden.



**Abbildung 7: Gruppeneinteilung der Interventionsgruppen mit C57BL/6- $Apc^{Min/+}$  Mäusen und Tieren des entsprechenden Wildtypstamms (a), gegliedert in die Teilversuche (TV) I, II und III (b). TAS = trüber Apfelsaft, PAE = polyphenolreicher Apfelextrakt.**

### Allgemeiner Versuchsablauf

Nachdem sich die Tiere eine Woche akklimatisiert hatten, wurde die Intervention begonnen und über einen Zeitraum von zehn Wochen fortgeführt. Während der gesamten Behandlungsdauer erfolgte täglich die Messung der kumulativen Futter- und Flüssigkeitsaufnahme pro Käfig (sechs Tiere). Zwei mal pro Woche wurde das Körpergewicht erfasst und die Tiere auf ihren allgemeinen Gesundheitszustand hin untersucht. Dabei wurde besonders auf das Auftreten intestinaler Blutungen geachtet, die

bei zu starker Ausprägung zur Anämie führen können und einen frühzeitigen Abbruch des Versuchs erforderlich machen. Nach Ablauf der Intervention wurden die Tiere gewogen, durch CO<sub>2</sub>-Inhalation narkotisiert und durch Herzpunktion getötet.

### **2.5.3 Sektion und Präparation des Darms**

Leber, Niere und Milz wurden entnommen, gewogen und jeweils zur Hälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. in 4 % PBS-gepuffertem Formalin fixiert. Zur eventuellen Überprüfung des Genotyps wurde ein 1 cm langes Stück der Schwanzspitze ebenfalls schockgefroren.

Vor der Entnahme des Darms wurde dieser durch Einführen einer Spritze in den Anus mit PBS gespült, um den Darminhalt zu entfernen. Der komplette Gastrointestinaltrakt wurde vom Duodenum bis zum Rektum an einem Stück entnommen und auf Eis gelegt. Die gesamte Bearbeitung des Darms erfolgte ebenfalls auf Eis. Der Darm wurde so gut wie möglich von Peritoneum und Fettgewebe befreit und entwirrt und die Länge von Dün- und Dickdarm bestimmt. Zur weiteren Präparation wurde zunächst der Dünndarm in drei gleich große Teile geteilt, der Kolon blieb unverändert und das Caecum wurde entfernt. Die vier Teile des Darms wurden parallel von vier Präparatoren mit eiskaltem PBS unter Verwendung einer Spritze gespült, der Länge nach aufgeschnitten und mit Hilfe von Kanülen auf einer Paraffinplatte befestigt. Die nach oben zeigende Mukosa wurde nochmals gespült und anschließend für drei Stunden in 4 % PBS-gepuffertem Formalin fixiert. Nach der Fixierung wurden die Präparate gründlich mit Leitungswasser gespült und darin bis zur Auszählung der Adenome aufbewahrt.

### **2.5.4 Bestimmung der Tumorzahl**

Die Auszählung der Adenome erfolgte bei zehnfacher Vergrößerung unter einem Dissektionsmikroskop. Die vier Teilstücke jedes Darms wurden getrennt ausgezählt, um die Lokalisation zu erfassen. Weiterhin erfolgte eine Klassifizierung der Adenome der Größe nach in kleine (Durchmesser < 1 mm), mittlere (1-3 mm) und große (> 3 mm) Tumore.

### **2.5.5 Verarbeitung des Gewebes für Genexpressionsanalysen**

Bei allen Tieren erfolgte die Entnahme eines 0.5 – 1 cm langen Darmstücks am distalen Ende eines jeden Teilpräparates, das bis zur weiteren Verarbeitung in RNAlater®, zunächst bei 4°C, dann bei –20°C und zur Langzeitlagerung bei –80°C aufbewahrt wurde.

Darmpräparate von einem Teil der Tiere wurden komplett zur Gewinnung von Proben zur RNA-Isolierung aufgearbeitet. Hierzu wurde der auf Paraffin befestigte Darm sofort mit RNAlater® überschichtet. Die Auszählung der Adenome wurde umgehend vorgenommen. Zuvor wurde wieder je ein distales Darmstück entnommen. Außerdem wurden nach der Zählung aus jedem der vier restlichen Darmstücke sämtliche Adenome mit Hilfe einer Rundscherer oberflächlich „ausgeschnitten“ und die Mukosa mit Hilfe eines RNase-freien Einmalplastikspatels abgekratzt. Von jedem der vier Darmstücke erhielt man so jeweils drei Proben (Komplett darm, Adenome und Mukosa), die in RNAlater® wie bereits beschrieben aufbewahrt wurden. Die Präparation zur Gewinnung von Proben zur RNA-Isolierung wurden mit RNase-freiem Besteck durchgeführt, das zuvor jeweils unter Verwendung von RNaseZap® gereinigt wurde.

### **2.5.6 Verarbeitung des Gewebes für immunhistochemische Untersuchungen**

Nach der Bestimmung der Tumorzahl wurden die Präparate mit Hilfe eines Holzstäbchens zu einer sogenannten „swiss roll“ aufgerollt (Moolenbeek & Ruitenbergh, 1981; Park et al., 1987). Dabei befand sich das proximale Ende jeweils im Inneren der Rolle und das distale Ende außen. Die Rolle wurde so geformt, dass die Mukosa nach außen zeigte. In dieser Form wurden die Präparate in Einbettkassetten über Nacht in 70 % Ethanol aufbewahrt und anschließend maschinell entwässert. Die Rollen wurden dann in Paraffin eingebettet.

### **2.5.7 Bestimmung des Hämatokrit**

Das während der Herzpunktion gewonnene Blut wurde nach Zugabe von 10 U Heparin bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Hämatokrit erfolgte aus Vollblut in einer heparinisierten 32 mm Kapillare mit Hilfe einer Mikrohämatokrit-

zentrifuge. Nach 8 min Zentrifugation konnte das Ergebnis auf einer %-Skala in der Zentrifuge abgelesen werden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 2.5.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Trink- und Futtermengen wurde von Dr. Carina Ittrich (Abteilung Biostatistik, DKFZ Heidelberg) durchgeführt. Die Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erfolgte auf der Basis einer linearen Regression, wobei der Vergleich anhand der Y-Achsenabschnitte vorgenommen wurde. Im Falle der Trinkmengen hatten die Geraden aller Gruppen dabei die gleiche Steigung. Dies traf im Fall der Futteraufnahme bei den Wildtyptieren nicht zu, sodass hier ein Modell zugrunde gelegt wurde, dass Unterschiede der Steigungen für die Geraden der einzelnen Behandlungsgruppen berücksichtigte.

Die Tumorzahlen sind jeweils angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittels. Normalverteilte Variablen wurden durch einfaktorielle Varianzanalyse (One Way ANOVA) auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde der nicht parametrische Test für Ränge nach Kruskal-Wallis an die Varianzanalyse angeschlossen. Die Auswertung wurden von Dr. W. Rittgen (Abteilung Biostatistik, DKFZ Heidelberg) durchgeführt.

## 2.6 Genotypisierung

### *Materialien*

DNeasy Mini Kit RNase A	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Euro taq polymerase	Bio Cat (Heidelberg, Deutschland)
dNTP Mix	Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)
Ethidiumbromid Lösung	Bio Rad (München, Deutschland)
GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus Loading dye solution	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, Germany)
Tissue Grinder	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

*Lösungen und Puffer*

<b>TBE-Puffer (Lagerung bei RT)</b>		Endkonzentration
Tris-Base		90 mM
Borsäure		90 mM
EDTA		2 mM

<b>PCR-Master Mix</b>		Volumen
DEPC-Wasser		4.64 µl
10 x Reaktions-Puffer		1.2 µl
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM		1.2 µl
cDNA		3.0 µl
Primer, 20 µM (je 0.6 µl)		1.8 µl
dNTPs		0.96 µl
Taq Polymerase		0.2 µl

**2.6.1 DNA-Isolierung**

Die Isolierung von DNA zur Genotypisierung der Mäuse erfolgte aus 10-20 mg Lebergewebe, das nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Dazu wurde das DNeasy Mini Kit verwendet. Vor der Isolierung wurde das Gewebe mit Hilfe eines Tissue Grinders in ATL Puffer (Bestandteil des Kits) homogenisiert und anschließend nach Zugabe von Proteinase K für ein bis drei Stunden bei  $55^{\circ}\text{C}$  verdaut. Weiterhin erfolgte ein RNA-Verdau, bevor die DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert wurde. Die mit AE Puffer (Bestandteil des Kits) eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit wurde die Absorption von 20 µl Probe in 180 µl Wasser bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. Eine Absorption von 1.0 bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Berechnung erfolgte unter Einbezug des Verdünnungsfaktors:  $\text{DNA} [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times 10$ . Der Quotient aus  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  ergibt einen Wert, der zwischen 1.8 und 2.0 liegen sollte und eine Aussage über die Reinheit ermöglicht. Verunreinigungen durch RNA wurden außerdem durch Auftrennung der Proben in einem 1 % Agarose-TBE-Gel inklusive Ethidiumbromid (25 µg/100 ml) sichtbar gemacht. Der Lauf des Gels erfolgte bei 100-120 V für 10 bis 20 min in 0.5 x TBE-Puffer.

### 2.6.2 Qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Primer der folgenden, von The Jacksons Laboratories zur Verfügung gestellten Sequenzen verwendet.

<i>mApc</i> Primer	Sequenz	
oIMR0033	5'- GCC ATC CCT TCA CGT TAG -3'	Wildtyp forward Primer flankiert die veränderte Nukleotidbase der <i>Min</i> Mutation
oIMR0034	5'- TTC CAC TTT GGC ATA AGG C -3'	Wildtyp reverse Primer
oIMR0758	5'- TTC TGA GAA AGA CAG AAG TTA -3'	<i>Min</i> forward Primer schließt die veränderte Nukleotidbase ein

Die Amplifikation der DNA erfolgte unter Verwendung des folgenden Standard PCR Programms.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
1	94	3 min	} 35 Zyklen
2	94	30 s	
3	55	1 min	
4	72	1 min	
5	72	2 min	
6	4	∞	

Die PCR Produkte wurden auf einem 1.5 % Agarose-TBE Gel inklusive Ethidiumbromid (25 µg/100 ml) für 1 h bei 100 V aufgetrennt. Das Auftreten eines PCR Produktes von 600 bp weist auf den Wildtyp hin, während ein zusätzliches Produkt bei 340 bp der Nachweis für die Mutation ist (Abbildung 8).

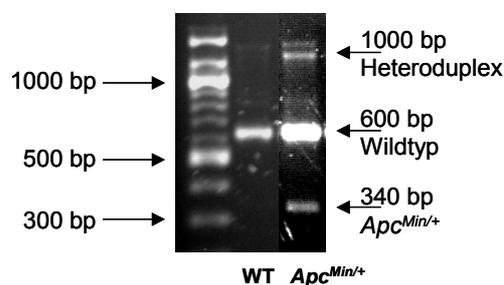


Abbildung 8: Repräsentatives Elektrophoresegel zur Bestimmung des *Apc*<sup>Min/+</sup> Genotyps mittels PCR.

## 2.7 Immunhistochemie

### Materialien

Vector® M.O.M. <sup>TM</sup> Immunodetection Kit PK-2200	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)
DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Mayer's Hämalau	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
SuperFrost® plus Objektträger	Menzel-GmbH & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)
Deckgläser, 24 x 70 mm	Langenbrink (Emmendingen, Deutschland)
Eukitt®	Kindler GmbH & Co. (Freiburg, Deutschland)
AxioSkop 2 MOT	Carl Zeiss (Göttingen, Deutschland)
Digitalkamera CCD-1300CB	VDS Vosskühler GmbH (Osnabrück, Deutschland)

### Puffer und Lösungen

<b>10 x TBS-Puffer, pH 7.6 mit HCl eingestellt (Lagerung bei RT)</b>	Endkonzentration
Tris-Base	0.5 M
NaCl	9 %
Vor Gebrauch 1:10 mit VE-Wasser verdünnen	
<b>10 x PBS-Puffer, pH 7.2 (Lagerung bei RT)</b>	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	77 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27 mM
NaCl	9 %
Vor Gebrauch 1:10 mit VE-Wasser verdünnen	
<b>Citratpuffer, pH 6.0 mit HCl eingestellt (Lagerung bei 4°C)</b>	Endkonzentration
Tri-Natrium-Citrat	10 mM
Tween 20	0.05 %
<b>Tris-Puffer, pH 7.6 (Lagerung bei RT)</b>	Endkonzentration
Tris-HCl	38.5 mM
Tris-Base	12.5 mM
<b>DAB-Substratlösung</b>	Endkonzentration
DAB, in Tris-Puffer, pH 7.6	1.5 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.03 %
<b>Entfärbelösung</b>	Endkonzentration
Ethanol	70 %
HCl	0.1 %

Ammoniakwasser, pH 8		Endkonzentration	
Ammoniak		0.25 %	

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Inkubation
PCNA	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)	1:1500	30 min, RT
β-Catenin	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)	1:200	30 min, RT

### 2.7.1 Anfertigung der Paraffinschnitte und HE-Färbung

Die Herstellung der Paraffinschnitte sowie die HE-Färbung erfolgte am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg. Aus den zuvor angefertigten Paraffinblöcken wurden hier Schnitte in einer Dicke von ca. 4 µm angefertigt, die auf SuperFrost® plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C angetrocknet wurden.

Von jedem Tier wurden jeweils zwei bis drei Schnitte der Swiss Roll aus den vier Teilen des Darms (proximaler, mittlerer und distaler Dünndarm sowie Kolon) wie folgt beschrieben entparaffiniert, rehydriert und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Entparaffinierung und Rehydrierung		Färbung	
Xylol	3 x 5 min	Hämalaun	5 min
100 % Ethanol	3 min	Fließend Wasser	5 min
96 % Ethanol	3 min	1 % Eosin	1 min
70 % Ethanol	3 min	Destilliertes Wasser	5 s
Destilliertes Wasser	2 s	70 % Ethanol	5 s
		96 % Ethanol	5 s
		100 % Ethanol	2 x 2 min
		Xylol	2 x 2 min
		Eindecken mit Eukitt	

Die histologische Aufarbeitung von Leber, Milz und Niere wurde von Herrn Prof. Dr. A. Gruber, Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Alle gefärbten Präparate wurden zur Befundung an den Pathologen Herrn Prof. Dr. E. Karbe, Wülfrath übersandt.

### 2.7.2 Immunhistochemische Färbung

Für die Antikörper gegen PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und β-Catenin kam das Vector® M.O.M.<sup>TM</sup> Immunodetection Kit zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein Vectastain Elite ABC Kit, das speziell zur Anwendung Primärer Maus-Antikörper auf Mausgewebe entwickelt wurde, um das Auftreten unspezifischer Hintergrundfärbung zu

minimieren. Die Visualisierung erfolgte unter Verwendung des Chromogens Diaminobenzidin (DAB). Bei dem während der gesamten Prozedur verwendeten Waschpuffer handelt es sich um eine 1:1 Mischung aus PBS und TBS. Zunächst erfolgten wiederum Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte.

<b>Entparaffinierung und Rehydrierung</b>	
Xylol	2 x 5 min
100 % Ethanol	2 x 2 min
80 % Ethanol	1.5 min
70 % Ethanol	1 min
50 % Ethanol	1 min
VE-Wasser	30 s
Waschpuffer	5 min

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in kochenden Citratpuffer gegeben und für 10 min in der Mikrowelle bei 95 – 99°C weitererhitzt. Ein erneutes Aufkochen der Flüssigkeit sollte dabei vermieden werden, um ein Ablösen der Schnitte von den Objektträgern zu verhindern. Im Anschluss wurden die Schnitte im Puffer bei RT für 30 min auf ca. 45°C abgekühlt und kurz in VE-Wasser und 5 min in Waschpuffer gewaschen. Vor Beginn der eigentlichen Färbung wurde die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes blockiert, um unspezifische Färbung zu verhindern. Dazu wurden die Schnitte mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 min bei RT inkubiert und anschließend 2 x 5 min in Waschpuffer gespült. Das weitere Vorgehen orientierte sich an den Anweisungen des Herstellers und ist in folgender Tabelle aufgeführt. Alle Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle wurden Schnitte unter Ausschluss des Primärantikörpers in gleicher Weise prozessiert.

<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationszeit</b>
M.O.M. Blocking reagent	60 min
Waschpuffer	2 x 5 min
M.O.M. Diluent	5 min
Primärantikörper	30 min
Waschpuffer	2 x 5 min
Sekundärantikörper	10 min
Waschpuffer	2 x 5 min
AB-Komplex	5 min
Waschpuffer	2 x 5 min
DAB-Substratlösung	6 min

Die Schnitte wurden nach der Immunfärbung einer Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 30 s unterzogen und unter fließendem Leitungswasser 3 min gewässert. Durch 10-maliges Eintauchen in Entfärbelösung wurde überschüssige Färbung entfernt. Zum Bläuen der gefärbten Kerne wurden die Schnitte 2 min in Ammoniakwasser getaucht und nochmals unter fließendem Leitungswasser 3 min gewässert. Abschließend wurden die Präparate wie im Folgenden beschrieben dehydriert und mit Eukitt eingedeckt.

<b>Dehydrierung</b>	
50 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
100 % Ethanol	5 min
Isopropanol	5 min
Xylol	20 min
Eindecken mit Eukitt	

### 2.7.3 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte am AxioSkop 2 MOT bei 400facher Vergrößerung.

#### *PCNA*

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde die Anzahl PCNA-markierter Zellen sowie die Anzahl nicht markierter Zellen erfasst. Die Auswertung erfolgte für je 20 Krypten und Zotten getrennt, wobei ausschließlich Krypten und Zotten einbezogen wurden, deren gesamter Querschnitt auf dem Schnitt sichtbar war. Aus der Summe der markierten und nicht markierten Zellen erfolgte jeweils die Berechnung des Proliferativen Index (PI) in %:

$$PI = \frac{\text{PCNA-markierte Zellen}}{\text{Gesamte Zellzahl}} \times 100.$$

Der Proliferative Index in Zotten und Krypten wurde für die Darmabschnitte mittlerer Dünndarm, distaler Dünndarm und Kolon bestimmt, wobei für jede der drei Behandlungsgruppen beider Stämme Präparate von je drei Tieren ausgewertet wurden. Aus diesen drei Bestimmungen wurde jeweils ein Mittelwert (MW) mit Standardfehler des Mittels (SEM) errechnet.

### *$\beta$ -Catenin*

Die Auswertung der  $\beta$ -Catenin Färbung erfolgte nach der Farbintensität von Zellkernen innerhalb eines Tumors. Pro Schnitt wurden dabei innerhalb verschiedener Tumore zehn digitale Fotos aufgenommen, die anschließend mit Hilfe der Software Lucia® Version 4.21, Laboratory Imaging, ausgewertet wurden. Die integrierte Farbdichte wurde dabei zur gemessenen Fläche ins Verhältnis gesetzt, sodass ein Wert für die OD/Pixel berechnet wurde. Aus jeweils zehn Werten wurde für jedes Tier ein Mittelwert gebildet. Pro Gruppe wurden drei Tiere in die Auswertung einbezogen, woraus wiederum ein Mittelwert für jede Gruppe gebildet wurde. Es wurden ausschließlich Präparate des distalen Dünndarms berücksichtigt.

## 3 ERGEBNISSE

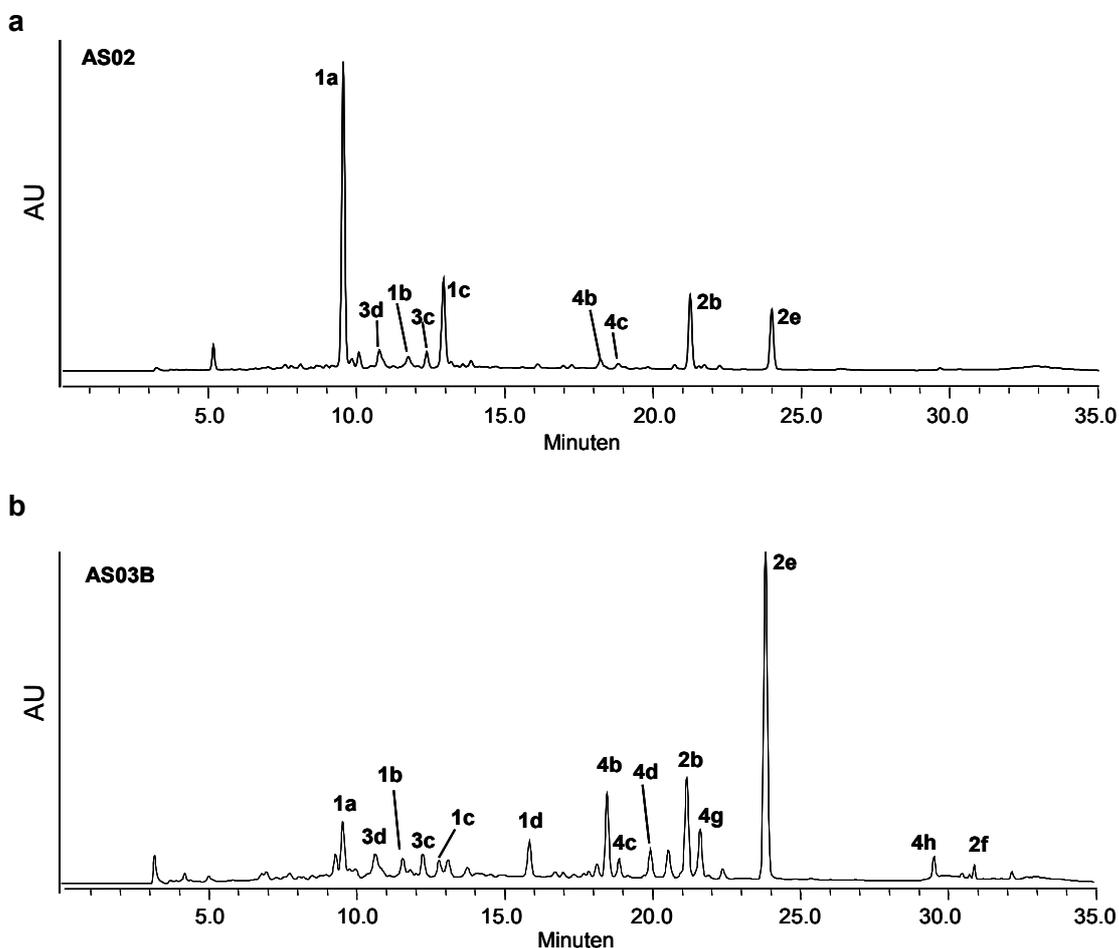
### 3.1 Charakterisierung der im Projekt verwendeten polyphenolreichen Apfelsaftextrakte

Den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Identifikation bioaktiver Apfelinhaltsstoffe lagen polyphenolreiche Apfelsaftextrakte zugrunde. Die Extrakte AS02 und AS04 wurden aus direktem Apfelpresssaft hergestellt, während der AS03B aus Tresterextraktionssaft gewonnen wurde. Die Unterschiede in der Herstellung gehen mit einer qualitativen und quantitativen Veränderung des Polyphenolprofils einher. Da AS02 und AS04 in ihrer qualitativen Zusammensetzung recht ähnlich sind, wird im Folgenden nur auf den AS02 eingegangen. Alle während der gesamten Fraktionierung identifizierten Verbindungen sind zur Erklärung der Chromatogramme in Tabelle 6 vorweggenommen.

**Tabelle 6: Substanzverzeichnis der in den Extrakten, Fraktionen und Subfraktionen analysierten Verbindungen des Apfels sowie deren Kodierung zur Erklärung der Chromatogramme.**

<b>1</b>	<b>Phenolcarbonsäuren</b>	<b>2</b>	<b>Dihydrochalkone</b>
<b>1a</b>	Chlorogensäure	<b>2a</b>	Hydroxyphloretin-2'-xyloglukosid
<b>1b</b>	Kaffeesäure	<b>2b</b>	Phloretin-2'-xyloglukosid
<b>1c</b>	4-Cumaroylchinasäure	<b>2c</b>	Phloretinglykosid 1
<b>1d</b>	<i>p</i> -Cumarsäure	<b>2d</b>	Phloretinglykosid 2
<b>1e</b>	Ferulasäure	<b>2e</b>	Phloretin-2'-glukosid (Phloridzin)
<b>1f</b>	Chlorogensäure-Derivat 2	<b>2f</b>	Phloretin
<b>1g</b>	Chlorogensäure-Derivat 3	<b>2g</b>	Hydroxyphloretin-2'-glukosid
<b>1h</b>	Chlorogensäure-Derivat 4		
<b>3</b>	<b>Flavan-3-ole</b>	<b>4</b>	<b>Quercetin-glykoside</b>
<b>3a</b>	Procyanidin B1	<b>4a</b>	Quercetin-3-rutinosid (Rutin)
<b>3b</b>	(+)-Catechin	<b>4b</b>	Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)
<b>3c</b>	(-)-Epicatechin	<b>4c</b>	Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)
<b>3d</b>	Procyanidin B2	<b>4d</b>	Quercetin-3-xylosid (Renoutrin)
<b>3e</b>	Procyanidin C1	<b>4e</b>	Quercetin-3-arabinofuranosid
<b>3f</b>	Procyanidin-Tetramer	<b>4f</b>	Quercetin-3-arabinopyranosid
<b>3g</b>	Procyanidin-Pentamer	<b>4g</b>	Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)
<b>3h</b>	Procyanidin-Hexamer	<b>4h</b>	Quercetin

Die Chromatogramme der über HPLC durchgeführten Analytik der beiden Extrakte sind Abbildung 9 zu entnehmen.



**Abbildung 9:** RP-HPLC Chromatogramme der verwendeten polyphenolreichen Apfelsaftextrakte AS02 (a) und AS03B (b) (bei 280 nm) (Zeßner, 2005).

Charakteristisch für den AS02 Extrakt ist die mit Abstand dominierend enthaltene Chlorogensäure (1a). Zu den weiteren Hauptkomponenten zählen die 4-Cumaroylchinasäure (1c) sowie die Dihydrochalkonderivate Phloretin-2'-xyloglukosid (2b) und Phloridzin (2e). In geringen Mengen konnten außerdem Kaffeesäure (1b), Epicatechin (3c), Procyanidin B2 (3d) und die Quercetinderivate Hyperosid (4b) und Isoquercitrin (4c) identifiziert werden.

Im Vergleich zum AS03B wird deutlich, dass sich die Verwendung des Ausgangsmaterials wesentlich auf das Polyphenolprofil auswirkt. Anhand der vorliegenden Analytik kann

festgestellt werden, dass es im AS03B zu einer starken Verminderung der zuvor dominanten Chlorogensäure (1a) kam. Diese Reduktion erfolgte in erster Linie zu Gunsten des Dihydrochalkons Phloridzin (2e). Ferner konnten vor allem Quercetin-glykoside angereichert werden, die durch die enzymatische Behandlung des Tresters vermehrt aus der Schale freigesetzt wurden. Hierbei waren vor allem das Galaktosid (4b) und das Rhamnosid (4g) von Bedeutung sowie das Xylosid (4d) und das Glukosid (4c). Eine gewisse Anreicherung konnte weiterhin für das Procyanidin B2 (3d) beobachtet werden. Ausserdem waren im Gegensatz zum AS02 im B-Saft Extrakt auch die Aglyka Phloretin (2f) und Quercetin (4h) nachweisbar.

### **3.2 Identifikation und Charakterisierung aktiver polyphenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe im Rahmen der „activity-guided fractionation“ am Beispiel des Extraktes AS03B**

Analytik und Aktivitätsbestimmung der Fraktionen für AS03B werden hier beispielhaft aufgeführt. Der Vergleich der beiden Fraktionierungen von AS02 und AS03B sowie der entsprechenden Aktivitäten zeigte, dass die Durchführung der Sephadex-Trennung vor der CPC, wie in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 beschrieben, die geeignetere Methode war, um hochaktive Inhaltsstoffe aufzukonzentrieren und die für die Aktivität verantwortlichen Substanzklassen klar zu trennen. Ferner konnte ausgehend vom AS03B eine vergleichsweise hohe Anzahl an Verbindungen identifiziert und isoliert werden. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse gliedern sich nach den aus dem AS03B gewonnenen Fraktionen mit ihren entsprechenden Subfraktionen (siehe Kapitel 2.1.2, Abbildung 6). Die chemopräventiven Aktivitäten werden dabei der jeweiligen Analytik gegenübergestellt. Gegebenenfalls wird der Vergleich zu Reinsubstanzen herangezogen. Die Beschriftung der Chromatogramme nimmt Bezug auf die Kodierung der Verbindungen aus Tabelle 6 (siehe Kapitel 3.1). Die Testsysteme werden wie in Tabelle 7 aufgezeigt abgekürzt.

**Tabelle 7: Beschreibung der im Rahmen des chemopräventiven Screenings verwendeten Testsysteme.**

<b>Test</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>Cyp 1A</b>	Hemmung des Phase 1 Enzyms Cytochrom P450 1A, angegeben als halbmaximale Hemmkonzentration (IC <sub>50</sub> ) in µg/ml für Fraktionen und µM für Reinsubstanzen
<b>QR</b>	Induktion des Phase 2 Enzyms NAD(P)H:Chinonreduktase, angegeben als Konzentration zur Verdopplung der Aktivität (CD) in µg/ml für Fraktionen und µM für Reinsubstanzen, Werte in Klammern indizieren die x-fache Induktion bei der angegebenen Konzentration
<b>DPPH</b>	Radikalfängerpotenzial für DPPH-Radikale, angegeben als halbmaximale Radikalfängerkonzentration (SC <sub>50</sub> ) in µg/ml für Fraktionen und µM für Reinsubstanzen
<b>H/XO</b>	Radikalfängerpotenzial für O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Radikale, angegeben als halbmaximale Radikalfängerkonzentration (SC <sub>50</sub> ) in µg/ml für Fraktionen und µM für Reinsubstanzen
<b>ORAC</b>	Radikalfängerpotenzial für ROO <sup>•</sup> -Radikale, angegeben als ORAC-Einheiten (units) bei einer Konzentration von 0.4 µg/ml für Fraktionen und 1 µM für Reinsubstanzen im Vergleich zu 1 µM Trolox
<b>AR</b>	Hemmung des Enzyms Aromatase (Cyp 19), angegeben als halbmaximale Hemmkonzentration (IC <sub>50</sub> ) in µg/ml für Fraktionen und µM für Reinsubstanzen
<b>Cox-1</b>	Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase-1, angegeben als % Hemmung bei einer Konzentration von 100 bzw. *400 µg/ml für Fraktionen, und 100 µM für Reinsubstanzen

### 3.2.1 AS03B und frühe Sephadex-Fractionen

Die Extrakte, Fraktionen und Subfraktionen wurden in den in Tabelle 7 beschriebenen *in vitro* Testsystemen auf potenzielle chemopräventive Eigenschaften untersucht. Die Testsysteme Cyp 1A und QR gaben dabei Hinweise auf die Modulation des Fremdstoffmetabolismus, antioxidative Wirkungen wurden anhand von DPPH, H/XO und ORAC untersucht, und zur Beeinflussung der Tumorpromotion wurden antihormonelle Wirkungen über die Aromatase Hemmung und antiinflammatorische Wirkungen über die Hemmung der Cyclooxygenase-1 betrachtet.

Zur Vollständigkeit sind die Aktivitäten des Extraktes AS02 neben denen des AS03B in Tabelle 8 aufgeführt. Der Vergleich der beiden Extrakte zeigt, dass der AS03B bezüglich der Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus eine ca. dreifach stärkere Aktivität gegenüber dem A-Saft Extrakt aufwies. Trotz unterschiedlicher Zusammensetzung war das antioxidative Potenzial bei beiden Extrakten ähnlich, wie auch die Beeinflussung der Aktivitäten von Aromatase und Cox-1.

**Tabelle 8: Zusammenfassung der chemopräventiven Aktivität der Extrakte AS02 und AS03B und dessen frühen Sephadex-Fractionen B 1 und B 2.**

	<b>Cyp 1A</b>	<b>QR</b>	<b>DPPH</b>	<b>H/XO</b>	<b>ORAC</b>	<b>AR</b>	<b>Cox-1</b>
<b>AS02</b>	12.3	111.9	10.7	>20	2.2	>5	<b>69*</b>
<b>AS03B</b>	<b>4.3</b>	<b>39.2</b>	10.5	>20	2.0	>5	<b>74*</b>
<b>B 1</b>	>20	<b>33.8</b>	>20	>20	0.7	>5	<b>5*</b>
<b>B 2</b>	>20	>50 (1.7)	>20	>20	1.7	>5	<b>34*</b>

\* bei 400 µg/ml getestet, Erläuterungen siehe Tabelle 7

Die Fraktion B 1 zeigte mit Ausnahme der Induktion der QR keinerlei auffällige Aktivitäten. Ihre Bestandteile entzogen sich der auf Phenole optimierten analytischen Methoden, sodass die Präsenz von polyphenolischen Verbindungen bis auf Spuren ausgeschlossen werden konnte. Obwohl in Fraktion B 2 *p*-Cumaroylglukose und 4-Cumaroylchinasäure (1c) nachgewiesen werden konnten, entbehrte diese Fraktion jeglicher Aktivität, sodass im Falle beider Fraktionen von einer weiteren Subfraktionierung abgesehen wurde. Aus diesem Grund sind die Chromatogramme nicht aufgeführt.

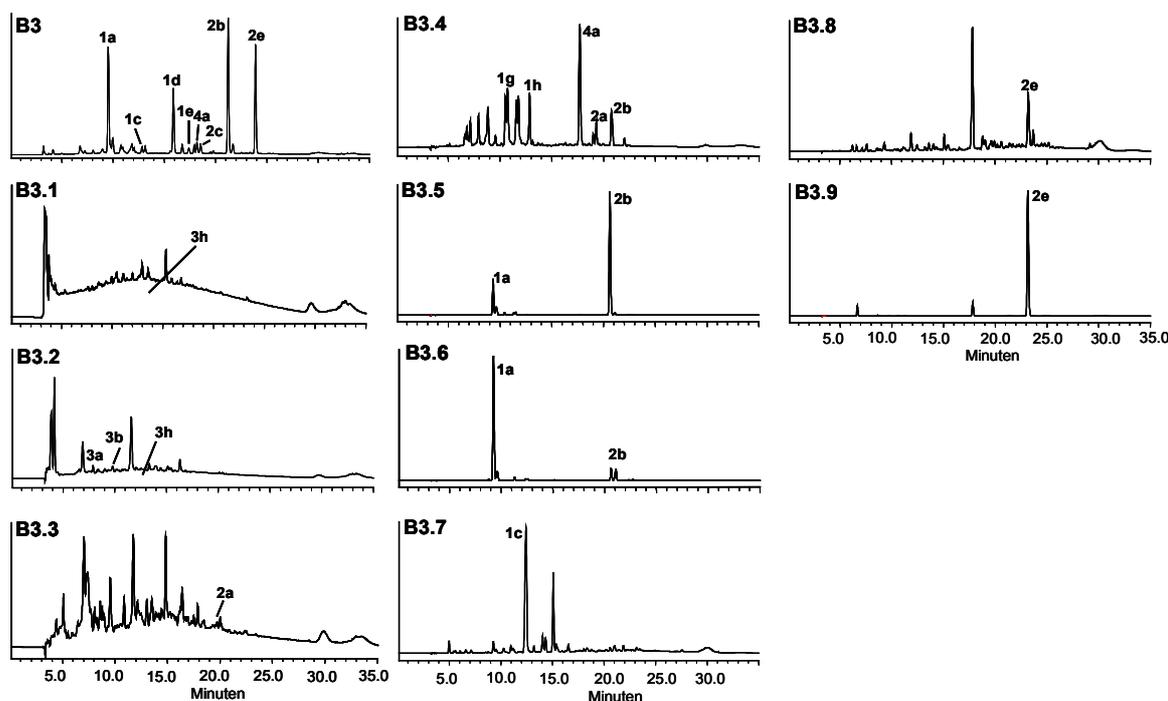
### 3.2.2 B 3 und CPC-Subfraktionen B 3.1 bis B 3.9

Charakteristisch für Fraktion B 3 war vor allem ihr Potenzial Peroxylradikale abzufangen, das im Vergleich zur Referenzsubstanz Trolox dreifach stärker ausgeprägt war. Bei der Betrachtung der Subfraktionen im Hinblick auf diese Wirkung finden sich entsprechende Aktivitäten in B 3.3 bis B 3.7 und B 3.9 wieder (Tabelle 9). Zusätzlich erschien eine für die Mutterfraktion nicht nachweisbare Hemmung der Aromataseaktivität, die sich in der zweiten eluierten Subfraktion B 3.1 hervorhob. Die Analyse der aktiven Subfraktionen erbrachte, dass die dominierenden Verbindungen in Fraktion B 3.4 das Quercetin-3-rutinosid (4a) sowie in geringeren Mengen Chlorogensäurederivate (1g,h) waren. In Fraktion B 3.5 kumulierte hauptsächlich das Phloretin-2'-xyloglukosid (2b). Mit Fraktion B 3.6 wurde fast reine Chlorogensäure (1a) isoliert, verunreinigt durch geringe Mengen Phloretin-2'-xyloglukosid (2b), und in B 3.7 konnte die 4-Cumaroylchinasäure (1c) als Hauptkomponente identifiziert werden. Ab Fraktion B 3.8 eluierte das Phloridzin (2e), das sich in Fraktion B 3.9 als Hauptkomponente anreicherte. Im Bezug auf die in Fraktion B 3.1 nachgewiesene Aromatasehemmung konnten oligomere Procyanidine (3h) als potenzielle Verbindungen identifiziert werden (Abbildung 10).

**Tabelle 9: Zusammenfassung des chemopräventiven Potenzials der Sephadex-Fraktion B 3 sowie deren CPC-Subfraktionen B 3.1 bis B 3.9.**

	Cyp 1A	QR	DPPH	H/XO	ORAC	AR	Cox-1
<b>B 3</b>	10.9	>50 (1.3)	18.7	19.4	<b>3.1</b>	>5	43*
<b>B 3.1</b>	>5	>50 (1.4)	7.6	>20	2.4	<b>2.7</b>	16
<b>B 3.2</b>	>5	>50 (1.4)	8.8	11.2	2.5	>5	17
<b>B 3.3</b>	>5	>50 (1.3)	9.3	>20	<b>3.0</b>	>5	14
<b>B 3.4</b>	>5	>50 (1.3)	13.2	>20	<b>3.2</b>	>5	0
<b>B 3.5</b>	>5	>50 (1.8)	>20	>20	<b>3.4</b>	>5	6
<b>B 3.6</b>	>5	>50 (1.4)	11.8	>20	<b>3.2</b>	>5	0
<b>B 3.7</b>	>5	>50 (1.9)	11.7	>20	<b>3.0</b>	>5	12
<b>B 3.8</b>	>5	>50 (1.8)	11.4	>20	2.6	>5	38
<b>B 3.9</b>	>5	>50 (1.6)	>20	>20	<b>3.5</b>	>5	14

\* bei 400 µg/ml getestet, Erläuterungen siehe Tabelle 7



**Abbildung 10: RP-HPLC Chromatogramme der Sephadex-Fraktion B 3 sowie deren CPC-Subfraktionen B 3.1 bis B 3.9 (Zeßner, 2005).**

Die Betrachtung der in den aktiven Subfraktionen der B 3 identifizierten Verbindungen und deren Aktivitäten deutet darauf hin, dass Verbindungen aus drei Substanzklassen, nämlich das Quercetin-glykosid Rutin (4a), die Dihydrochalkone Phloretin-2'-xyloglukosid (2b) und Phloridzin (2e) sowie die Chlorogensäure (1a), ein beträchtliches Potenzial aufwiesen, Peroxylradikale abzufangen.

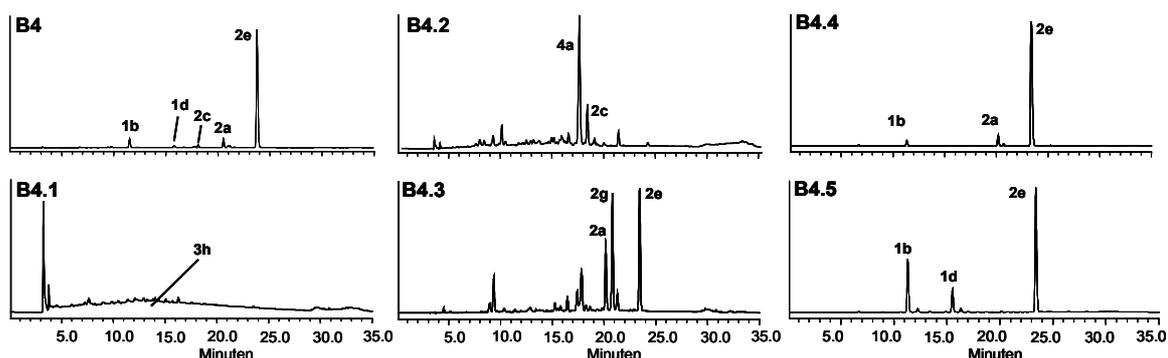
### 3.2.3 B 4 und CPC-Subfraktionen B 4.1 bis B 4.5

Das Aktivitätsprofil der Fraktion B 4 ist dem der Fraktion B 3 sehr ähnlich und beschränkt sich im Wesentlichen auf das Potenzial, Peroxylradikale unschädlich zu machen (Tabelle 10). Mit einem ORAC-Wert von 4.3 ist die Aktivität der B 4 jedoch gegenüber der B 3 deutlich stärker ausgeprägt. Bei den vorherrschenden Inhaltsstoffen der Fraktion B 4 und ihrer Subfraktionen handelt es sich auch in diesem Fall vor allem um Rutin (4a) und Phloridzin (2e). Keine der Subfraktionen erreichte jedoch die Aktivität der Mutterfraktion. Interessanterweise konnte auch hier wieder eine vereinzelt Aktivität in Form der Aromatasehemmung durch Fraktion B 4.1 beobachtet werden, die wiederum mit der Gegenwart oligomerer Procyanidine (3h) einherging und bei der Mutterfraktion nicht vorhanden war (Abbildung 11).

**Tabelle 10: Zusammenfassung des chemopräventiven Potenzials der Sephadex-Fraktion B 4 sowie deren CPC-Subfraktionen B 4.1 bis B 4.5.**

	Cyp 1A	QR	DPPH	H/XO	ORAC	AR	Cox-1
<b>B 4</b>	10.9	>50 (1.1)	11.6	13.2	<b>4.3</b>	5	38*
<b>B 4.1</b>	>5	>50 (1.4)	11.5	13.8	2.4	<b>3.8</b>	30
<b>B 4.2</b>	>5	>50 (1.1)	12.5	>20	2.4	>5	26
<b>B 4.3</b>	>5	>50 (1.1)	15.6	>20	2.6	>5	26
<b>B 4.4</b>	>5	>50 (1.1)	>20	>20	<b>3.3</b>	>5	12
<b>B 4.5</b>	>5	>50 (1.4)	15.0	15.3	<b>3.4</b>	>5	24

\* bei 400 µg/ml getestet, Erläuterungen siehe Tabelle 7



**Abbildung 11: RP-HPLC Chromatogramme der Sephadex-Fraktion B 4 sowie deren CPC-Subfraktionen B 4.1 bis B 4.5 (Zeßner, 2005).**

### 3.2.4 B 5 und CPC-Subfraktionen B 5.1 bis B 5.9

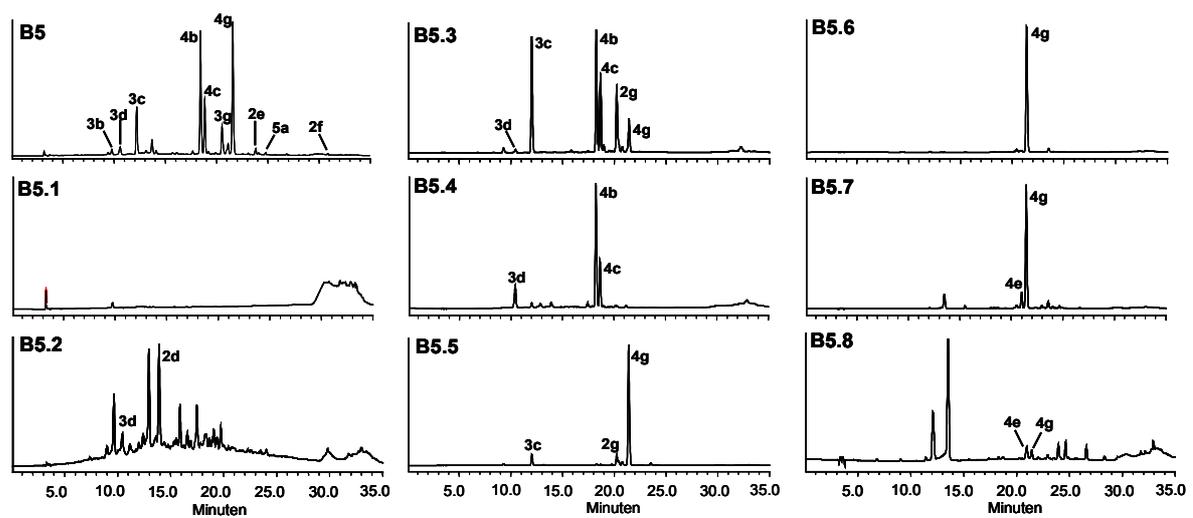
In Fraktion B 5 erweiterten sich die chemopräventiven Eigenschaften neben dem antioxidativen Potenzial, das sich durch die Inaktivierung von DPPH- und Peroxylradikalen äußerte, auf die Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus durch die Hemmung von Cyp 1A sowie die Entstehung von Prostaglandinen durch Cox-1 Hemmung (Tabelle 11).

Eine sehr gute Hemmung von Cyp 1A wurde durch die Subfraktionen B 5.5 ND, B 5.6 ND und B 5.7 bis B 5.9 erreicht. Bei den mit ND gekennzeichneten Niederschlägen handelt es sich um die während der Fraktionierung auskristallisierte Reinsubstanz Quercetin-3-rhamnosid (4g), die auch in B 5.7 neben geringen Beimengungen eines Quercetin-3-arabinosids vorherrschend war.

**Tabelle 11: Zusammenfassung des chemopräventiven Potenzials der Sephadex-Fraktion B 5 sowie deren CPC-Subfraktionen B 5.1 bis B 5.9.**

	Cyp 1A	QR	DPPH	H/XO	ORAC	AR	Cox-1
<b>B 5</b>	<b>4.6</b>	>50 (1.6)	<b>4.9</b>	19.4	<b>3.5</b>	>5	<b>84*</b>
<b>B 5.1</b>	>5	>50 (1.0)	8.8	8.2	2.2	<b>2.7</b>	31
<b>B 5.2</b>	>5	>50 (1.0)	8.8	7.6	2.5	<b>2.1</b>	36
<b>B 5.3</b>	>5	>50 (1.0)	7.1	16.0	<b>3.2</b>	>5	49
<b>B 5.3 ND</b>	>5	49.4	11.1	>20	<b>3.1</b>	>5	9
<b>B 5.4</b>	>5	>50 (1.0)	8.6	>20	<b>3.4</b>	>5	<b>74</b>
<b>B 5.5</b>	>5	<b>&gt;0.8<sup>a</sup></b>	11.0	16.4	2.5	>5	<b>63</b>
<b>B 5.5 ND</b>	<b>1.8</b>	>50 (1.5)	11.6	>20	2.7	>5	16
<b>B 5.6 ND</b>	<b>1.6</b>	50.0	12.0	>20	2.6	>5	13
<b>B 5.7</b>	<b>1.8</b>	>50 (1.0)	10.3	>20	2.5	>5	24
<b>B 5.8</b>	<b>1.2</b>	>59 (1.3)	9.6	10.8	2.6	>5	33
<b>B 5.9</b>	<b>0.5</b>	<b>6.5</b>	8.0	6.7	2.5	<b>3.0</b>	<b>65</b>

\* bei 400 µg/ml getestet; <sup>a</sup>toxische Effekte, Erläuterungen siehe Tabelle 7



**Abbildung 12: RP-HPLC Chromatogramme der Sephadex-Fraktion B 5 sowie deren CPC-Subfraktionen B 5.1 bis B 5.8 (Zeßner, 2005).** Chromatogramme der Fraktionen B 5.3, B 5.5 und B 5.6 stellen Mutterlaug und Niederschlag dar.

Während die Hauptpeaks der Fraktion B 5.8 nicht geklärt werden konnten, enthielt die letzte eluierte Subfraktion, für die kein Chromatogramm existiert, in erster Linie Phloretin (2f). Die Subfraktionen B 5.3, B 5.3 ND und B 5.4 gaben Aufschluss über die positiven Ergebnisse der Mutterfraktion im ORAC-Test. Die Zusammensetzung wurde in Fraktion B 5.3 durch das Epicatechin (3c) und in deren Niederschlag sowie der folgenden Fraktion B 5.4 durch die Kombination aus Quercetin-3-galaktosid (4b) und Quercetin-3-glukosid (4c) bestimmt. Die Fähigkeit der Mutterfraktion zur Cox-1-Hemmung fand sich in den Subfraktionen B 5.4, bestehend aus Procyanidin B2 (3d), Quercetin-3-galaktosid (4b) sowie Quercetin-3-glukosid (4c), und B 5.5, vor allem bestehend aus Quercetin-3-rhamnosid (4g), wieder.

Zusätzlich konnte zu Beginn und am Ende der Subfraktionenserie eine Aromatasehemmung festgestellt werden, die zuvor in der Mutterfraktion nicht vorhanden war. Die Verbindungen der früh eluierten ersten Subfraktion B 5.1 konnten nicht identifiziert werden. Die zweite Subfraktion enthielt neben Procyanidin B2 (3d) Substanzen (u. a. 2d), deren Strukturen auf die Klassen der Dihydrochalkone und Quercetin-glykoside hinwies, eine genauere Zuordnung war jedoch nicht möglich (Abbildung 12).

### 3.2.5 B 6 und CPC-Subfraktionen B 6.1 bis B 6.10

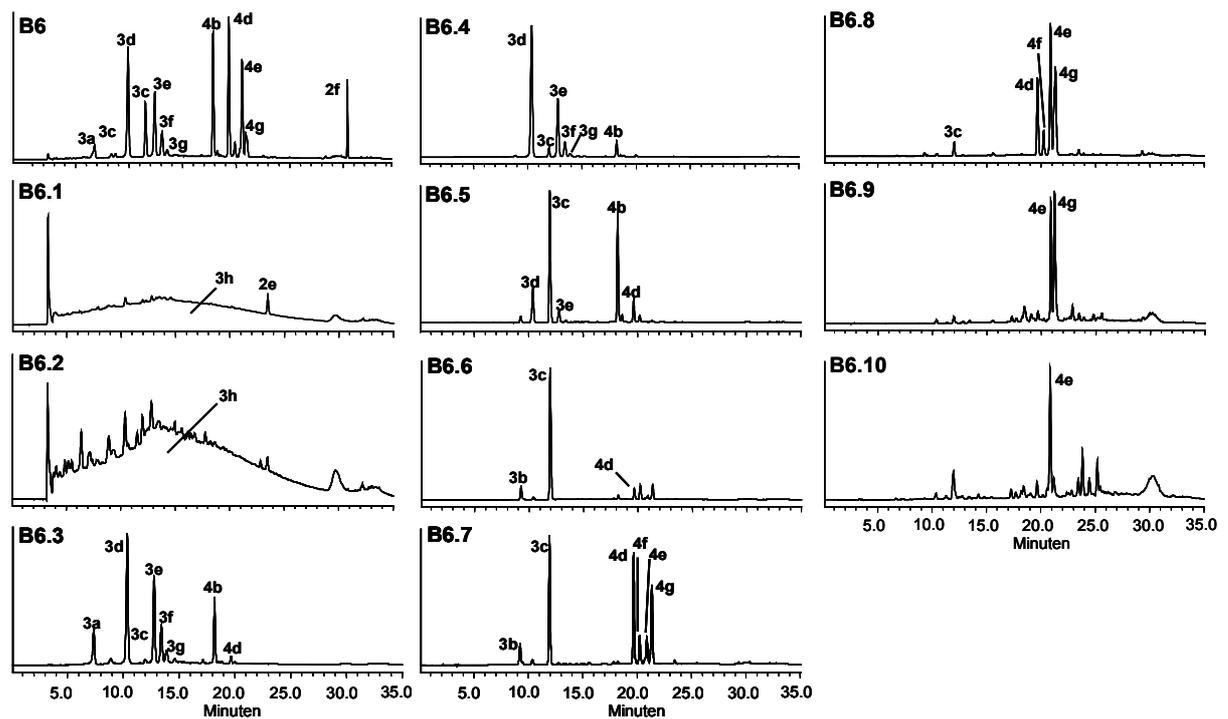
Obwohl sich das Aktivitätsspektrum der Fraktion B 6 nicht maßgeblich erweiterte, fanden sich Aktivitäten in allen Testsystemen mit Ausnahme der QR in einer Vielzahl ihrer Subfraktionen wieder, auch wenn die Mutterfraktion selber dieses Potenzial nicht aufwies. Von besonderer Bedeutung war dabei die Cyp 1A Hemmung durch die Subfraktionen B 6.7 bis B 6.10, das antioxidative Potenzial der Subfraktionen B 6.4 bis B 6.10, die Aromatasehemmung der letzten Fraktion B 6.10 sowie die Hemmung der Cox-1 durch die Subfraktionen B 6.5, B 6.6 und B 6.7 (Tabelle 12).

Die wichtigsten Cyp 1A-hemmenden Bestandteile der Subfraktionen B 6.7 bis B 6.10 sind das Quercetin-xylosid (4d), die Quercetin-arabinside (4e,f) und das Quercetin-rhamnosid (4g) sowie Epicatechin (3c), wobei letzteres nur in Subfraktion B 6.7 zu finden war. In den Subfraktionen B 6.4 bis B 6.6, die sich zusätzlich als hochwirksame Radikalfänger erwiesen, fanden sich insbesondere Flavanole wie die Procyanidine B2 (3d) und C1 (3e) sowie Epicatechin (3c), wobei in Fraktion B 6.5 außerdem Quercetin-3-galaktosid (4b) zu den Hauptkomponenten zählte (Abbildung 13).

**Tabelle 12: Zusammenfassung des chemopräventiven Potenzials der Sephadex-Fraktion B 6 sowie deren CPC-Subfraktionen B 6.1 bis B 6.10.**

	<b>Cyp 1A</b>	<b>QR</b>	<b>DPPH</b>	<b>H/XO</b>	<b>ORAC</b>	<b>AR</b>	<b>Cox-1</b>
<b>B 6</b>	5.7	>50 (1.5)	<b>4.5</b>	12.5	<b>3.6</b>	>5	<b>81*</b>
<b>B 6.1</b>	>5	>50 (1.1)	5.9	5.5	2.2	<b>2.1</b>	22
<b>B 6.2</b>	>5	>50 (1.2)	<b>4.4</b>	<b>4.0</b>	2.7	<b>2.3</b>	31
<b>B 6.3</b>	>5	>50 (1.3)	7.6	10.7	2.5	>5	28
<b>B 6.4</b>	>5	>50 (1.3)	<b>4.1</b>	6.9	<b>4.0</b>	>5	48
<b>B 6.5</b>	>5	>50 (1.0)	<b>4.7</b>	7.7	<b>4.0</b>	>5	<b>87</b>
<b>B 6.6</b>	>5	>50 (1.0)	<b>4.5</b>	7.3	<b>4.6</b>	>5	<b>88</b>
<b>B 6.7</b>	<b>2.2</b>	>50 (1.0)	5.4	9.6	<b>3.7</b>	<b>2.5</b>	<b>81</b>
<b>B 6.8</b>	<b>1.1</b>	>50 (1.0)	5.8	16.3	<b>3.3</b>	<b>2.2</b>	42
<b>B 6.9</b>	<b>1.4</b>	>50 (1.0)	<b>4.7</b>	9.8	<b>3.2</b>	>5	26
<b>B 6.10</b>	<b>1.7</b>	>50 (1.0)	<b>4.5</b>	7.0	<b>3.4</b>	<b>0.9</b>	37

\* bei 400 µg/ml getestet, Erläuterungen siehe Tabelle 7



**Abbildung 13:** RP-HPLC Chromatogramme der Sephadex-Fraktion B 6 sowie deren CPC-Subfraktionen B 6.1 bis B 6.10 (Zeßner, 2005).

Die früh eluierten Fraktionen B 6.1 und B 6.2, die sich wiederholt durch die Hemmung der Aromatase auszeichneten, wiesen erneut auf Procyanidine (3h) als aktive Komponenten hin.

Die Cox-1-hemmende Wirkung der Fraktionen B 6.5 bis B 6.7 konnte vor allem auf deren Gehalt an Epicatechin (3c) zurückgeführt werden.

### 3.2.6 B 7 und CPC-Subfraktionen B 7.2 bis B 7.18

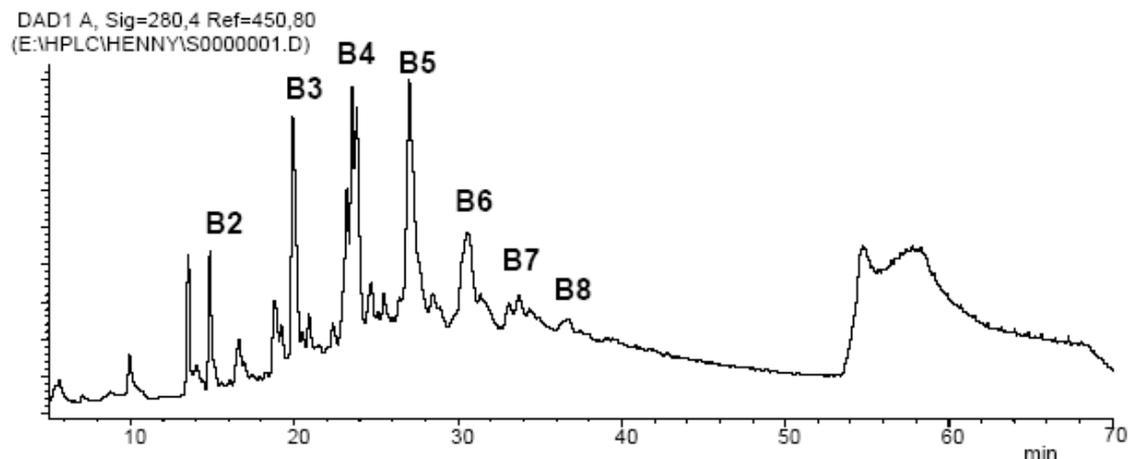
Die letzte der über Sephadex-Trennung aus dem AS03B eluierten Fraktionen wies das breiteste chemopräventive Spektrum bei gleichzeitig höchster Aktivität auf (Tabelle 13). Ähnlich verhielt es sich mit ihren Subfraktionen, die vor allem im Hinblick auf ihr antioxidatives Potenzial und die Hemmung der Aromatase eine durchgängig hohe Aktivität in sich vereinten. Besonders auffällig bei der Aromatasehemmung war ein tendenzieller Anstieg der Aktivität in den späteren CPC-Subfraktionen. Dennoch gingen nicht unbedeutende Effekte wie auch im Fall der Cyp 1A Hemmung bereits von den zu Beginn eluierten Verbindungen aus.

**Tabelle 13: Zusammenfassung des chemopräventiven Potenzials der Sephadex-Fraktion B 7 sowie deren CPC-Subfraktionen B 7.2 bis B 7.18.**

	<b>Cyp 1A</b>	<b>QR</b>	<b>DPPH</b>	<b>H/XO</b>	<b>ORAC</b>	<b>AR</b>	<b>Cox-1</b>
<b>B 7</b>	<b>1.6</b>	>40.4	<b>2.6</b>	<b>4.4</b>	<b>3.4</b>	<b>1.5</b>	<b>58*</b>
<b>B 7.2</b>	<b>1.4</b>	>50	<b>3.3</b>	6.8	<b>3.6</b>	<b>1.2</b>	47
<b>B 7.3</b>	<b>3.9</b>	>50	<b>3.0</b>	6.6	<b>3.8</b>	<b>3.2</b>	39
<b>B 7.4</b>	<b>3.8</b>	>50	<b>3.3</b>	5.7	<b>3.7</b>	<b>2.8</b>	<b>53</b>
<b>B 7.5</b>	<b>5.0</b>	>50	<b>3.1</b>	6.5	<b>3.3</b>	<b>2.9</b>	41
<b>B 7.6</b>	<b>4.9</b>	>50	<b>2.5</b>	5.0	<b>3.9</b>	<b>2.4</b>	39
<b>B 7.7</b>	>5	>50	<b>2.7</b>	<b>3.4</b>	<b>3.6</b>	<b>3.5</b>	42
<b>B 7.8</b>	>5	>50	<b>2.5</b>	<b>3.7</b>	<b>5.0</b>	<b>3.3</b>	40
<b>B 7.9</b>	>5	>47.1	<b>3.4</b>	5.3	<b>4.7</b>	<b>2.9</b>	40
<b>B 7.10</b>	>5	>34.7	<b>2.7</b>	<b>4.5</b>	<b>4.6</b>	<b>2.5</b>	37
<b>B 7.11</b>	<b>4.9</b>	>31.8	<b>3.0</b>	<b>4.8</b>	<b>4.2</b>	<b>2.4</b>	44
<b>B 7.12</b>	<b>4.8</b>	>32.1	<b>3.0</b>	5.7	<b>4.0</b>	<b>2.0</b>	41
<b>B 7.13</b>	<b>3.4</b>	>30.2	<b>3.5</b>	6.0	<b>3.5</b>	<b>1.4</b>	42
<b>B 7.14</b>	<b>4.8</b>	>36.2	<b>3.2</b>	<b>4.6</b>	<b>4.4</b>	<b>1.5</b>	49
<b>B 7.15</b>	<b>4.9</b>	>24.6	<b>4.0</b>	5.7	<b>3.8</b>	<b>1.6</b>	40
<b>B 7.16</b>	>5	>23.8	<b>4.0</b>	6.3	<b>3.6</b>	<b>1.5</b>	40
<b>B 7.17</b>	<b>2.9</b>	10.6	5.3	7.9	n.b.	<b>1.7</b>	44
<b>B 7.18</b>	>5	>30.9	<b>3.1</b>	<b>4.5</b>	<b>3.5</b>	<b>1.0</b>	45

\* bei 400 µg/ml getestet; n.b. = nicht bestimmt, Erläuterungen siehe Tabelle 7

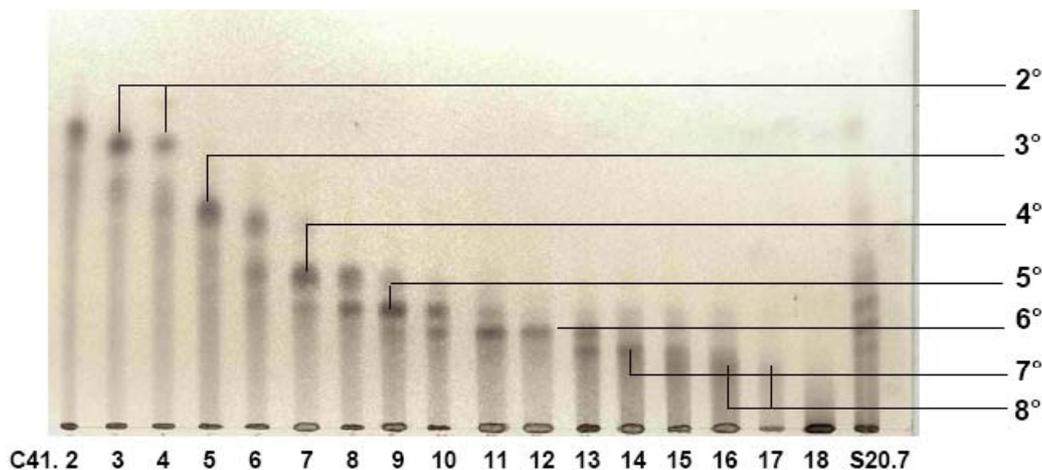
Die Charakterisierung der Fraktion B 7 und ihrer CPC-Subfraktionen wurde dadurch erschwert, dass das bei der bisherigen HPLC-Analytik verwendete Umkehrphasen-System versagte. Da die Verbindungen erst sehr spät von der Sephadex-Säule eluierten, wurde vermutet, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um hochkomplexe Procyanidine handelte, die sich aus einer Vielzahl von Catechin- bzw. Epicatechin-Einheiten zusammensetzen und für den Apfel charakteristisch sind. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Mutterfraktion eine Normalphasentrennung (NP) herangezogen, die die Separation dieser Verbindungsklasse ermöglichte. Abbildung 14 zeigt das entsprechende Chromatogramm, das die Identifikation von oligomeren Procyanidinen bis zum Oktamer (acht Catechin- oder Epicatechin-Einheiten) ermöglichte.



**Abbildung 14: NP-HPLC Chromatogramm der Fraktion B 7 bei 280 nm (Zeßner, 2005).**

Der Absorptionshügel ab einer Retentionszeit von ca. 45 min rührte von der Elution der polymeren Procyanidine her, die sich durch dieses HPLC-System zwar von den oligomeren Procyanidinen separieren ließen, untereinander jedoch ungetrennt blieben.

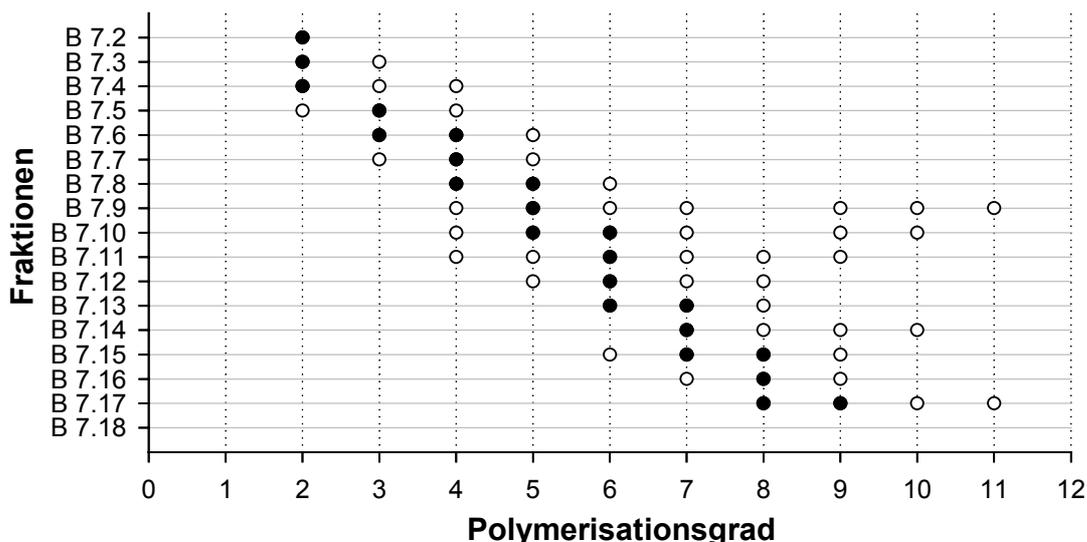
Oligomere Procyanidine bis zum achten Polymerisationsgrad konnten auch in den Subfraktionen durch dünnschichtchromatographische Untersuchung nachgewiesen werden (Abbildung 15). Das Dünnschichtchromatogramm zeigte jedoch, dass es sich bei den meisten Fraktionen um Mischungen einzelner Procyanidine handelte.



**Abbildung 15: Dünnschichtchromatogramm der Subfraktionen B 7.2 bis B 7.18 (Zeßner, 2005). 2° - 8° = Polymerisationsgrade.**

Die genaue Zusammensetzung der Fraktionen wurde durch die Bestimmung der Molekulargewichte mittels Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektroskopie analysiert.

Über die Masse konnte anhand von Daten aus der Literatur auf den Polymerisationsgrad geschlossen werden. Abbildung 16 zeigt die Verteilung der Procyanidine verschiedener Polymerisationsgrade in den einzelnen Subfraktionen. Bei den meisten Fraktionen handelte es sich somit nachweislich um Gemische, die aus Procyanidinen mit bis zu sieben verschiedenen Polymerisationsgraden bestanden.



**Abbildung 16: Verteilung von Procyanidinen verschiedener Polymerisationsgrade in den Subfraktionen der Fraktion B 7.** • = vorherrschende Polymerisationsgrade, ○ = in geringeren Mengen vorliegende Polymerisationsgrade.

Eine genauere Strukturzuweisung, die Aufschluss über die Bindungsposition der einzelnen Einheiten und damit über den Procyanidintyp geben würde, war in den Fraktionen aufgrund der geringen Ausbeute nicht möglich, da dazu die einzelnen Verbindungen isoliert werden müssten. Zu Gunsten der biologischen Testung wurde auf diese analytischen Untersuchungen verzichtet.

Neben den Procyanidinen eluierte in der ersten, in Abbildung 16 nicht aufgeführten Fraktion, Quercetin, das über seine Masse sowie mittels HPLC identifiziert wurde.

### 3.2.7 Aktivitäten identifizierter und isolierter Reinsubstanzen

Eine Vielzahl der in den Extrakten, Fraktionen und Subfraktionen identifizierten Reinsubstanzen konnte entweder käuflich erworben oder im Rahmen der Fraktionierung

isoliert werden. Die im Folgenden beschriebenen Aktivitäten aus dem chemopräventiven Screening werden nach Substanzklassen erläutert und sind Tabelle 14 zu entnehmen.

#### *Phenolcarbonsäuren (1a-1e)*

Die untersuchten Phenolcarbonsäuren wiesen (bis zu einer Testkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  in allen Testsystemen außer ORAC) lediglich im Hinblick auf das Peroxylradikalfängerpotenzial interessante Aktivitäten auf. Dabei waren vor allem die Kaffeesäure (1b) sowie die *p*-Cumarsäure (1d) von Bedeutung. Bei einer Konzentration von 1.0  $\mu\text{M}$  waren sie drei mal aktiver als die Referenzsubstanz Trolox. Obwohl die Chlorogensäure (1a) als Hauptkomponente der Fraktion B 3.6 (Abbildung 10) in einer Konzentration von 0.4  $\mu\text{g/ml}$  einen ORAC-Wert von 3.2 erreichte (Tabelle 9), betrug der Wert bei Einsatz der Reinsubstanz in einer Konzentration von 1.0  $\mu\text{M}$  lediglich 2.4. Wenn davon ausgegangen würde, dass die Fraktion zu 90 % aus Chlorogensäure besteht, entspräche dies ebenfalls einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . In der Fraktion befinden sich allerdings auch geringe Mengen an Phloretin-2'-xyloglukosid (2b), dem ebenfalls ein starkes Potenzial zum Abfangen von Peroxylradikalen nachgewiesen werden konnte (s. u.). Möglicherweise kommt es durch die Kombination der beiden Verbindungen zu synergistischen oder additiven Effekten. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste allerdings die quantitative Zusammensetzung der Fraktion bekannt sein.

#### *Dihydrochalkone (2b, 2e, 2f)*

Um gute Peroxylradikalfänger handelte es sich auch bei den Glykosiden des Phloretins, wobei das Glukosid Phloridzin (2e) zu besseren Ergebnissen führte als das Xyloglukosid (2b). Die ausgeprägte Aktivität von Phloridzin (2e) fand sich in den Subfraktionen B 3.9 (Tabelle 9), B 4.4 und B 4.5 (Tabelle 10) wieder. Interessanterweise enthielt die Fraktion B 4.3 vergleichbare Mengen der Verbindung, erzielte dabei jedoch einen wesentlich schlechteren ORAC-Wert. In diesem Fall muss in Betracht gezogen werden, dass die außerdem in der Fraktion enthaltenen Phloretinderivate Hydroxyphloretin-2'-xyloglukosid (2a) und Hydroxyphloretin-2'-glukosid (2g) dem Effekt entgegenwirken (Abbildung 11).

Das Aglykon (2f) war im Vergleich zu den getesteten Glykosiden hinsichtlich der Hemmung von Peroxylradikalen wesentlich inaktiver. Allerdings zeigte es eine äußerst ausgeprägte Hemmung von Cyp 1A mit einem  $IC_{50}$  von  $1.0 \mu\text{M}$ . Fraktion B 5.9, die in erster Linie aus Phloretin bestand, für die jedoch kein Chromatogramm vorliegt, veranschaulichte diese Aktivität sehr deutlich. Die Fraktion hemmte Cyp 1A mit einem  $IC_{50}$  von  $0.5 \mu\text{g/ml}$ . Unter der Annahme, dass die Fraktion zu 100 % aus Phloretin besteht, entspricht dies einer Konzentration von  $1.8 \mu\text{M}$ . Darüber hinaus übte Phloretin eine effektive Hemmung der Cox-1 aus, wobei die genauere Untersuchung dosisabhängiger Effekte erbrachte, dass zur halbmaximalen Hemmung des Enzyms eine Konzentration von  $20.0 \mu\text{M}$  Phloretin erforderlich war.

#### *Flavan-3-ole (3a-3g)*

Alle getesteten Verbindungen dieser Klasse zeichneten sich durch ein bedeutendes antioxidatives Potenzial aus. Während im ORAC-Test sowohl Mono- als auch Oligomere (3a-f) eine ausgeprägte Wirkung hatten, beschränkte sich die Fähigkeit DPPH- und Superoxidanionradikale abzufangen, auf das Tri-, Tetra- und Pentamer (3e-g) der Procyanidine. Die ORAC-Aktivitäten der Monomere finden sich z. B. in Fraktion B 6.6 wieder, die vor allem aus Epicatechin besteht (Abbildung 13). Die Aktivität von  $0.4 \mu\text{g/ml}$  der Fraktion (4.6 ORAC-Einheiten) ist dabei vergleichbar mit der Aktivität, die von  $1.0 \mu\text{M}$  Reinsubstanz ausgeht (4.3 ORAC-Einheiten). Fast alle Subfraktionen der B 7 zeichnen sich nicht nur durch ein sehr gutes DPPH- und Peroxylradikalfängerpotenzial aus, sondern auch durch die Fähigkeit zur Hemmung der Aromatase und teilweise von Cyp 1A (Tabelle 13). Diese Aktivitäten sind vor allem auf Procyanidine mit einem Polymerisationsgrad von fünf und mehr zurückzuführen. Als Reinsubstanz konnte bisher lediglich das Pentamer (3g) getestet werden, das eine starke Hemmung der Aromatase bewirkte. Interessanterweise stellte sich bei Betrachtung der isolierten Procyanidine eine Korrelation der Aktivität mit zunehmendem Polymerisationsgrad ein, wie sie bereits im Falle der procyanidinreichen CPC-Fractionen der Fraktion B 7 aufgefallen war. Catechin (3b) und Epicatechin (3c) führten zu einer effektiven Hemmung der Cox-1 Aktivität, die im Falle des Epicatechins (3c) durch eine Konzentration von  $7.5 \mu\text{M}$  halbiert wurde. Das Flavanol ist somit vermutlich für die Cox-1-hemmende Wirkung der Fraktionen B 6.5 bis B 6.7 verantwortlich (Tabelle 12 und Abbildung 13).

*Quercetin-glykoside (4a-4h)*

Unter den acht getesteten Verbindungen dieser Substanzklasse vereinten sich die meisten chemopräventiven Eigenschaften mit meist der höchsten Effektivität im Aglykon Quercetin (4h). Besonders markant war dabei die Hemmung von Cyp 1A. Quercetin führte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.026 \mu\text{M}$  im Rahmen der gesamten Fraktionierung zur stärksten Hemmung des Enzyms. Ebenso konnte die Aktivität der QR durch  $2.6 \mu\text{M}$  Quercetin verdoppelt werden, eine Wirkung, die sich nur auf wenige der getesteten Substanzen und Fraktionen beschränkte. Die Modulation des Fremdstoffmetabolismus erfolgte außerdem durch das Rhamnosid (4g), das Arabinofuranosid (4e) und das Xylosid (4d), wobei das Xylosid die beste Cyp 1A Hemmung und das Rhamnosid die beste QR Induktion aufwies. Diese Aktivitäten fanden sich vor allem in den Subfraktionen der Fraktionen B 5 und B 6 wieder. Bei den Niederschlägen B 5.5 ND und B 5.6 ND handelte es sich um Quercetin-3-rhamnosid (4g), das zum Großteil auch in Fraktion B 5.7 enthalten war. Die Konzentrationen von  $1.6$  bzw.  $1.8 \mu\text{g/ml}$  der Fraktionen führten zu einer 50 %igen Hemmung von Cyp 1A. Diese Konzentrationen entsprechen  $3.6$  bzw.  $4.0 \mu\text{M}$  Reinsubstanz. Der  $IC_{50}$  von Quercetin-3-rhamnosid (4g) nach Testung als Reinsubstanz lag für die Cyp 1A Hemmung ebenfalls bei  $3.6 \mu\text{M}$ . Bei den verbleibenden Aktivitäten erwiesen sich die Arabinoside (4e,f) sowie das Rutinosid (4a) als aktive Peroxylradikalfänger und das Glukosid (4c) als potenter Aromatasehemmer mit einem  $IC_{50}$  von  $1.5 \mu\text{M}$ .

	Cyp 1A	QR	DPPH	H/XO	ORAC	AR	Cox-1
<b>1a</b> Chlorogensäure	>50	>50	>50	>50	2.4	>50	14
<b>1b</b> Kaffeesäure	>50	>50	>50	44.0	<b>3.0</b>	>50	10
<b>1c</b> 4-Cumarylchinasäure	>50	>50	>25	>50	2.6	>50	7
<b>1d</b> <i>p</i> -Cumarsäure	>50	>50	>50	>50	<b>3.0</b>	>12.5	2
<b>1e</b> Ferulasäure	>50	>50	>50	>50	2.1	>12.5	5
<b>2b</b> Phloretin-2'-xyloglukosid	>50	>50	>25	>50	<b>3.5</b>	>50	32
<b>2e</b> Phloridzin	>50	>50	>50	>50	<b>4.0</b>	>50	32
<b>2f</b> Phloretin	<b>1.0</b>	25.0	>50	>50	2.1	20.7	<b>88</b>
<b>3a</b> Procyanidin B1	>50	>50	10.9	14.1	<b>3.4</b>	>50	17
<b>3b</b> (+)-Catechin	>50	>50	17.7	39.3	<b>3.9</b>	>50	<b>80</b>
<b>3c</b> (-)-Epicatechin	>50	>50	13.7	7.0	<b>4.3</b>	>50	<b>88</b>
<b>3d</b> Procyanidin B2	>50	>50	6.8	13.1	<b>5.1/3.7</b>	>50	31
<b>3e</b> Procyanidin C1	43.2	>50	<b>4.4</b>	7.0	<b>3.4</b>	9.0	51
<b>3f</b> Procyanidin-Tetramer	11.8	>50	<b>2.3</b>	<b>4.3</b>	<b>3.6</b>	5.2	42
<b>3g</b> Procyanidin-Pentamer	5.9	>50	<b>3.5</b>	<b>4.4</b>	2.8	<b>1.6</b>	43
<b>4a</b> Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	32.8	>50	16.8	>50	<b>3.9</b>	>50	13
<b>4b</b> Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	48.2	>50	15.8	>50	2.3	>50	11
<b>4c</b> Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	>50	>50	15.7	>50	2.1	<b>1.5</b>	11
<b>4d</b> Quercetin-3-xylosid (Renoutrin)	<b>1.2</b>	<b>11.9</b>	12.7	>50	2.8	>50	4
<b>4e</b> Quercetin-3-arabinofuranosid	<b>3.6</b>	>50	9.2	>50	<b>3.2</b>	10.3	0
<b>4f</b> Quercetin-3-arabinopyranosid	8.3	>50	8.4	>50	<b>4.2</b>	18.9	n.b.
<b>4g</b> Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	<b>3.6</b>	<b>5.1</b>	20.4	>50	2.2	>50	6
<b>4h</b> Quercetin	<b>0.026</b>	<b>2.6</b>	8.6	18.3	2.9	<b>2.8</b>	47

**Tabelle 14: Zusammenfassung des chemopräventiven Potenzials der getesteten Reinsubstanzen.** (Erläuterungen siehe Tabelle 7)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass von der Stoffklasse der Phenolcarbonsäuren vor allem das Potenzial zum Abfangen von Peroxylradikalen ausging. Dihydrochalkone wiesen zusätzlich die Fähigkeit auf das Phase 1 Enzym Cyp 1A zu hemmen und waren weiterhin für die Reduktion der Cox-1 Aktivität verantwortlich. Ähnlich verhielt es sich mit den Flavanolen, die weiterhin DPPH- und Superoxidanionradikale unschädlich machten. Die Quercetinderivate modulierten effektiv den Fremdstoffmetabolismus und waren zum Teil in der Lage, Peroxylradikale abzufangen und die Aromatase zu hemmen. Die Gruppe der Procyanidine hob sich von allen anderen Klassen ab, da diesen Verbindungen in allen durchgeführten Tests ausgeprägte chemopräventive Eigenschaften nachgewiesen werden konnten.

Sowohl bei den Dihydrochalkonen als auch bei den Quercetinderivaten zeigte der Vergleich zwischen Glykosiden und Aglyka, dass in den meisten Fällen die freie Form zu höheren Aktivitäten führte. Eine Ausnahme bildete das Peroxylradikalfängerpotenzial, das bei den Glykosiden deutlich stärker ausgeprägt war. Ähnlich verhielt es sich bei der Hemmung der Aromatase durch Quercetin (4h) und das entsprechende Glukosid (4c).

Eine Besonderheit der Procyanidine war die Zunahme der Aktivität mit steigendem Polymerisationsgrad, wie es sich vor allem bei der Hemmung von Cyp 1A und der Aromatase äußerte. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität der Cox-1 wesentlich besser durch die Monomere reduziert, während die Oligomere nur mittelmäßige Effekte bewirkten (31-51 % Hemmung bei 100  $\mu$ M).

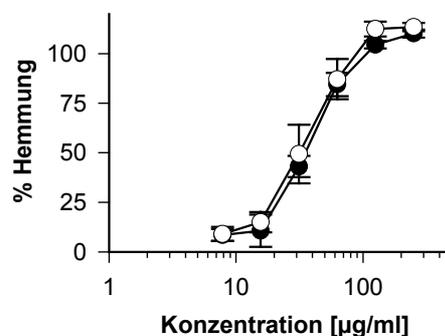
### **3.3 Weiterführende *in vitro* Untersuchungen an humanen Kolonkarzinomzelllinien**

Die Arbeit mit kultivierten Kolonkarzinomzellen stellte eine Erweiterung des chemopräventiven Screenings dar, um Aufschluss darüber zu erhalten, inwieweit die als aktiv eingestuften Fraktionen und Verbindungen eine Relevanz in der Beeinflussung der Kolonkarzinogenese haben. Unter Verwendung der humanen Adenokarzinomzelllinie HCT116 sowie deren p21(-/-) Zelllinie 8054 wurde der Einfluss auf die Proliferation untersucht. Als interessant galt eine halbmaximale Hemmkonzentration von unter 50  $\mu$ g/ml (Extrakt und Mutterfraktionen) bzw. unter 25  $\mu$ g/ml (Subfraktionen). Um Aufschluss

darüber zu erlangen, inwieweit die Hemmung der Proliferation auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen ist, wurde ferner die Expression einiger Proteine untersucht, die für den programmierten Zelltod von Bedeutung sind.

### 3.3.1 Antiproliferative Wirkung

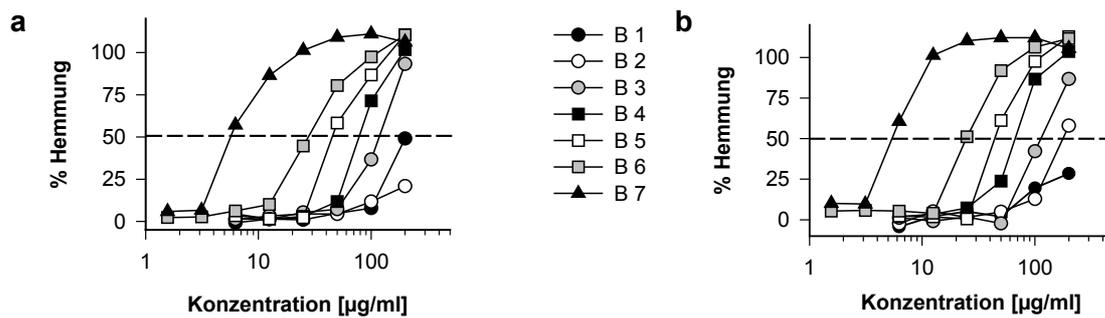
Zur Analyse antiproliferativer und zytotoxischer Effekte wurden die Zellen in 96-Loch-Platten kultiviert und mit dem Extrakt in einem Konzentrationsbereich von 7.8 – 250.0  $\mu\text{g/ml}$  für 72 h inkubiert. Der AS03B führte in beiden Zelllinien gleichermaßen zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Dosisabhängige Hemmung der Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen.** HCT116-p21(+/-) (●) und 8054-p21(-/-) (○) Zellen wurden für 72 h mit AS03B inkubiert. Aus sechs seriellen Konzentrationen in Doppelbestimmungen erfolgte die Berechnung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen wurden aus vier unabhängigen Experimenten berechnet.

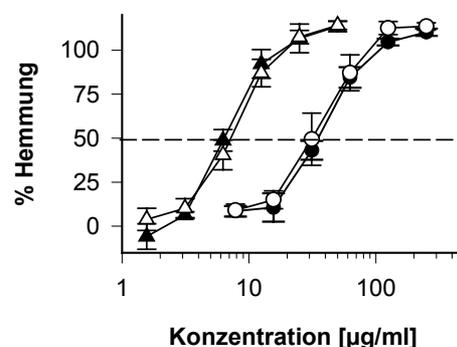
Das Wachstum der parentalen Zelllinie HCT116 wurde dabei in einer Konzentration von  $34.7 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$  zu 50 % gehemmt. Die halbmaximale Hemmkonzentration in der 8054 Zelllinie betrug  $33.6 \pm 7.0 \mu\text{g/ml}$ .

Bei den sieben Sephadex-Fractionen, die direkt aus dem AS03B gewonnen wurden, nahm die antiproliferative Aktivität mit späterer Eluierung von der Sephadex-Säule zu (Abbildung 18). Das Wachstum beider Zelllinien wurde im gleichen Ausmaß beeinflusst. Lediglich die beiden zuletzt von der Säule eluierten Fraktionen B 6 und B 7 zeigten in beiden Zelllinien  $\text{IC}_{50}$ -Werte um bzw. unter  $25 \mu\text{g/ml}$ .



**Abbildung 18: Proliferationshemmung humaner Kolonkarzinomzellen HCT116-p21(+/+) (a) und 8054-p21(-/-) (b) durch die Mutterfraktionen B 1 bis B 7.** Zellen wurden für 72 h mit den Fraktionen inkubiert. Aus sechs seriellen Konzentrationen in Doppelbestimmungen erfolgte die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte. Einmalige Testung im Rahmen des Screenings.

Die aktivste Fraktion B 7 zeigte im Vergleich zum Ausgangsextrakt in beiden Linien eine vier- bis fünfmal höhere Toxizität auf, was darauf schließen ließ, dass die Inhaltsstoffe dieser Fraktion maßgeblich am wachstumshemmenden Effekt des Extraktes beteiligt waren. Im direkten Vergleich mit dem Extrakt wurden für B 7 Konzentrationen von  $6.7 \pm 0.4$  (HCT116) bzw.  $7.2 \pm 0.9$   $\mu\text{g/ml}$  (8054) ermittelt, um das Wachstum der Zellen um 50 % zu reduzieren (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Dosisabhängige Hemmung der Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen durch AS03B und B 7.** Die Zellen wurden für 72 h mit AS03B (●) bzw. B 7 (▲) inkubiert. Aus sechs seriellen Konzentrationen in Doppelbestimmung erfolgte die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen wurden aus vier unabhängigen Experimenten berechnet. Schwarze Symbole stehen für HCT116-p21(+/+), weiße Symbole für 8054-p21(-/-).

Die Ergebnisse aller getesteten Fraktionen und Subfraktionen zum antiproliferativen Potenzial sind in Tabelle 15 in Form von  $IC_{50}$ -Werten aufgeführt. Bei Betrachtung der Subfraktionen wird deutlich, dass gute Hemmungen jeweils vereinzelt in den frühen

Subfraktionen auftraten und eine höhere Toxizität vor allem in den Subfraktionen der später eluierten Mutterfraktionen B 6 und B 7 erkennbar wurde.

Ein gemeinsames Merkmal der frühen Subfraktionen B 3.1, B 3.2, B 4.1, B 6.1 und B 6.2 ist der Gehalt oligomerer Procyanidine (3h), wie bereits aus Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 13 ersichtlich wurde. Fraktion B 5.1 zeigte ebenfalls gutes Hemmpotenzial, ihre Zusammensetzung konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise sind auch hier über RP-HPLC nicht identifizierbare polymere Procyanidine enthalten, die für die Aktivität verantwortlich sein könnten. Auch über die Aktivität der Fraktion B 5.2 kann nur spekuliert werden. Das zu großen Anteilen darin enthaltene unbekanntes Phloretin-glykosid (2d) konnte als Reinsubstanz nicht gewonnen und getestet werden (Abbildung 12), sodass keine Aussage über dessen antiproliferative Aktivität möglich ist.

Zu den über CPC jeweils später eluierten Subfraktionen, die die Proliferation gut hemmten, zählt die Fraktion B 3.8, deren Hauptpeak nicht identifiziert werden konnte (Abbildung 10). Die Beteiligung des enthaltenen Phloridzins am antiproliferativen Effekt kann ausgeschlossen werden (s. u.). Auch die Aktivität der Fraktion B 5.5 kann nicht durch die analysierten Bestandteile erklärt werden. Ihr Hauptbestandteil ist das Quercetin-3-rhamnosid (4g) (Abbildung 12), das ebenfalls nicht an der Toxizität beteiligt sein kann (s.u.). Ähnlich verhielt es sich mit den Subfraktionen B 6.9 und B 6.10, die trotz ihrer antiproliferativen Wirkung keine identifizierten Verbindungen enthielten, die als Reinsubstanzen das Zellwachstum hemmten. Quercetin-3-arabinofuranosid (4e) und Quercetin-3-rhamnosid (4g), die die Hauptbestandteile dieser Subfraktionen darstellen (Abbildung 13) waren bis 100  $\mu\text{M}$  nicht toxisch (s. u.).

Die beste antiproliferative Wirkung wurde von den procyanidinreichen Subfraktionen B 7.2 bis B 7.18 erreicht. Interessanterweise kam es auch hier, wie bereits zuvor beobachtet, zu einer Zunahme der Aktivität mit ansteigender CPC-Fraktionierung. Allerdings scheint sich bei Fraktion B 7.11 ein Aktivitätsmaximum einzustellen, das durch die folgenden Subfraktionen, d. h. mit einem Polymerisationsgrad von mehr als sechs bis neun Einheiten nicht überschritten wird.

Tabelle 15: Zusammenfassung der antiproliferativen Aktivität aller Fraktionen und Subfraktionen des AS03B.

Fraktion	IC <sub>50</sub> [µg/ml]		Fraktion	IC <sub>50</sub> [µg/ml]			
	HCT116-p21+/+	8054-p21-/-		HCT116-p21+/+	8054-p21-/-		
<b>B 1</b>	>50	>50	<b>B 6</b>	27.6	25.2		
<b>B 2</b>	>50	>50		B 6.1	28.4	<b>10.9</b>	
<b>B 3</b>	>50	>50		B 6.2	27.2	<b>10.4</b>	
	B 3.1	25.5		27.6	B 6.3	>50	27.9
	B 3.2	38.0		29.2	B 6.4	>50	25.4
	B 3.3	40.9		30.0	B 6.5	>50	30.7
	B 3.4	>50		>50	B 6.6	>50	27.5
	B 3.5	>50		>50	B 6.7	>50	48.4
	B 3.6	>50		>50	B 6.8	>50	>50
	B 3.7	>50		45.4	B 6.9	34.6	<b>21.0</b>
	B 3.8	<b>15.8</b>	28.7	B 6.10	28.7	<b>17.0</b>	
	B 3.9	>50	>50	<b>B 7</b>	<b>7.2</b>	<b>6.4</b>	
<b>B 4</b>	>50	>50	B 7.2		n.b.	<b>8.7</b>	
	B 4.1	31.3	<b>18.3</b>		B 7.3	<b>13.0</b>	<b>9.8</b>
	B 4.2	>50	40.8		B 7.4	n.b.	<b>8.2</b>
	B 4.3	>50	>50		B 7.5	n.b.	<b>7.5</b>
	B 4.4	>50	>50		B 7.6	<b>11.0</b>	<b>6.5</b>
	B 4.5	>50	>50		B 7.7	n.b.	<b>5.7</b>
<b>B 5</b>	>50	>50	B 7.8		<b>6.8</b>	<b>4.3</b>	
	B 5.1	28.5	<b>19.7</b>		B 7.9	n.b.	<b>4.3</b>
	B 5.2	30.8	<b>21.8</b>		B 7.10	<b>6.5</b>	<b>4.8</b>
	B 5.3	>50	40.1	B 7.11	n.b.	<b>4.0</b>	
	B 5.4	>50	>50	B 7.12	n.b.	<b>4.1</b>	
	B 5.5	25.4	<b>23.9</b>	B 7.13	<b>4.7</b>	<b>4.1</b>	
	B 5.6	n.b.	n.b.	B 7.14	n.b.	<b>4.1</b>	
	B 5.7	42.9	42.9	B 7.15	<b>4.8</b>	<b>4.1</b>	
	B 5.8	>50	46.2	B 7.16	n.b.	<b>4.1</b>	
	B 5.9	>50	21.4	B 7.17	<b>6.1</b>	<b>5.4</b>	
			B 7.18	<b>4.7</b>	<b>4.0</b>		

n.b. = nicht bestimmt

Die Untersuchung der Reinsubstanzen ergab, dass cytotoxische Aktivitäten von den Aglyka Quercetin und Phloretin ausgingen. Quercetin führte in einer Konzentration von  $21.7 \pm 2.8 \mu\text{M}$  zu einer 50 %igen Hemmung des Zellwachstums in HCT116 Zellen, während bei der 8054 Zelllinie der IC<sub>50</sub> bei  $32.2 \pm 6.8 \mu\text{M}$  lag. Im Falle des Phloretins waren Konzentrationen von  $57.3 \pm 9.8$  und  $61.3 \pm 4.3 \mu\text{M}$  erforderlich, um das Wachstum der beiden Zelllinien um 50 % zu hemmen. Als besonders interessant erwiesen sich weiterhin die Procyanidine, die jedoch nur in Versuchen mit der Zelllinie 8054 getestet wurden. Procyanidin C1, das isolierte Tetramer und das Pentamer hemmten in Konzentrationen von 7.7, 4.6 und  $4.6 \mu\text{M}$  das Zellwachstum um 50 %. Alle anderen getesteten Reinsubstanzen zeigten in Konzentrationen (z. T. weit) über  $100 \mu\text{M}$  keine

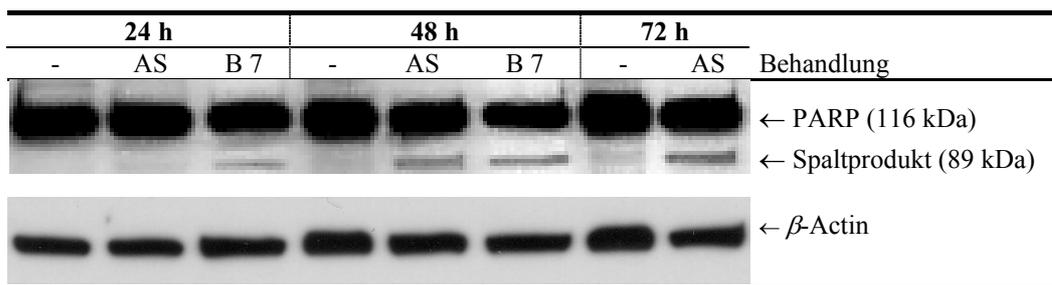
antiproliferative Wirkung. Bei den inaktiven Verbindungen handelte es sich um Chlorogensäure, Kaffesäure, 4-Cumaroylchinasäure, *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Phloretin-2'-xyloglukosid, Phloridzin, Procyanidin B 1, Catechin, Epicatechin, Procyanidin B2, Quercetin-3-rutinosid, Quercetin-3-galaktosid, Quercetin-3-glukosid, Quercetin-3-xylosid, Quercetin-3-arabinofuranosid, Quercetin-3-arabinopyranosid und Quercetin-3-rhamnosid.

### 3.3.2 Induktion von Apoptose

In der Prävention und Behandlung von Krebs stellt der programmierte Zelltod einen vielversprechenden Mechanismus zur Eliminierung entarteter Zellen dar (Kim, 2005). Die Apoptose kann über zwei verschiedene Wege induziert werden. Es wird dabei der extrinsische, über den Todesrezeptor ausgelöste Weg vom intrinsischen Weg, der über die Mitochondrien vermittelt wird, unterschieden (Khosravi-Far & Esposti, 2004). In beiden Fällen wird eine Kaskade spezifischer Proteasen in Gang gesetzt. Die sog. Caspasen (*cysteinyln-aspartate specific proteases*) bewirken eine Reihe verschiedener biochemischer und morphologischer Veränderungen, die für den Ablauf der Apoptose charakteristisch sind. An der Vermittlung apoptotischer Signale über den Todesrezeptor CD95 (APO-1/Fas) ist unter anderem die Caspase-8 beteiligt, deren Spaltung zur Aktivierung weiterer Enzyme dieser Familie führt.

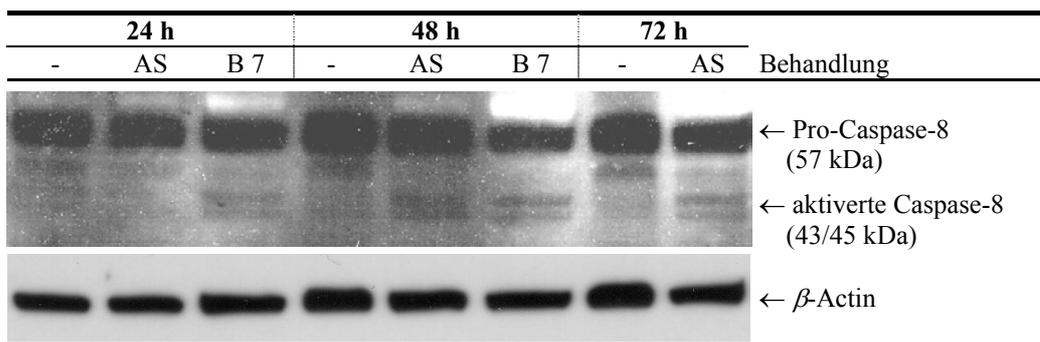
Eines der bedeutendsten Merkmale der Apoptose ist die aus der Aktivierung der Caspase-Kaskade resultierende Spaltung des DNA-Reparatur-assoziierten Enzyms Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP) (Debatin & Krammer, 2004). Nach der Behandlung von HCT116 Zellen mit 65 µg/ml AS03B für 48 h konnte als erster Hinweis auf die Induktion von Apoptose das charakteristische PARP-Spaltprodukt von 89 kDa detektiert werden, das nach Behandlung für 72 h noch deutlicher zu sehen war (Abbildung 20).

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit der Fraktion B 7 in einer Konzentration von 15 µg/ml bereits nach 24 h zur Spaltung des Proteins, die sich wiederum nach 48 h verstärkte. Da ein Großteil der Zellen nach einer Behandlung über 72 h nicht mehr intakt war, wurde die PARP-Spaltung unter diesen Bedingungen nicht untersucht.



**Abbildung 20: PARP-Spaltung in HCT116 Zellen.** Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 65  $\mu$ g/ml AS03B (AS) oder 15  $\mu$ g/ml B 7 bzw. 0.5 % DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle. Ganzzelllysate wurden unter Verwendung eines Antikörpers, der sowohl gegen PARP, als auch das 89 kDa große Spaltprodukt gerichtet war, einer Western Blot Analyse unterzogen.  $\beta$ -Actin diente als Ladungskontrolle.

Zur Identifikation des involvierten Signalweges wurde der Einfluss der beiden Behandlungen auf die am Rezeptorweg beteiligte Caspase-8 untersucht (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Spaltung von Caspase-8 in HCT116 Zellen.** Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 65  $\mu$ g/ml AS03B (AS) oder 15  $\mu$ g/ml B 7 bzw. 0.5 % DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle. Ganzzelllysate wurden unter Verwendung eines Antikörpers, der sowohl gegen die Pro-Caspase-8, als auch deren 43 und 45 kDa große Spaltprodukte gerichtet war, einer Western Blot Analyse unterzogen.  $\beta$ -Actin diente als Ladungskontrolle.

Ähnlich wie zuvor führte die Behandlung mit dem Extrakt erst nach 48 h und 72 h zu einer deutlichen Spaltung und damit Aktivierung des Enzyms, während bei der procyanidinreichen Fraktion bereits nach 24 h erste Effekte nachweisbar waren, die sich nach 48 h verstärkten. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass von der Fraktion B 7 im Vergleich zum Extrakt ein stärkerer Effekt ausging, da die Fraktion in einer mehr als vierfach niedrigeren Konzentration eingesetzt wurde.

### 3.4 Wirkung von Apfeltrübsaft und polyphenolreichem Apfelextrakt auf die genetisch induzierte Karzinogenese im Darm von *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen

Basierend auf den *in vitro* Ergebnissen sollte der Einfluss polyphenolischer Apfelinhaltsstoffe auf die Entstehung intestinaler Tumore in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen untersucht werden, um die Relevanz des chemopräventiven Potenzials dieser Verbindungen *in vivo* zu verifizieren. Im Rahmen einer Interventionsstudie wurden als natürliches Stoffgemisch trüber Apfelsaft (TAS) und im Vergleich konzentrierte Polyphenole in Form eines polyphenolreichen Apfelextraktes (PAE) eingesetzt. Bei dem PAE handelte es sich um eine Mischung der Extrakte AS03B und AS04. Entsprechend der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (siehe Kapitel 2.1) resultierte die 1:1 Mischung der beiden Extrakte in einer Ergänzung des Polyphenolspektrums, das im Endeffekt dem des kompletten Apfels entsprach, da die Mischung sowohl phenolische Verbindungen aus dem Fruchtfleisch als auch aus der Schale enthielt. Das Gemisch wurde in einer Konzentration von 0.2 % im Trinkwasser gelöst eingesetzt. Um eventuelle Einflüsse der Behandlung auf den unveränderten Darm gesunder Tiere zu kontrollieren, wurde die Intervention zum Vergleich an den entsprechenden Wildtyptieren durchgeführt.

#### *Zusammensetzung der zur Intervention verwendeten polyphenolischen Formulierungen*

Die quantitative Analyse des verwendeten trüben Apfelsaftes (TAS) und der Extrakte wurde an der Forschungsanstalt Geisenheim mittels HPLC durchgeführt. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Gehalte der verwendeten Extrakte und ihrer Mischung (PAE) sind in der im Versuch eingesetzten Konzentration aufgeführt. Ferner ist zum Vergleich die Zusammensetzung des AS02 aufgeführt.

Der Vergleich der Analysen zeigte, dass bezüglich des gesamten Polyphenolmusters die Extrakte AS02 und AS04 eine große Ähnlichkeit aufweisen. Die Unterschiede zwischen A-Saft und B-Saft Extrakten wurden bereits in Kapitel 3.1 qualitativ beschrieben und werden hier quantitativ bestätigt. Der wesentliche Unterschied ist dabei ein mehr als zehnfach höherer Chlorogensäure- und 4-Cumaroylchinasäure-Gehalt der A-Saft Extrakte,

während sich der B-Saft Extrakt durch eine Anreicherung von Phloridzin, Procyanidin B2 sowie aller bestimmten Quercetin-3-glykoside auszeichnete.

**Tabelle 16: Quantitative Bestimmung des Polyphenolgehaltes der verwendeten Extrakte und des naturtrüben Apfelsaftes mittels HPLC.**

<b>Verbindung</b>	<b>AS02</b> [mg/g Extrakt]	<b>AS03B</b> [mg/g Extrakt]	<b>AS04</b> [mg/g Extrakt]	<b>PAE<sup>a</sup></b> [mg/l Lösung]	<b>TAS</b> [mg/l]
<b>Phenolcarbonsäuren</b>					
Chlorogensäure	139.2	14.0	180.8	194.8	42.4
Kaffeesäure	6.9	2.6	2.3	4.9	1.3
4-Cumaroylchinasäure	35.3	2.4	46.9	49.3	4.2
3-Cumaroylchinasäure	5.3	<0.6 <sup>b</sup>	6.5	6.5	2.4
5-Cumaroylchinasäure	<0.6 <sup>b</sup>	<0.6 <sup>b</sup>	<0.6 <sup>b</sup>	<0.6 <sup>b</sup>	4.3
<i>p</i> -Cumarsäure	1.7	2.9	2.4	5.3	<0.6 <sup>b</sup>
<b>Dihydrochalkone</b>					
Phloridzin	20.2	43.5	38.8	82.3	3.8
Phloretin-2'-xyloglukosid	90.1	46.8	100.2	147.0	17.7
<b>Flavan-3-ole</b>					
(-)-Epicatechin	14.7	10.3	11.6	21.9	6.8
(+)-Catechin	2.8	2.0	1.3	3.3	<0.5 <sup>b</sup>
Procyanidin B1	<0.4 <sup>b</sup>	0.6	2.2	2.8	<0.4 <sup>b</sup>
Procyanidin B2	8.7	11.1	3.8	14.9	3.4
<b>Quercetin-glykoside</b>					
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	2.1	13.0	3.6	16.6	3.5
Quercetin-3-glukosid (Isoquercitrin)	<0.6 <sup>b</sup>	5.8	1.9	7.7	<0.6 <sup>b</sup>
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	<0.6 <sup>b</sup>	3.2	<0.6 <sup>b</sup>	3.2	<0.6 <sup>b</sup>
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	1.0	18.2	2.8	21.0	<0.6 <sup>b</sup>
Quercetin-3-xylosid (Renoutrin)	0	8.4	1.5	9.9	<0.6 <sup>b</sup>
Quercetin-3-arabinosid	<0.6 <sup>b</sup>	8.3	<6.0 <sup>b</sup>	8.3	<0.6 <sup>b</sup>
<b>Gesamt-Phenole (HPLC-Bestimmung)</b>	328.0	193.2	406.6	599.8	89.8

TAS = trüber Apfelsaft, PAE = polyphenolreicher Apfelextrakt, <sup>a</sup>1:1 Mischung der Extrakte AS03B und AS04, 0.2 % in Wasser gelöst; <sup>b</sup>Nachweisgrenze

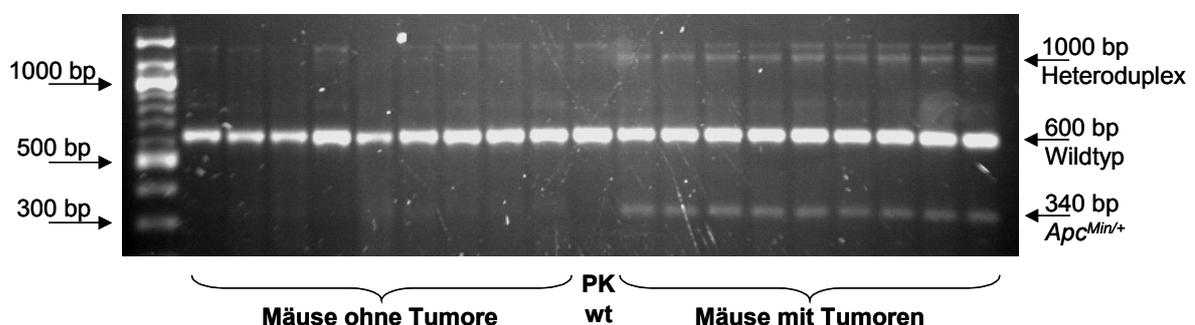
Der Einsatz von 0.2 % der 1:1 Mischung basiert zum einen auf der Orientierung an Studien aus der Literatur, in denen sich bei der Verwendung pflanzlicher Extrakte Konzentrationen

in diesem Bereich als geeignet erwiesen hatten. Zum anderen wurde mit 0.2 % dieser Mischung ein Polyphenolgehalt erreicht, der dem eines durchschnittlichen Apfelsaftes ähnelt. Eine 0.1 % Lösung eines A-Saft Extraktes liefert pro Liter fast die gleiche Menge an Polyphenolen wie ein handelsüblicher Saft. Diese Menge wurde um die im Tresterextraktionssaft vorkommenden Polyphenole ergänzt.

Der in unserer Studie verwendete Apfeltrübsaft zeichnet sich durch einen sehr niedrigen Gesamtpolyphenolgehalt aus. Ein bedeutender Teil der Quercetin-glykoside und Flavane lag unterhalb der Nachweisgrenze. Hinsichtlich des Polyphenolprofils wies der Saft eine höhere Übereinstimmung zu den A-Saft Extrakten als zum AS03B auf. Die Verwendung von trübem Apfelsaft ist darin begründet, dass diesem im Gegensatz zum Klarsaft bereits eine darmkrebspräventive Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die Bildung aberranter Krypten in einem Rattenmodell zur chemisch induzierten Kolonkarzinogenese wurden durch den trüben Saft signifikant vermindert (Barth et al., 2005).

#### *Auswertung der Ergebnisse des Tierversuchs*

Wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, wurde der Tierversuch in drei Teilversuchen mit jeweils  $n = 6$  Tieren pro Gruppe durchgeführt. Für die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden die Befunde aus den einzelnen Teilversuchen zusammengefasst. Im Falle der  $Apc^{Min/+}$  Mäuse musste der erste Teilversuch komplett außer Acht gelassen werden, da 50 % der Tiere keine Adenome entwickelten. Die Genotypisierung bestätigte, dass bei den entsprechenden Tieren die  $Apc$ -Mutation nicht vorlag (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Genotypisierung der Mäuse des ersten Teilversuchs.** Bande 1 = DNA-Leiter, Banden 2 bis 10 = PCR-Produkte aus Proben von Mäusen, die keine Tumore entwickelt haben, Bande 11 = Positivkontrolle für Wildtyp, Banden 12 bis 20 = PCR-Produkte aus Proben von Mäusen, die Tumore entwickelt haben.

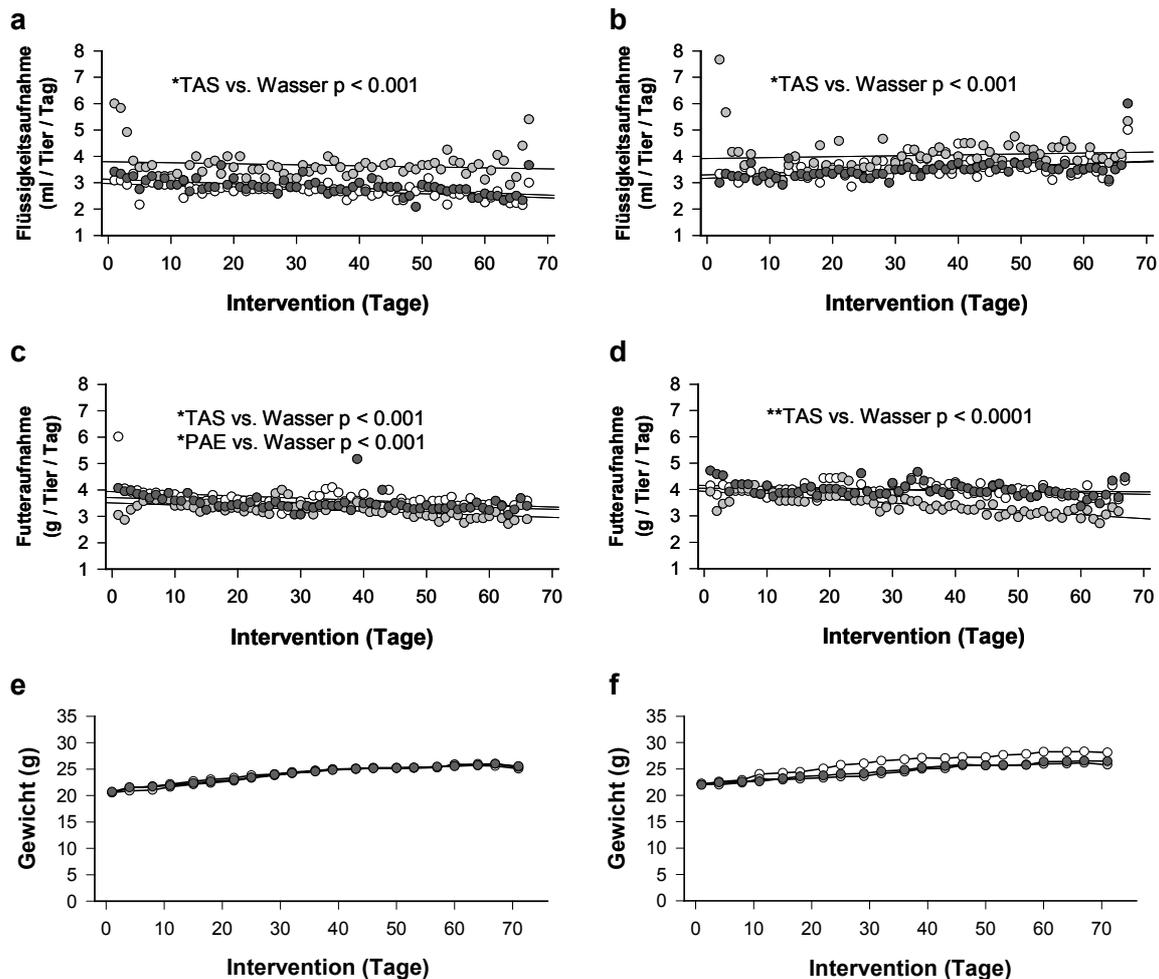
Demzufolge wurde zur Auswertung für alle Gruppen eine Gesamtgröße von  $n = 12$  Tieren angesetzt, die sich bei den Wildtypmäusen aus je sechs Tieren der Teilversuche I und II sowie bei den  $Apc^{Min/+}$  Mäusen aus je sechs Tieren der Teilversuche II und III zusammensetzte (siehe Kapitel 2.5.2, Abbildung 7).

### 3.4.1 Flüssigkeits- und Futteraufnahme sowie Entwicklung des Körpergewichtes im Verlauf der Intervention

Im Verlauf der Intervention wurde die tägliche Aufnahme der Flüssigkeiten dokumentiert, um Aufschluss über die verabreichte Dosis polyphenolischer Inhaltsstoffe zu erlangen. Ferner wurde zur Charakterisierung des Allgemeinzustands die tägliche Futteraufnahme festgehalten und die Entwicklung des Körpergewichtes zwei mal pro Woche protokolliert. Abbildung 23 stellt diese Daten für beide Stämme dar.

Hinsichtlich der Flüssigkeitsaufnahme konnte festgestellt werden, dass sowohl bei den  $Apc^{Min/+}$  Mäusen als auch bei den Wildtypmäusen die Aufnahme an Apfeltrübsaft im Vergleich zu Wasser oder Polyphenolextrakt deutlich erhöht war. In beiden Fällen wurde ein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Wasserkontrollen aufgezeigt (Abbildung 23a+b). Im Gegensatz dazu war die Futteraufnahme in den Saftgruppen beider Stämme erniedrigt (Abbildung 23c+d). Signifikante Unterschiede waren auch hier für beide Stämme in den Apfeltrübsaftgruppen sowie für die Extraktgruppe der  $Apc^{Min/+}$  Mäuse festzustellen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Kompensation der höheren Energiezufuhr durch den Zuckergehalt des Saftes zurückzuführen.

Die Entwicklung des Körpergewichtes von  $Apc^{Min/+}$  Mäusen wurde durch die Interventionen nicht beeinflusst (Abbildung 23e), während die Wildtyp-Behandlungsgruppen im Verlauf der Intervention im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Gewichtszunahme aufwiesen (Abbildung 23f). Die Differenz des mittleren Körpergewichtes zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe liegt im normalen Schwankungsbereich dieses Stammes ([www.criver.com](http://www.criver.com)).



**Abbildung 23:** Aufnahme von Flüssigkeit (a, b) und Futter (c, d) sowie Gewichtsentwicklung (e, f) während der Intervention in *Apc*<sup>Min/+</sup> (a, c e) und Wildtypmäusen (b, d, f). ○ = Wasser, ● = TAS, ● = PAE; \* Test auf Unterschiede der Y-Achsenabschnitte; \*\* Test auf Unterschiede der Steigung.

### 3.4.2 Energiebilanz und tägliche Polyphenoldosis

Die Berechnung der Energiebilanz und der Polyphenoldosis basierte auf Durchschnittswerten der täglichen Zufuhr von Flüssigkeiten und Futter, wobei für den gesamten Verlauf der Intervention ein Mittelwert für jede Behandlungsgruppe gebildet wurde. Der Energiebilanz lagen die von den Herstellern angegebenen Energiegehalte für Apfelsaft und Futter zugrunde. Die Angaben zur verabreichten Polyphenoldosis wurden auf das durchschnittliche Körpergewicht normalisiert, das ebenfalls für jede Gruppe gemittelt wurde.

In der Energiebilanz wird deutlich, dass es in den Saftgruppen beider Stämme zu einer erhöhten Energieaufnahme über die Flüssigkeitszufuhr kam, die jedoch durch die geringere

Aufnahme von Futter kompensiert wurde (Tabelle 17). Die Beeinflussung der Tumorentwicklung durch eine Kalorienrestriktion, wie sie z. B. von Mai et al. beschrieben wurde, kann somit ausgeschlossen werden (Mai et al., 2003).

**Tabelle 17: Bilanz der durch Futter und Apfeltrübsaft aufgenommenen Energie.**

	Wasser	TAS	PAE
<b><i>Apc</i><sup>Min/+</sup></b>			
Flüssigkeitsaufnahme <sup>a</sup> Energie in kJ (ml/Tier/Tag)	0 (2.7)	4.6 (3.8)	0 (2.8)
Futteraufnahme <sup>b</sup> Energie in kJ (g/Tier/Tag)	41.0 (3.7)	36.5 (3.3)	38.7 (3.5)
Energieaufnahme total in kJ	<b>41.0</b>	<b>41.1</b>	<b>38.7</b>
<b>WT</b>			
Flüssigkeitsaufnahme <sup>a</sup> Energie in kJ (ml/Tier/Tag)	0 (3.6)	5.1 (4.2)	0 (3.5)
Futteraufnahme <sup>b</sup> Energie in kJ (g/Tier/Tag)	44.3 (4.0)	37.6 (3.4)	44.3 (4.0)
Energieaufnahme total in kJ	<b>44.3</b>	<b>42.7</b>	<b>44.3</b>

<sup>a</sup>Energiegehalte der Flüssigkeiten: Wasser: 0 kJ/l, TAS (Trüber Apfelsaft): 1219.37 kJ/l, PAE (polyphenolreicher Apfelextrakt): 0 kJ/l; <sup>b</sup>Energiegehalt des Futters: 11072.86 kJ/kg.

Während die Energiebilanz bei den *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäusen vollständig ausgeglichen wurde, war die Energieaufnahme der Wildtyp-Saftgruppe im Vergleich zur Kontrolle sogar niedriger. Genau entgegengesetzte Ergebnisse lieferte die Auswertung für den Extrakt. In diesem Fall war die Bilanz bei den Wildtyptieren im Vergleich zur Kontrolle genau ausgeglichen, während die mit Extrakt behandelten *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäuse insgesamt weniger Energie aufnahmen.

Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Trinkmengen und des Polyphenolgehaltes der beiden Formulierungen ergab sich für die *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäuse für den Saft bzw. den Extrakt eine Dosis von 14.2 bzw. 70.8 mg Polyphenolen pro kg Körpergewicht, die täglich verabreicht wurde (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Berechnung der täglichen Dosis an Polyphenolen, die den *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäusen über die unterschiedlichen Formulierungen verabreicht wurde.**

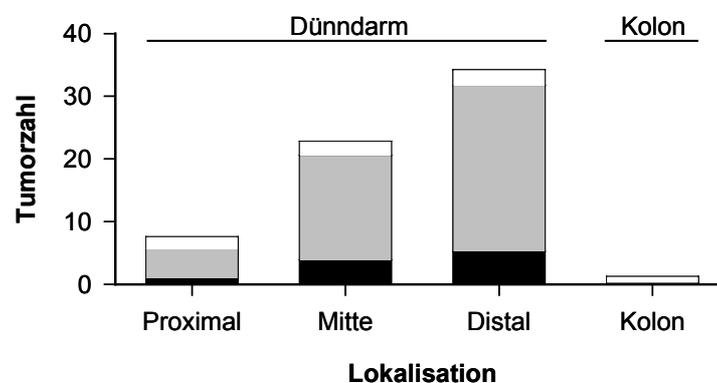
	Polyphenolgehalt [mg/l]	Flüssigkeitsauf- nahme pro Tag [ml]	Mittleres Körpergewicht [g]	Tägliche Dosis [mg/kg KG]
TAS	89.8	3.8	23.9	<b>14.2</b>
PAE	600.0	2.8	24.1	<b>70.8</b>

### 3.4.3 Einfluss der Interventionen auf die Tumorentstehung im Darm

Im gesamten Gastrointestinaltrakt von  $Apc^{Min/+}$  Mäusen kommt es innerhalb von 100 bis 150 Tagen spontan zur Entwicklung multipler Neoplasien, von denen sich der Großteil im Dünndarm befindet. Die Bestimmung der Anzahl an Tumoren erfolgte in der vorliegenden Studie für Dünndarm und Kolon getrennt sowie innerhalb des Dünndarms separat für das proximale, mittlere und distale Drittel. Aus der Summe ergab sich die Gesamtanzahl. Die Bestimmung des Tumordurchmessers sollte einen Hinweis auf die Größe der Adenome geben, um Effekte aufzuzeigen, die durch die Multiplizität alleine möglicherweise verdeckt würden. Eine Verschiebung der Tumorgrößen, beispielsweise die Abnahme kleiner zu Gunsten mittlerer oder großer Adenome, wäre durch die Multiplizität nicht erfassbar.

#### *Tumormultiplizität*

Die Angaben zur Tumormultiplizität erfolgten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittels. Die Kontrolltiere entwickelten im Mittel  $65.9 \pm 7.1$  Adenome. Mit einer Anzahl von  $64.7 \pm 7.2$  befanden sich 98 % der Tumore im Dünndarm. Von dessen proximalem zum distalen Ende zeichnete sich eine stetige Zunahme der Tumorzahl von  $7.6 \pm 1.3$  über  $22.8 \pm 2.6$  bis  $34.3 \pm 4.3$  in den einzeln betrachteten Abschnitten ab. Im Kolon wurden im Mittel  $1.3 \pm 0.3$  Adenome bestimmt. Die Mehrzahl der in der Kontrollgruppe erfassten Tumore waren von mittlerer Größe, während die kleinen und großen Adenome lediglich 15.5 bzw. 11.5 % der Gesamtanzahl ausmachten (Abbildung 24).

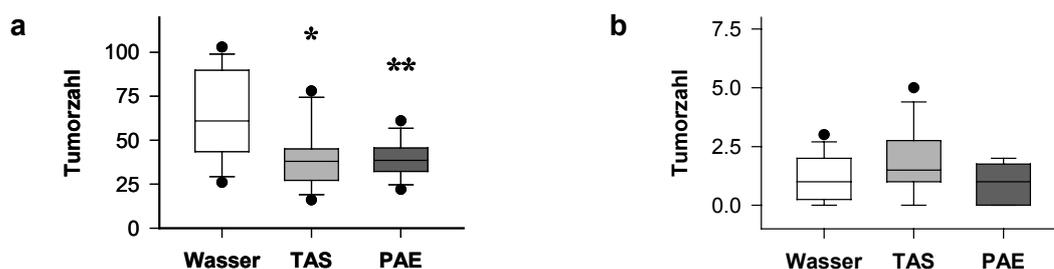


**Abbildung 24: Tumorverteilung innerhalb der Kontrollgruppe unter Berücksichtigung von Lokalisation und Größe.** □ = Durchmesser > 3 mm, ■ = Durchmesser 1-3 mm, ■ = Durchmesser < 1 mm. Auf die Darstellung der Standardfehler wurde zur besseren Übersicht verzichtet.

Die Abbildungen der Ergebnisse zur Beeinflussung der Tumorbildung durch die Behandlungen erfolgen in Form von Box Plots. Diese Art der Darstellung berücksichtigt den gesamten Variationsbereich der Tumormultiplizität, die gerade im hier verwendeten Tiermodell sehr groß sein kann. Besonders deutlich wird diese Variation im Box Plot der Kontrolle in Abbildung 25. Die Tumorzahl variiert innerhalb dieser Gruppe zwischen 28 und 104 Adenomen pro Tier, wobei sich 50 % aller Werte in dem von der Box eingegrenzten Bereich befinden.

Beide Interventionen hatten eine deutliche Reduktion der Tumorentstehung im gesamten Darm der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse zur Folge. Der Apfeltrübsaft führte insgesamt zu einer signifikanten Verminderung der Adenome um 36 % ( $p = 0.01$ ;  $n = 12$ ; One Way ANOVA), wobei die Multiplizität bei  $42.1 \pm 5.0$  lag. Mit einer Tumorzahl von  $39.8 \pm 2.8$  wurde durch den Extrakt eine signifikante Hemmung von 40 % ( $p = 0.01$ ;  $n = 12$ ; Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge) erzielt.

Bei getrennter Betrachtung der Ergebnisse in Dünndarm und Kolon wird ersichtlich, dass sich die signifikanten Effekte auf den Dünndarm beschränken (Abbildung 25). Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, kam es durch Apfelsaft und Extrakt zu einer Tumورهemmung von 38 bzw. 40 %. Die Tumorzahl sank dabei von  $64.7 \pm 7.2$  auf  $40.3 \pm 5.0$  bzw.  $38.9 \pm 2.9$ . Die Box Plots beider Behandlungsgruppen zeigen im Vergleich zur Kontrolle einen deutlich kleineren Variationsbereich auf.



**Abbildung 25: Einfluss der Interventionen auf die Tumorentstehung in Dünndarm (a) und Kolon (b) von *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen.** \* $p < 0.05$  ( $n = 12$ ; One Way ANOVA); \*\* $p < 0.01$  ( $n = 12$ , Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge).

**Tabelle 19: Einfluss der Interventionen auf die Tumorzahl in Dünndarm und Kolon.**

	Wasser	TAS	PAE
<b>Dünndarm</b>			
Tumorzahl	64.7 ± 7.2	40.3 ± 5.0	38.9 ± 2.9
% Hemmung		38 %	40 %
p-Wert		0.01 <sup>a</sup>	0.007 <sup>b</sup>
<b>Kolon</b>			
Tumorzahl	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2
% Hemmung		138 %	31 %
p-Wert		n.s.	n.s.

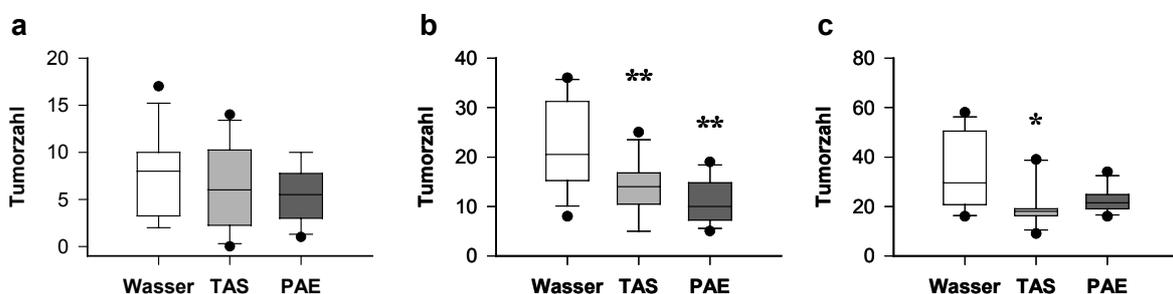
<sup>a</sup>One Way ANOVA; <sup>b</sup>Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge; n.s. = nicht signifikant

Die Tumorbilastung im Kolon wurde nicht signifikant verändert. Die Apfelsaftgruppe verzeichnete einen geringfügigen Anstieg der Tumorzahl, während die Anzahl der Kolonadenome in der Extraktgruppe leicht sank (Tabelle 19).

### Tumorlokalisation

Aufgrund der Tatsache, dass ausschließlich im Dünndarm signifikante Effekte gefunden wurden, beschränken sich die im Folgenden dargestellten Ergebnisse auf diesen Teil des Gastrointestinaltraktes.

Zur Berücksichtigung unterschiedlicher Lokalisationen wurde der Dünndarm in drei gleich große Teile geteilt. Im proximalen Segment wurde die Tumorzahl nicht signifikant vermindert (Abbildung 26a). Im mittleren und distalen Drittel hingegen konnte die Entwicklung von Adenomen durch beide Interventionen signifikant verringert werden (Abbildung 26b+c).



**Abbildung 26: Einfluss der Interventionen auf die Tumorlokalisation im Dünndarm.** (a) Proximaler Teil des Dünndarms, (b) mittlerer Teil des Dünndarms, (c) distaler Teil des Dünndarms; \*p < 0.05 (n = 12, Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge); \*\*p < 0.01 (n = 12, One Way ANOVA).

Der naturtrübe Apfelsaft führte im mittleren Dünndarmabschnitt zu einer hochsignifikanten Reduktion der Adenome um 39 % und im distalen Bereich zu einer signifikanten Verminderung um 41 %. Vom polyphenolreichen Apfelextrakt ging lediglich im mittleren Teil des Dünndarms mit einer Tumورهemmung von 52 % ein signifikanter Effekt aus, während die Adenome im distalen Teil zwar im Mittel auf  $22.5 \pm 1.5$  gesenkt, jedoch nicht signifikant beeinflusst wurden (Tabelle 20).

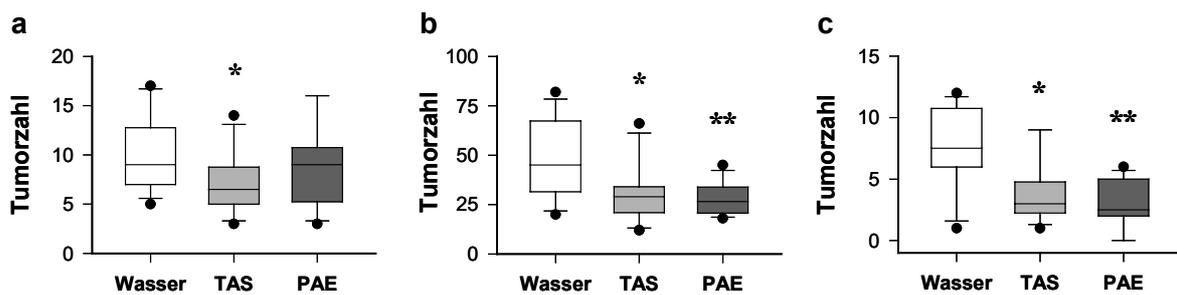
**Tabelle 20: Einfluss der Interventionen auf die Tumorlokalisation im Dünndarm.**

	Wasser	TAS	PAE
<b>Proximaler Dünndarm</b>			
Tumorzahl	$7.6 \pm 1.3$	$6.3 \pm 1.3$	$5.4 \pm 0.9$
% Hemmung		17 %	28 %
p-Wert		n.s.	n.s.
<b>Mittlerer Dünndarm</b>			
Tumorzahl	$22.8 \pm 2.6$	$13.9 \pm 1.6$	$11.0 \pm 1.3$
% Hemmung		39 %	52 %
p-Wert		0.009 <sup>a</sup>	0.001 <sup>a</sup>
<b>Distaler Dünndarm</b>			
Tumorzahl	$34.3 \pm 4.3$	$20.2 \pm 2.6$	$22.5 \pm 1.5$
% Hemmung		41 %	34 %
p-Wert		0.015 <sup>b</sup>	n.s.

<sup>a</sup>One Way ANOVA; <sup>b</sup>Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge; n.s. = nicht signifikant

### *Tumorgröße*

Die Einteilung der Adenome hinsichtlich ihrer Größe erfolgte anhand des Durchmessers in kleine (< 1 mm), mittlere (1-3 mm) und große (> 3 mm) Tumore. Die Behandlung mit trübem Apfelsaft führte in allen betrachteten Gruppen zu signifikanten Effekten, während der Extrakt lediglich die Anzahl mittlerer und großer Adenome verringerte. Kleine Adenome wurden durch den Saft von  $10.1 \pm 1.1$  auf  $6.9 \pm 0.9$  signifikant um 32 % vermindert. Die Beeinflussung mittlerer Adenome war mit einer Hemmung von 37 % etwas stärker ausgeprägt und im Falle der großen Tumore erfolgte die stärkste Beeinflussung mit einer Hemmung von 54 % (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Einfluss der Interventionen auf die Tumorentstehung im Dünndarm.** (a) Adenome mit einem Durchmesser von  $< 1$  mm, (b) Adenome mit einem Durchmesser von 1-3 mm, (c) Adenome mit einem Durchmesser von  $> 3$  mm; \* $p < 0.05$  ( $n = 12$ , One Way ANOVA); \*\* $p < 0.01$  ( $n = 12$ , Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge).

Der Extrakt zeigte keine signifikante Beeinflussung des Auftretens von kleinen Tumoren. Adenome mittlerer Größe wurden signifikant um 42 % vermindert. Die Anzahl großer Adenome wurde auch hier mit 61 % am stärksten reduziert (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Einfluss der Interventionen auf die Tumormgröße im Dünndarm.**

	Wasser	TAS	PAE
<b>Ø &lt; 1 mm</b>			
Tumorzahl	10.1 ± 1.1	6.9 ± 0.9	8.7 ± 1.2
% Hemmung		32 %	14 %
p-Wert		0.04 <sup>a</sup>	n.s.
<b>Ø = 1-3 mm</b>			
Tumorzahl	47.9 ± 5.6	30.3 ± 4.4	27.6 ± 2.4
% Hemmung		37 %	42 %
p-Wert		0.02 <sup>a</sup>	0.005 <sup>b</sup>
<b>Ø &gt; 3 mm</b>			
Tumorzahl	6.7 ± 1.1	3.1 ± 0.8	2.6 ± 0.6
% Hemmung		54 %	61 %
p-Wert		0.014 <sup>a</sup>	0.009 <sup>b</sup>

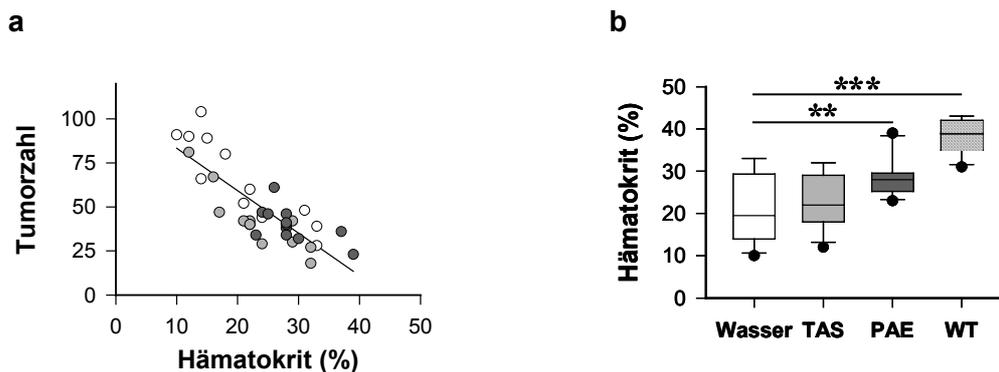
<sup>a</sup>One Way ANOVA; <sup>b</sup>Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge; n.s. = nicht signifikant

Die Auswertung der Daten erfolgte weiterhin unter Berücksichtigung der Tumormgröße bei gleichzeitiger Betrachtung der Lokalisation im Darm (Daten hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse standen weitgehend in Übereinstimmung mit den bereits gezeigten Resultaten bei separater Betrachtung der genannten Parameter. Signifikante Veränderungen traten vor allem im mittleren und distalen Dünndarm bei mittleren und großen Adenomen auf. Im Kolon war auch bei Betrachtung der verschiedenen Tumormgrößen kein signifikanter Effekt erkennbar.

### 3.4.4 Beeinflussung von Hämatokrit und Milzgewicht

*Apc*<sup>Min/+</sup> Mäuse entwickeln aufgrund intestinaler Blutungen zum Teil schwere Anämien, die sich in einer Verringerung des Hämatokritwertes äußern. Im Vergleich zu gesunden Tieren, bei denen der Hämatokrit bei ca. 40 % liegt, kann der Wert von Mäusen mit *Apc*-Mutation auf bis zu 10 % absinken (Moser et al., 1990). Weiterhin konnte eine Vergrößerung der Milz bei unverändertem Gewicht der übrigen Organe beobachtet werden. Beide Parameter scheinen in Abhängigkeit zur Tumorbelastung zu stehen und somit eine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung zuzulassen (Orner et al., 2003).

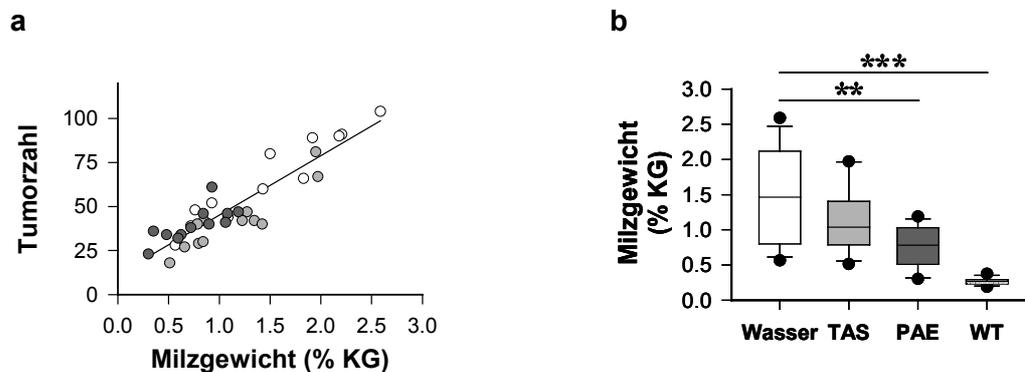
In der vorliegenden Studie konnte für die drei Interventionsgruppen insgesamt eine inverse Korrelation zwischen dem Hämatokritwert und der Tumorzahl ermittelt werden. Die Berechnung der linearen Regression ergab einen Regressionskoeffizienten von  $-0.82$  (Abbildung 28a).



**Abbildung 28: Korrelation der Hämatokritwerte mit der Tumorzahl (a) und Beeinflussung des Hämatokritwertes durch die Interventionen (b).** ○ = Wasser, ● = TAS, ● = PAE;  $r = -0.82$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (jeweils  $n = 12$ ; One Way ANOVA).

Der durchschnittliche Hämatokritwert gesunder Wildtypiere lag bei 39 %, während die Wassergruppe der *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäuse einen Mittelwert von 21 % der zellulären Bestandteile im Blut aufwies und damit signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Wildtypiere war. In der Apfelsaft-Interventionsgruppe war lediglich eine leicht steigende Tendenz der Hämatokritwerte auf im Mittel 23 % zu beobachten. Im Gegensatz dazu führte die Extrakt-Intervention zu einer signifikanten Erhöhung des Wertes auf 29 % (Abbildung 28b).

Die Korrelation zwischen Tumorzahl und Milzgewicht zeigte in den drei Interventionsgruppen mit einem Koeffizienten von 0.91 einen positiven Zusammenhang auf (Abbildung 29a). Das durchschnittliche Milzgewicht betrug bei den gesunden Wildtypmäusen 0.3 % des Körpergewichtes.



**Abbildung 29: Korrelation der Milzgewichte mit der Tumorzahl (a) und Beeinflussung des Milzgewichtes durch die Interventionen (b).** ○ = Wasser, ● = TAS, ● = PAE;  $r = 0.91$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (jeweils  $n = 12$ , Kruskal-Wallis One Way ANOVA für Ränge).

Im Falle der unbehandelten *Apc<sup>Min/+</sup>* Tiere kam es mit einem Mittelwert von 1.5 % zu einer fünffachen Vergrößerung des Organs. Die Intervention mit trübem Apfelsaft ließ das Milzgewicht im Vergleich zur Kontrolle weniger stark ansteigen. Allerdings erwies sich das mittlere Gewicht von 1.1 % als statistisch nicht signifikant unterschiedlich zu dem der Wasserkontrolle. Durch Extraktbehandlung hingegen reduzierte sich das Milzgewicht auf 0.8 %. Dies stellte eine signifikante Verminderung im Vergleich zur Kontrolle dar (Abbildung 29b).

### 3.4.5 Histopathologische Befunde

Zur histopathologischen Untersuchung wurden Präparate von Leber, Niere und Milz sowie von den vier Darmabschnitten in Form der „swiss roll“ aufgearbeitet. Die Auswertung von je sechs Tieren durch den Pathologen, Herrn Prof. Dr. E. Karbe, Wülfrath, sollte Hinweise auf eine mögliche, von den Interventionen ausgehende Toxizität in den Organen beider Stämme geben. Ferner galt es, die Tumore im Darm der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse zu befunden.

*Befunde der Organe*

Keine der Interventionen führte in den Organen der Wildtypiere zu histopathologischen Auffälligkeiten, sodass eine durch trüben Apfelsaft oder polyphenolreichen Apfelextrakt induzierte Toxizität ausgeschlossen werden kann.

In der Leber der unbehandelten *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse wurde eine starke Verminderung des Glykogenspeichers nachgewiesen, die auf eine reduzierte Futterraufnahme oder Futterverwertung, auf ein schlechtes Allgemeinbefinden, oder auf die Tumorentwicklung im Darm zurückzuführen sein könnte. Sechs von sechs Tieren dieser Gruppe wiesen die Veränderung auf. Bei den behandelten Tieren erschien die Glykogenspeicherung nicht oder nur gering reduziert. In der Saftgruppe war lediglich eines der sechs Tiere betroffen, während das Merkmal in der Extraktgruppe gar nicht auftrat. Als Ursache hierfür kommt nach Angabe des Pathologen die Behandlung in Frage, entweder direkt oder indirekt durch die geringeren Tumorzahlen im Dünndarm der behandelten Tiere.

In den Kupfferzellen der Leber kam es zur Entwicklung von Hyperplasien, deren Anzahl in den drei Gruppen zwar ähnlich waren, die in ihrer Ausprägung in den beiden Behandlungsgruppen jedoch deutlich schwächer war.

Ferner wurden nekrobiotische Herde beobachtet, deren Inzidenz zwar durch die Intervention zunahm, die im Schweregrad jedoch minimal blieben. Laut Bericht des Pathologen sind diese Veränderungen bei Kontrolltieren relativ häufig und haben eher bakterielle als chemische Ursachen. Ein vermehrtes Eindringen von Darmbakterien über das Pfortaderblut bei Schädigung der Darmschleimhaut kann hier ursächlich vermutet werden (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Histopathologische Befunde von Leber und Milz der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse.** Aus jeder Gruppe wurden Präparate von sechs Tieren untersucht.

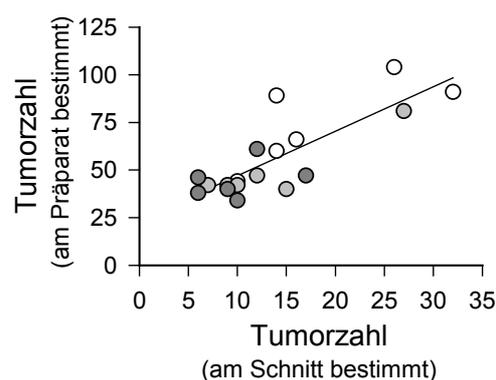
	Leber				Milz
	Reduzierter Glykogengehalt	Kupfferzell-hyperplasie	Nekrobiotische Herde	Extramedulläre Hämatoipoese	Extramedulläre Hämatoipoese
Wasser	6/6	6/6	2/6	4/6	↑↑↑↑
TAS	1/6	5/6	3/6	1/6	↑↑↑
PAE	0/6	6/6	5/6	2/6	↑↑↑

↑↑↑ = mittelgradig; ↑↑↑↑ = hochgradig; ↑↑↑↑↑ = massiv

In Leber und Milz kam es weiterhin zu einer extramedullären Hämatoipoese, die wahrscheinlich auf die Kompensation des durch die intestinalen Blutungen bedingten Blutverlustes zurückzuführen ist. In der Leber entwickelten vier von sechs Kontrolltieren diese Veränderung, jedoch nur ein Tier der Saftgruppe und lediglich zwei Tiere der Extraktgruppe. Eine extramedulläre Hämatoipoese der Milz war in allen Tieren nachweisbar. Dennoch konnte beobachtet werden, dass der Schweregrad durch die Behandlungen gemindert wurde. Während die Ausprägung bei den Kontrolltieren massiv war, konnte bei den Safttieren eine hochgradige und bei den Extrakttieren lediglich eine mittelgradige Belastung festgestellt werden (Tabelle 22).

### *Befunde des Darms*

Bei den Veränderungen im Darm der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse handelte es sich insbesondere um Polypen sowie um kleine Veränderungen ohne Polypenstruktur. Letztere enthielten epitheliale Strukturen, wie sie für adenomatöse Polypen typisch sind. Anhand der Schnitte wurde vom Pathologen eine zusätzliche Bestimmung der tumorartigen Veränderungen nach Lokalisation und Größe vorgenommen. Obwohl die erfassten Tumorzahlen aufgrund der Begrenzung auf einen einzelnen Schnitt weitaus niedriger waren, korrelierten die Werte im Verhältnis gut mit den auf dem gesamten Darm erfassten Adenomen (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Korrelation der für sechs Tiere bestimmten Tumorzahlen am Präparat sowie am histologischen Schnitt.** ○ = Wasser, ● = TAS, ● = PAE;  $r = 0.81$ .

Die pathologischen Befunde bestätigten eine Zunahme der Veränderungen im Dünndarm von proximal nach distal sowie das vereinzelte Vorkommen im Kolon. Durch beide Interventionen konnte eine Verminderung der Tumorzahl festgestellt werden, die durch

den Extrakt stärker ausgeprägt war als durch den Saft. Obwohl es sich bei den meisten Tumoren um mittelgroße Adenome handelte, wies der pathologische Befund auch auf einen beträchtlichen Anteil kleiner Adenome hin.

Im Darm der Wildtypiere wurden keine Polypen oder polypenartige Veränderungen festgestellt.

### **3.5 Einfluss der Interventionen auf die Expression kolonkrebssrelevanter Proteine im Darm**

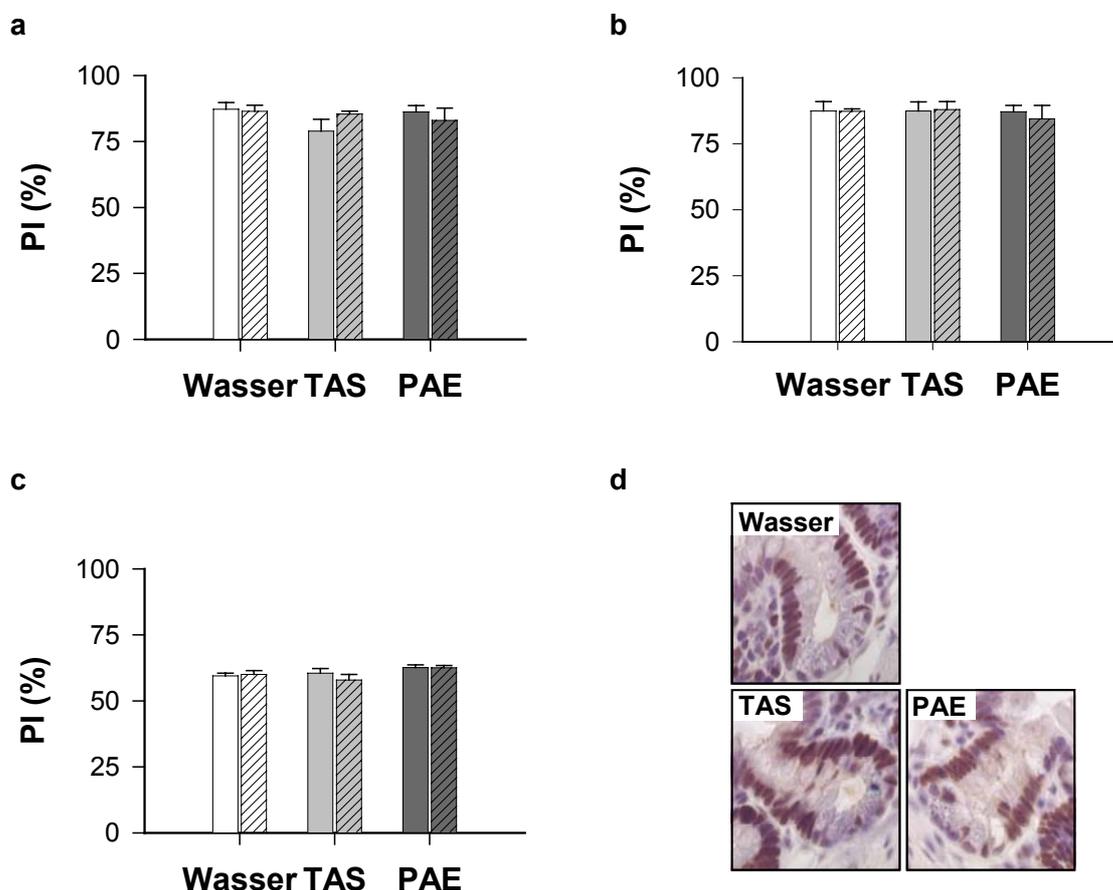
Unsere Untersuchungen zeigen, dass der eingesetzte trübe Apfelsaft im Hinblick auf die Tumorentstehung in *Apc*<sup>Min/+</sup> Mäusen ein ähnliches chemopräventives Potenzial aufweist wie der in einer Konzentration von 0.2 % eingesetzte Polyphenolextrakt. Bei der Interpretation der Ergebnisse kann aufgrund des stark unterschiedlichen Polyphenolgehalts zunächst nicht davon ausgegangen werden, dass bei beiden Interventionen der gleiche Wirkmechanismus zugrunde liegt. Die im eingesetzten Trübsaft enthaltene Menge an Polyphenolen ist äußerst gering, und demnach kaum mit der Polyphenolmenge des Extraktes vergleichbar ist. Hinzu kam, dass die Interventionen verschiedene Auswirkungen auf Lokalisation und Größe der Tumore hatten. Infolgedessen sollte die Expression verschiedener Proteine mit Relevanz für Proliferation sowie am Wnt-Signalweg beteiligter Faktoren Aufschluss über möglicherweise durch die Behandlungen beeinflusste Mechanismen geben.

#### **3.5.1 Beeinflussung der PCNA Expression als Marker für die Proliferation**

Der Einfluss auf die Zellproliferation im Darmepithel wurde anhand der Expression des Proteins PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) untersucht, das vor allem während der S-Phase des Zellzyklus verstärkt im Zellkern exprimiert wird. Das Protein wurde immunhistochemisch detektiert, die Anzahl gefärbter Zellkerne bestimmt und zur Anzahl der gesamten Zellkerne ins Verhältnis gesetzt. Die Angaben erfolgten als Proliferativer Index (PI) in %. Die Bestimmung des PI wurde in der Epithelschicht der „normalen Mukosa“ für Krypten und Zotten des mittleren und distalen Dünndarms sowie für die Krypten des Kolons beider Stämme vorgenommen. Der proximale Teil des Dünndarms

wurde von den Untersuchungen ausgeschlossen, da hier keine signifikante Beeinflussung der Tumorentwicklung zu beobachten war. Auf eine genaue Bestimmung gefärbter Zellkerne im veränderten Gewebe wurde ebenfalls verzichtet, da innerhalb der Adenome eine intensive Färbung nahezu aller Zellkerne zu sehen war.

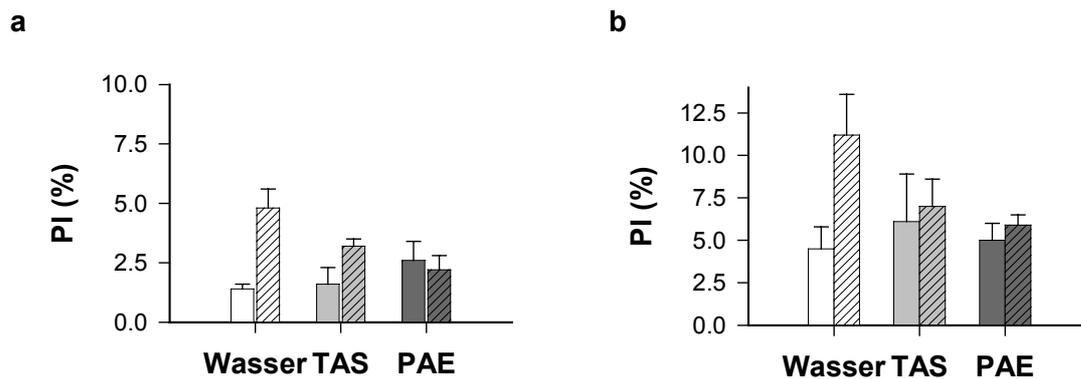
Abbildung 31 stellt die Proliferativen Indizes in den Krypten der verschiedenen Darmabschnitte aus den drei Behandlungsgruppen beider Stämme dar. Sie lagen im Bereich des mittleren und distalen Dünndarm zwischen 80 und 90 % und im Kolon bei ca. 60 %. Aus den Grafiken wird ersichtlich, dass keine der Interventionen einen Einfluss auf die Expression von PCNA im normalen Epithel des mittleren Dünndarms (a), distalen Dünndarms (b) und Kolons (c) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle hatte.



**Abbildung 31: Beeinflussung der PCNA Expression in den Krypten der normalen Mukosa des Gastrointestinaltraktes durch die Interventionen.** Mittlerer Dünndarm (a), distaler Dünndarm (b) und Kolon (c) in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen (nicht schraffiert) und Wildtypieren (schraffiert). 4  $\mu$ m dicke Schnitte wurden immunhistochemisch mit Hilfe eines PCNA Antikörpers markiert und mit Hämalaun gegengefärbt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen wurden aus der Auswertung von je drei Schnitten (Tieren) berechnet. Repräsentative Bilder je eines Schnittes der drei Interventionen vom distalen Dünndarm von *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen bei 400 x Vergrößerung (d).

Ferner war zu beobachten, dass auch zwischen den Kontrolltieren der beiden Stämme kein Unterschied aufgezeigt werden konnte. Beispielhaft ist jeweils ein mikroskopisches Bild einer Krypte mit PCNA markierten Zellkernen aufgezeigt (Abbildung 31d).

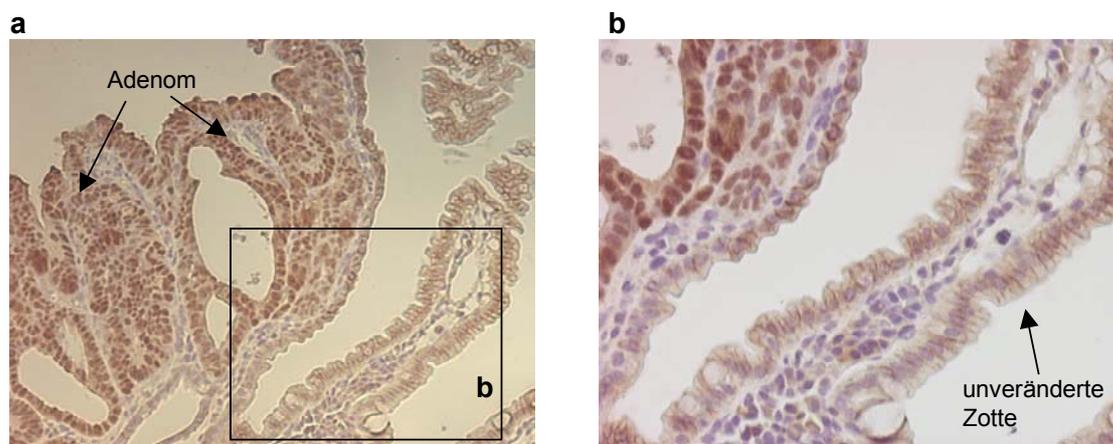
Markierung und Auswertung der PCNA Expression wurden in gleicher Weise für die Zotten des mittleren und distalen Dünndarms durchgeführt. Im Gegensatz zu den Krypten war die Proliferation in den Zellen der Zotten wesentlich schwächer ausgeprägt. Die Proliferativen Indizes lagen zwischen 1 und 10 %. Der Vergleich der Wasserkontrollen der beiden Stämme zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede sowohl im mittleren als auch im distalen Dünndarm. Insgesamt war auffällig, dass die Proliferationsrate im distalen Segment ca. zweifach höher war als im mittleren Teil. Im Vergleich war die Proliferation der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse mit einem PI von  $1.4 \pm 0.2$  % im mittleren Dünndarm und  $4.5 \pm 1.3$  % im distalen Dünndarm gegenüber dem PI der Wildtypiere von  $4.8 \pm 0.8$  % bzw.  $11.2 \pm 2.4$  % um mehr als die Hälfte reduziert. Die Gegenüberstellung der Behandlungen zu den jeweiligen Wasserkontrollen zeigte, dass es bei den Wildtypieren zu einer Abnahme des PI kam. Im mittleren Dünndarm sank der PI durch den Saft auf  $3.2 \pm 0.3$  %, durch den Extrakt auf  $2.2 \pm 0.6$  %. Im distalen Teil sank der Wert von  $11.2 \pm 2.4$  % in der Kontrolle auf  $7.0 \pm 1.6$  % (Saft) bzw.  $5.9 \pm 0.6$  % (Extrakt). Ein signifikanter Effekt wurde in keinem Fall erreicht. Auch bei den *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen wurde keine signifikante Beeinflussung durch Trübsaft oder polyphenolreichen Extrakt erzielt. Auffällig war jedoch, dass die Interventionen tendenziell eher einen Anstieg des PI verursachten, der im mittleren Dünndarm stärker durch den Extrakt und im distalen Dünndarm stärker durch den Saft erzielt wurde. Im mittleren Teil des Dünndarms stieg der PI von  $1.4 \pm 0.2$  % in der Kontrolle auf  $1.6 \pm 0.7$  % (Saft) bzw.  $2.6 \pm 0.8$  % (Extrakt) an. Der PI in der Kontrolle des distalen Dünndarms betrug  $4.5 \pm 1.3$  % und wurde auf  $6.1 \pm 2.8$  % durch den Saft und auf  $5.1 \pm 1.0$  % durch den Extrakt erhöht. (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Beeinflussung der PCNA Expression in den Zotten der normalen Mukosa des Gastrointestinaltraktes durch die Interventionen.** Mittlerer Dünndarm (a) und distaler Dünndarm (b) in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen (nicht schraffiert) und Wildtyp-Tieren (schraffiert). 4 µm dicke Schnitte wurden immunhistochemisch mit Hilfe eines PCNA Antikörpers markiert und mit Hämalaun gegengefärbt. Mittelwerte ± Standardabweichungen wurden aus der Auswertung von drei Schnitten (Tieren) berechnet.

### 3.5.2 Beeinflussung der β-Catenin Expression

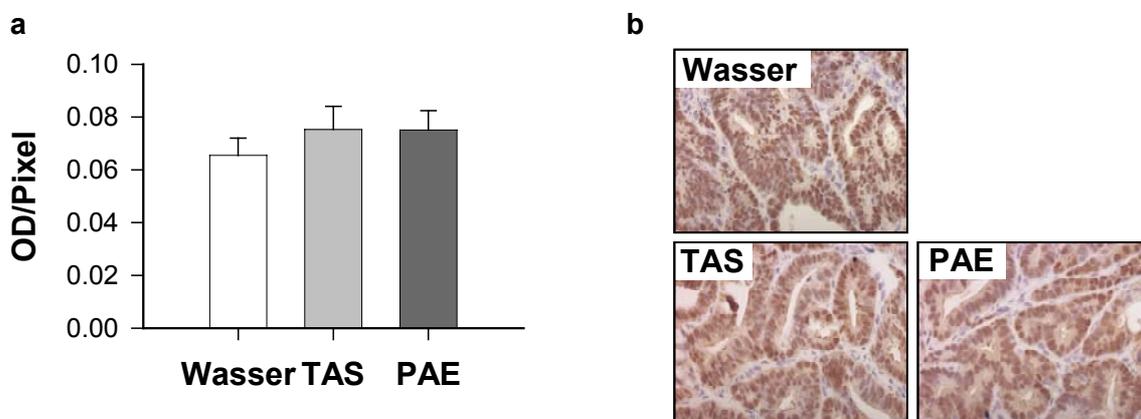
Aufgrund seiner zentralen Stellung im Wnt-Signalweg wurde die Expression von β-Catenin und ihre Beeinflussung durch die Intervention untersucht. Die Mutation des *Apc*-Gens resultiert in erster Linie in einem gestörten Abbau von β-Catenin, wodurch es zu dessen Akkumulation in Cytoplasma und Zellkern kommt. Dies ist im Besonderen im präneoplastischen Gewebe der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus zu beobachten, während β-Catenin im unveränderten Gewebe vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert ist (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Expression von β-Catenin im distalen Dünndarm von *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen.** Teil eines Adenoms mit umliegendem, unverändertem Gewebe, 200 x (a), vergrößerter Ausschnitt, 400 x (b).

Um Aufschluss über die Beeinflussung der Expression des Proteins zu erlangen, wurde nach immunhistochemischer Markierung die Farbintensität innerhalb des Tumors mit Hilfe der Software Lucia® Version 4.21 bestimmt. Die Intensität in Form der optischen Dichte (OD) wurde zur gemessenen Fläche (in Pixel) ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte lediglich für den distalen Dünndarm.

Die Farbintensität betrug in den Adenomen der Kontrollgruppe  $0.065 \pm 0.0065$  OD/Pixel gegenüber  $0.075 \pm 0.0088$  OD/Pixel in den Adenomen der Saftgruppe und  $0.075 \pm 0.0073$  OD/Pixel in der Extraktgruppe (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Beeinflussung der  $\beta$ -Catenin Expression im distalen Dünndarm von  $Apc^{Min/+}$  Mäusen durch die Interventionen.** Bestimmung der Farbintensität anhand der optischen Dichte (OD) bezogen auf die ausgemessene Fläche in Pixel (a).  $4 \mu\text{m}$  dicke Schnitte wurden immunhistochemisch mit Hilfe eines  $\beta$ -Catenin Antikörpers markiert und mit Hämalaun gefärbt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen wurden aus der Auswertung von drei Schnitten (Tieren) berechnet. Repräsentative mikroskopische Bilder je eines Schnittes der drei Interventionsgruppen vom distalen Dünndarm bei 400 x Vergrößerung (b).

Die Auswertung der immunhistochemisch detektierten  $\beta$ -Catenin Expression zeigte keine signifikante Beeinflussung der Farbintensität durch die Interventionen im Tumorgewebe des distalen Dünndarms. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf die Betrachtung weiterer Bereiche des Darms verzichtet.

## 4 DISKUSSION

Darmkrebs zählt in Westeuropa zu den häufigsten Tumorarten. Trotz der Fortschritte in der Chirurgie und Krebstherapie ist die 5-Jahresüberlebensrate mit 54 % gering (Parkin et al., 2005). In den letzten Jahren ist die Entwicklung neuer Strategien und Agenzien zur Vorbeugung des kolorektalen Karzinoms verstärkt in den Blickpunkt der Krebsforschung gerückt. Im Rahmen der Primär- und Sekundärprävention basiert die Strategie der Chemoprävention darauf, die Aufnahme protektiver Verbindungen zu erhöhen, um körpereigene Abwehrmechanismen zu unterstützen (De Flora et al., 2001). Bei der Suche nach chemopräventiven Verbindungen gilt es neben geringen Kosten, hoher Wirksamkeit sowie bekanntem Wirkmechanismus auch die allgemeine Akzeptanz in der Bevölkerung zu berücksichtigen (Mukhtar & Ahmad, 1999). Apfelsaft zählt sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern zu den beliebtesten Fruchtsäften (Dennison, 1996; Sennewald, 2005). Obst, Obstprodukte und -säfte leisten in Deutschland einen wesentlichen Beitrag zur Aufnahme von Flavonoiden (Linseisen et al., 1997), denen hinsichtlich der Prävention intestinaler Neoplasien eine vielversprechende Rolle zugesprochen wird (Hoensch & Kirch, 2005). Die Identifikation protektiver Verbindungen sowie die Aufklärung ihrer molekularen Mechanismen *in vitro* und *in vivo* sind eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung der genannten Präventionsstrategien.

### 4.1 Polyphenolische Inhaltsstoffe des Apfelsaftes

Die Betrachtung der aktuellen Literatur zeigt, dass eine direkte Gegenüberstellung verschiedener Untersuchungen zur Analytik von Apfelsaft und daraus gewonnenen Inhaltsstoffen durch diverse Variablen erschwert wird. Das Naturprodukt Apfel unterliegt einer Vielzahl von Einflüssen, die sich maßgeblich auf dessen Zusammensetzung auswirken. Gerade im Hinblick auf die Qualität und Quantität polyphenolischer Sekundärmetabolite sind Faktoren wie Fruchtsorte und Erntejahr (Escarpa & Gonzalez, 1998; Sanoner et al., 1999; Guyot et al., 2003; Alonso-Salces et al., 2004a), aber auch Ertrag des einzelnen Baums, Reifegrad der Frucht, Schädlingsbefall und Lagerungsbedingungen (Lattanzio et al., 2001; Treutter, 2001; Stopar et al., 2002)

maßgeblich von Bedeutung. Gleiches gilt für den Saft, dessen Zusammensetzung zusätzlich durch Bedingungen während der Prozessierung und Lagerung beeinflusst wird (Spanos et al., 1990; van der Sluis et al., 2005).

Bei den zuvor zitierten Publikationen kam es durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Aufarbeitung der Früchte sowie zur Analyse der Inhaltsstoffe zu Diskrepanzen im Inhaltsstoffmuster und -gehalt. Dennoch wird deutlich, dass ein gewisses qualitatives Spektrum an Polyphenolen in Äpfeln und Apfelsäften stets wiederzufinden ist. Es setzt sich vor allem aus den Phenolcarbonsäuren Chlorogensäure (1a) und 4-Cumaroylchinasäure (1c), den Dihydrochalkonen Phloridzin (2e) und Phloretin-2'-xyloglukosid (2b), diversen Catechinen und Procyanidinen (3a-h) sowie Quercetin-glykosiden (4a-g) zusammen.

Auch die im vorliegenden Projekt verwendeten Untersuchungsmaterialien werden diesem Polyphenolspektrum gerecht, obwohl beispielsweise aus den Extrakten zunächst nur 20 - 30 % der Inhaltsstoffe identifiziert werden konnten (Tabelle 16, Kapitel 3.4). Im Rahmen der Fraktionierung des Extraktes konnten weitere Verbindungen nachgewiesen werden, die im Extrakt selber aufgrund der geringen Menge nicht nachweisbar waren. Dazu zählten neben den Aglyka Quercetin (4h) und Phloretin (2f) auch das Hydroxyphloretin-2'-xyloglukosid (2a), das Hydroxyphloretin-2'-glukosid (2g), die Ferulasäure (1e) sowie das Tri- (3e), Tetra- (3f), Penta- (3g) und Hexamer (3h) der Procyanidine. Bis auf das Hydroxyphloretin-2'-xyloglukosid (2a) sind bisher alle Verbindungen als Inhaltsstoffe des Apfels beschrieben (Alonso-Salces et al., 2004b; Shoji et al., 2006a). Noch ist unklar, ob es sich bei dieser neuen Verbindung um eine genuine Verbindung des Apfels oder um ein Oxidationsprodukt von Polyphenoloxidasen handelt (Zeßner, 2005). Bei einem Großteil der noch unbekanntem Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich um hochkomplexe Procyanidine, die bis zu 60 % des Gesamtphenolgehalts von Apfelsaft ausmachen können und deren Nachweis spezieller Analysemethoden bedarf (Guyot et al., 1998; Alonso-Salces et al., 2004a). Im vorliegenden Projekt konnte die Existenz dieser Substanzen bis zum Undekamer bestätigt werden, der Nachweis definierter Verbindungen steht jedoch noch aus und wird Schwerpunkt der analytischen Fragestellung des Folgeprojektes sein.

## 4.2 Chemopräventive Aktivitäten polyphenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe *in vitro* und Relevanz für die Darmkrebsprävention *in vivo*

Untersuchungen zum chemopräventiven Potenzial von Apfelinhaltsstoffen beschränkten sich bislang meist auf einzelne Mechanismen, deren Beeinflussung durch Apfelextrakte oder isolierte Reinsubstanzen betrachtet wurde. Nur selten waren komplexere Fragestellungen Inhalt der Untersuchungen, bei denen eine Vielzahl von Verbindungen hinsichtlich der Beeinflussung unterschiedlicher Mechanismen berücksichtigt wurden. Gerade im Rahmen einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung hat sich die Kombination unterschiedlicher Methoden als erfolgreiche Strategie zur Identifikation chemopräventiver Verbindungen erwiesen (Somoza et al., 2003). So wurden auch in der vorliegenden Arbeit Apfelsaftextrakte sowie eine Vielzahl daraus hervorgegangener Fraktionen und Reinsubstanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, verschiedene Phasen der Karzinogenese zu beeinflussen.

Laut Ferguson et al. tragen chemopräventive Aktivitäten, wie die Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus und das Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies oder freier Radikale, dazu bei, die Menge an endogenen und exogenen Mutagenen im Körper in Grenzen zu halten. Auf diese Weise können auch die durch sie verursachten DNA-Schäden, die gerade während der Initiation und Promotion von Bedeutung sind, reduziert werden (Ferguson et al., 2004). Ferner wird vermutet, dass es durch die Verminderung oxidativer Schäden des Erbmaterials zu einer Stabilisierung des Genoms kommen kann (Ferguson, 2001). Obwohl in der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus die Mutation in einem Allel des *Apc*-Gens bereits vorhanden ist, erfordert die Entwicklung der Adenome den Verlust des zweiten *Apc*-Allels (Levy et al., 1994; Luongo et al., 1994). Vor dem Hintergrund der durch Ferguson aufgezeigten Zusammenhänge könnten die Inhaltsstoffe des Apfelsaftes folglich zur Tumورهemmung beitragen, indem sie durch die Reduktion aktiver Mutagene und die Stabilisierung des Genoms den Verlust der Heterozygotie verzögern.

#### 4.2.1 Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus

Die Charakterisierung chemopräventiver Wirkstoffe orientiert sich an einer Vielzahl von Mechanismen, die in der Krebsentstehung von Bedeutung sind und deren Modulation die maligne Entartung verzögern oder verhindern kann. Der Fremdstoffmetabolismus stellt dabei einen sehr frühen Angriffspunkt dar, weil durch ihn bereits die Aktivierung von Karzinogenen vor der eigentlichen Initiation verhindert bzw. deren Entgiftung gefördert werden kann.

##### *Hemmung von Cyp 1A*

Beispielhaft wurde in der vorliegenden Arbeit die Hemmung des Phase I Enzyms Cytochrom P450 1A (Cyp 1A) untersucht, das hinsichtlich der Karzinogenaktivierung von Bedeutung sein kann. Eine gesteigerte Cyp 1A-Aktivität wurde bereits mit einem erhöhten Risiko für das kolorektale Karzinom in Verbindung gebracht (Sivaraman et al., 1994). Im Fremdstoffmetabolismus führt Cyp 1A zur Aktivierung von Prokarzinogenen, wodurch es diesen ermöglicht wird, mit DNA zu interagieren und Schädigungen des Erbmaterials herbeizuführen (DiGiovanni & Kleiner, 2004). Das Enzym ist weiterhin dazu in der Lage, den Prostaglandinstoffwechsel zu beeinflussen. Die Metabolisierung von Arachidonsäure durch Cyp 1A geht mit der Bildung von ROS einher (Caro & Cederbaum, 2006). Bei der Umwandlung von Prostaglandin-Endoperoxiden, die als Zwischenprodukte der Prostaglandinbiosynthese entstehen (Plastaras et al., 2000), kommt es zur Freisetzung von Malondialdehyd (MDA), das, wie ROS, durch DNA-Schädigung die Krebsentstehung fördern kann (Stone et al., 1990). Die exzessive Prostaglandinbildung ist aufgrund der verstärkten Expression der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) ein wesentliches Merkmal der Kolonkarzinogenese (Dubois et al., 1998; Wang & Dubois, 2006). In der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus wurde eine vermehrte Cox-2 Expression ebenfalls mit der Adenombildung in Verbindung gebracht (Chulada et al., 2000). Die Hemmung von Cyp 1A könnte somit die Entstehung aktiver Karzinogene vermindern und durch den Einfluss auf den Arachidonsäure-Prostaglandinstoffwechsel die Bildung von ROS und MDA im Organismus herabsetzen. Im Falle der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus ist dieser Mechanismus jedoch wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung, solange das Enzym nicht induziert wird (Sattar et al., 1999).

Den im Projekt verwendeten Extrakten konnte in der vorliegenden Arbeit das Potenzial zur Hemmung von Cyp 1A nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.1, Tabelle 8). Der aus Tresterextraktionssaft gewonnene Extrakt AS03B war dabei mit einem  $IC_{50}$  von 4.3  $\mu\text{g/ml}$  wesentlich aktiver als der aus Direktsaft gewonnene Extrakt AS02 ( $IC_{50} = 12.3 \mu\text{g/ml}$ ). Dies ließ darauf schließen, dass die relevanten Verbindungen zur Beeinflussung des Phase 1 Enzyms vor allem im Trester, d. h. in Schale oder Kernen zu finden sind. Der analytische Vergleich der Extrakte zeigte, dass es im AS03B zu einer Anreicherung der Quercetin-glykoside (4b,c,d,g) kam und sogar das Aglykon (4h) selber nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1, Abbildung 9). Die weiteren Untersuchungen der Fraktionen und Reinsubstanzen bestätigten, dass es sich bei dem vor allem in der Schale lokalisierten Flavonol Quercetin um einen bedeutenden Modulator des Enzyms handelte. In physiologisch relevanten Konzentrationen hemmte Quercetin die Cyp 1A-Aktivität mit einem  $IC_{50}$  von 0.026  $\mu\text{M}$ . Die Aktivität war sogar ausreichend, um die Cyp 1A Hemmung durch den Extrakt zu erklären. Im Rahmen der Fraktionierung wurden aus 20 g AS03B 40 mg Quercetin in Form des Niederschalgs der Fraktion B 7 isoliert (siehe Kapitel 2.1.2, Abbildung 6). Der Extrakt enthielt somit 2 mg/g Quercetin. Ausgehend vom  $IC_{50}$  des Extraktes von 4.3  $\mu\text{g/ml}$  betrug der Anteil an Quercetin entsprechend 8.6 ng/ml bzw. 0.0285  $\mu\text{M}$  (siehe Kapitel 3.2.7, Tabelle 14). Die Resultate sind in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Studien, in denen dem Aglykon bereits die Beeinflussung von Phase 1 Enzymen nachgewiesen werden konnte (Moskaug et al., 2004; Moon et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der *activity-guided fractionation* Glykoside des Flavonols identifiziert, deren Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus bisher noch nicht beschrieben war. Vor allem das Quercetin-3-xylosid (4d) erwies sich mit einer halbmaximalen Hemmaktivität von 1.2  $\mu\text{M}$  als guter Cyp 1A Hemmer. Ferner konnten dem Rhamnosid (4g) und dem Arabinofuranosid (4e) des Quercetins eine gewisse, jedoch weniger stark ausgeprägte Hemmaktivität mit einem  $IC_{50}$  von jeweils 3.6  $\mu\text{M}$  für Cyp 1A nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.7, Tabelle 14). Im Vergleich zum Aglykon wurde die Wirkung durch die Zuckerreste deutlich herabgesetzt. Ein ähnlicher Trend ließ sich bei den Dihydrochalkonen beobachten. Während das Aglykon Phloretin (2f) die Cyp 1A Aktivität mit einem  $IC_{50}$  von 1.0  $\mu\text{M}$  hemmte, konnte den getesteten Glykosiden (2b, 2e) bis zu einer Konzentration von 50.0  $\mu\text{M}$  kein Effekt nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Phänomen wurde bereits für das antioxidative Potenzial von Quercetin und

Phloretin beschrieben, dass durch die Glykosylierung deutlich herabgesetzt wurde (Rice-Evans et al., 1996; Rezk et al., 2002). Unseren Ergebnissen zufolge scheint im Falle der Quercetinderivate, die an Position 3 des C Rings substituiert sind, auch die Art des Zuckers für die Cyp 1A Hemmung von Bedeutung zu sein. Wie oben beschrieben, hemmte das Xylosid (4d) die Cyp 1A Aktivität in einer Konzentration von 1.2  $\mu\text{M}$  zu 50 %. Vom Rhamnosid (4g) und dem Arabinofuranosid (4e) wurde für die gleiche Wirkung bereits 3.6  $\mu\text{M}$  benötigt und die Substitution mit Rutinose (4a), Galaktose (4b), Glukose (4c) und Arabinopyranose (4f) führte zur Inaktivität.

Als weitere Substanzklasse, die bezüglich der Hemmung von Phase 1 Enzymen möglicherweise von Bedeutung ist, konnten Procyanidine identifiziert werden. Obwohl die Reinsubstanzen Procyanidin B1 (3a), B2 (3d) und C1 (3e) in Konzentrationen bis 5.0  $\mu\text{M}$  kein bedeutendes Hemmpotenzial zeigten, erwiesen sich die Fraktionen B 7.2, B 7.3 und B 7.4, in denen vornehmlich Procyanidin Di- und Trimere enthalten waren mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten unter 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  entsprechen z.B. 4.5  $\mu\text{M}$  des Trimers) als durchaus effektiv. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte zum einen darin liegen, dass es durch das Gemisch verschiedener Verbindungen zu einem Synergismus kommt. Zum anderen konnte bisher nicht geklärt werden, um welche Art der Procyanidine es sich in den Fraktionen handelt. Procyanidine können sich bei gleichem Polymerisationsgrad durch die Art der Bindung zwischen den beiden Flavanoleinheiten unterscheiden, wobei sich dieser strukturelle Unterschied z. B. auf das antioxidative Potenzial auswirken kann (da Silva Porto et al., 2003). Die Anzahl der Flavanoleinheiten scheint hier ebenfalls von Bedeutung zu sein, da mit zunehmendem Polymerisationsgrad auch die Hemmung der Cyp 1A Aktivität verstärkt wurde.

### *Induktion der QR*

Als Vertreter entgiftender Phase 2 Enzyme wurde die NAD(P)H:Chinonreduktase (QR) herangezogen, deren Induktion ebenfalls als chemopräventiver Wirkmechanismus beschrieben ist. So wurde das krebopräventive Potenzial komplexer Extrakte aus grünem und schwarzem Tee sowie aus verschiedenen Gemüsesorten beispielsweise an deren Fähigkeit gemessen, die Aktivität der QR zu induzieren (Steele et al., 2000; Hashimoto et al., 2002). Bei einem der effektivsten Induktoren der QR handelt es sich um Sulforaphan (Kensler & Talalay, 2004). Das Isothiocyanat induzierte die QR-Aktivität *in vitro* in der

humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 (Jakubikova et al., 2005) sowie *in vivo* in der Kolonmukosa von Ratten (Matusheski & Jeffery, 2001; Keck et al., 2003). Ferner reduzierte es signifikant die Bildung aberranter Krypten, die durch Azoxymethan im Darm von Ratten induziert wurden (Chung et al., 2000) und hemmte die Benzo(a)pyren-induzierte Tumorentstehung im Magen. Interessanterweise kam es bei Tieren, in denen Phase 2 Enzyme nur wenig oder gar nicht induzierbar waren, zu einem Verlust der krebsprotektiven Effekte (Fahey et al., 2002). An diesen Untersuchungen wird die Bedeutung der Induktion von Phase 2 Enzymen, wie der QR, als chemopräventiver Mechanismus in der Karzinogenese des Darms ersichtlich. In einer kürzlich erschienenen Studie hemmte Sulforaphan auch die Tumorentstehung in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen (Myzak et al., 2006).

Von der Gruppe um Pool-Zobel konnte gezeigt werden, dass auch Apfelsaftextrakte den Fremdstoffmetabolismus humaner Kolonkarzinomzellen beeinflussen können. In diesem Fall führte ein komplexer Polyphenolextrakt in nicht toxischen Konzentrationen auf Ebene der Genexpression zur Induktion einiger Phase 2 Enzyme (Veeriah et al., 2006). Denselben Extrakt konnte in der vorliegenden Arbeit das Potenzial zur Induktion der QR mit einem CD-Wert von 111.9 µg/ml nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu erwies sich jedoch der Extrakt aus Tresterextraktionssaft mit einem CD-Wert von 39.3 µg/ml wiederum als deutlich aktiver. Wie im Fall der Cyp 1A Hemmung scheinen auch hier die Inhaltsstoffe des Tresters von besonderer Bedeutung zu sein.

Unter den Reinsubstanzen führte vor allem Quercetin (4h) in einer Konzentration von 2.6 µM zur Verdopplung der QR-Aktivität. Von den Glykosiden erbrachten das Rhamnosid (4g) und das Xylosid (4d) mit CD-Werten von 5.1 und 11.9 µM ebenfalls interessante Aktivitäten. Während die QR-induzierende Wirkung von Quercetin bereits bekannt war, wurde die Aktivität der beiden Glykoside bisher noch nicht beschrieben (Moon et al., 2006). Die Substitution mit Zuckern hatte, wie bereits bei der Cyp 1A Hemmung beschrieben, ebenso einen starken Einfluss auf die QR-Induktion. Auch bei den Dihydrochalkonen war ein Einfluss der Zuckersubstitution erkennbar. Williamson et al. zeigten für Quercetin, dass die Induktion der QR wesentlich durch die Glykosylierung reduziert werden kann. Die Position des Zuckers spielte dabei eine wesentliche Rolle, da die Substitution mit Glukose an der 4'-Position des B Rings lediglich zu einer Verminderung der Aktivität führte, während Verbindungen, die in Position 3 des C Rings

glykosyliert waren, überhaupt keine Aktivität erzielten (Williamson et al., 1996). Auf Grundlage unserer Daten muß ergänzt werden, dass auch der Zuckerrest, der sich an Position 3 befindet, über das Potenzial zur QR-Induktion entscheidet. Xylosid (4d) und Rhamnosid (4g) führten in relativ geringen Konzentrationen zur Induktion des Enzyms. Rutinosid (4a), Galaktosid (4b), Glukosid (4c) und Arabinoside (4e,f) hingegen waren bis zu einer Konzentration von 50 µM inaktiv. Während vom Aglykon Phloretin (2f) mit einem CD-Wert von 25 µM eine gewisse Wirkung ausging, konnte den Glykosiden keinerlei Aktivität nachgewiesen werden.

#### **4.2.2 Antioxidanzien und Radikalfängereigenschaften**

Der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen wird im Körper durch Regelmechanismen in engen Grenzen gehalten. Leicht gerät das Gleichgewicht zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien jedoch außer Kontrolle. Im Darm kommt es sowohl durch die Nahrung als auch über endogene Mechanismen, wie z. B. die Lipidperoxidation oder Abwehrprozesse des gastrointestinalen Immunsystems zur Bildung von ROS (Halliwell et al., 2000). Durch hohe Konzentrationen der reaktiven Moleküle kann es zur Schädigung von Zellstrukturen und damit zur Krebsentstehung kommen. ROS-induzierte Strangbrüche der DNA z. B. führen zur Fehlregulation der Transkription, zu Replikationsfehlern und zu genomischer Instabilität, die mit der Entartung der Zelle assoziiert sind (Valko et al., 2006). Die Peroxidation von Lipiden durch ROS kann ähnliche Folgen haben. Endprodukte der Lipidperoxidation wie Malondialdehyd reagieren mit dem Erbmaterial zu DNA-Addukten, die aus den oben genannten Gründen mit dem Auftreten verschiedener Krebsarten in Verbindung gebracht werden (Bartsch & Nair, 2004). Auch Proteine können durch ROS oxidiert und so in ihrer Funktion gestört werden. Handelt es sich beispielsweise um Reparaturenzyme, wirkt sich dies wiederum negativ auf die fehlerfreie Replikation des Erbmaterials aus. Letztlich sind reaktive Sauerstoffspezies per se in der Lage, Signaltransduktionswege zu beeinflussen und so die Promotion initiiertter Zellen zu fördern (Valko et al., 2006).

Chemopräventive Verbindungen können durch ihr Potenzial, freie Radikale oder ROS unschädlich zu machen, die körpereigenen Mechanismen darin unterstützen, der Überproduktion dieser Moleküle entgegenzuwirken. Der Nachweis antioxidativer

Aktivitäten von Apfelinhaltsstoffen erfolgte in früheren Untersuchungen vor allem durch komplexe Extrakte, die teilweise aus verschiedenen Teilen der Frucht gewonnen wurden. So konnte Extrakten aus Apfelschalen unter Verwendung des TOSC (*total oxyradical scavenging*) Tests ein Peroxylradikalfängerpotenzial nachgewiesen werden, das in Fruchtfleischauszügen wesentlich geringer ausgeprägt war. Die Aktivität korrelierte dabei jeweils mit dem Polyphenolgehalt der Extrakte, der in allen untersuchten Apfelsorten jeweils in der Schale am höchsten war (Wolfe et al., 2003). In weiteren Studien wurde das Radikalfängerpotenzial für DPPH- und Peroxylradikale von Apfelextrakten und den darin identifizierten Inhaltsstoffen bestimmt. Anhand verschiedener Berechnungen wurde der Beitrag, den die einzelnen Verbindungen an der Aktivität des Gesamtextraktes hatten, erfasst (Chinnici et al., 2004; Vanzani et al., 2005). Chinnici et al. fanden dabei eine gute Übereinstimmung und konnten 90 % der Aktivität des Extraktes den einzelnen, getesteten Verbindungen zuordnen. Den größten Beitrag leisteten im Falle von Schalenextrakten Flavonole, Flavanole und Procyanidine, während in den Fruchtfleischextrakten Flavanole und Hydroxyzimtsäuren von größerer Bedeutung waren (Chinnici et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnten Vanzani et al. nur etwa 50 % der Extraktaktivität in der Summe der darin enthaltenen Reinsubstanzen wiederfinden. Auch hier waren Flavanole maßgeblich an der Aktivität der Extrakte beteiligt. Analytisch nicht erfasste Procyanidine wurden für die verbleibenden 50 % der Aktivität des Extraktes verantwortlich gemacht (Vanzani et al., 2005).

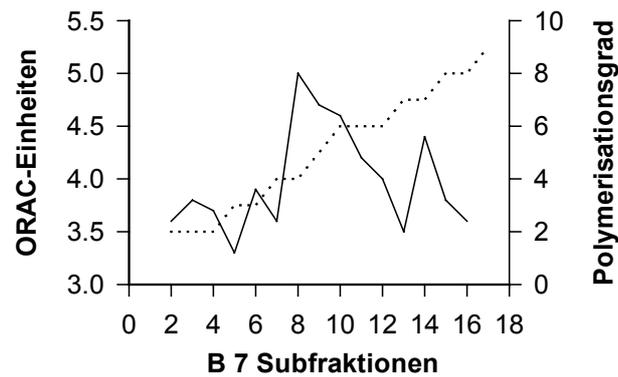
Die beschriebenen Aussagen sind in Kongruenz mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hinsichtlich des antioxidativen Potenzials im Allgemeinen konnte den Flavanolen, und hier vor allem den oligomeren Procyanidinen, eine wesentliche Rolle beigemessen werden. Das Radikalfängerpotenzial speziell für Peroxylradikale wurde zusätzlich durch Phenolcarbonsäuren und einige Quercetinderivate sowie im Besonderen durch Dihydrochalkone erwirkt (siehe Kapitel 3.2.7, Tabelle 14). Zu den aktivsten Reinsubstanzen zählten Phloridzin (3e) und Phloretin-2'-xyloglukosid (2b) (ORAC-Werte von 4.0 und 3.5), Catechin (3b) und Epicatechin (3c) (ORAC-Werte von 3.9 und 4.3) sowie Rutin (4a) und Quercetin-3-arabinopyranosid (4f) (ORAC-Werte von 3.9 und 4.2). Eine genaue Aussage über die Beteiligung einzelner Verbindungen an der Aktivität des Extraktes ist problematisch, da eine lineare Abhängigkeit der Dosis-Wirkungsbeziehungen für den gesamten relevanten Konzentrationsbereich z. B. im ORAC-Testsystem nicht

nachgewiesen ist. Dennoch stehen die Ergebnisse der Reinsubstanzen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten der Fraktionierung. Das Potenzial Peroxylradikale abzufangen ging vor allem von Fraktionen und Subfraktionen aus, deren Zusammensetzung durch die oben genannten, aktiven Inhaltsstoffe gekennzeichnet war.

Während sich bei der Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus die Glykosylierung von Quercetin und Phloretin tendenziell eher negativ auf die Aktivität auswirkte, wurde das Potenzial Peroxylradikale abzufangen durch Substitution mit Zuckern verstärkt. Dies wurde z. B. dadurch verdeutlicht, dass Phloretin mit einem ORAC-Wert von 2.1 zu den schlechtesten Peroxylradikalfängern zählte, wohingegen das Glukosid Phloridzin mit einem ORAC-Wert von 4.0 zu den besten Verbindungen gehörte.

Interessanterweise wurden von der Serie der procyanidinreichen Subfraktionen die höchsten Wirkungen erzielt. Sie machten nicht nur Peroxylradikale, sondern auch DPPH- und Superoxidanionradikale effektiv unschädlich. In diesem Fall war der Vergleich zu Referenzsubstanzen nur bis zum Pentamer möglich. Beträchtliche Aktivitäten zeigten sich jedoch auch in Subfraktionen mit höhermeren Procyanidinen. Die Vermutung von Vanzani et al., dass dieser Gruppe von Inhaltsstoffen eine entscheidende Bedeutung zukommt, wird durch unsere Ergebnisse untermauert (Vanzani et al., 2005).

Gerade im Zusammenhang mit den Procyanidinen und deren Fähigkeit Radikale unschädlich zu machen, konnte vermehrt gezeigt werden, dass diese Eigenschaft teilweise in Abhängigkeit zum Polymerisationsgrad steht. Oligomere Procyanidine erwiesen sich hinsichtlich der Hemmung der Lipidperoxidation im wässrigen Milieu als deutlich wirksamer als die getesteten Mono- und Dimere (Lotito et al., 2000). Counet und Collin zeigten in procyanidinreichen Fraktionen aus dunkler Schokolade bis zum Dekamer einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Effizienz Fettsäuren vor Oxidation zu schützen und dem Grad der Polymerisation (Counet & Collin, 2003). Ähnliches konnte auch anhand der hier diskutierten Daten beobachtet werden. Peroxylradikale beispielsweise wurden am effektivsten durch Fraktionen unschädlich gemacht, die vermehrt Tetra- bis Hexamere enthielten (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Zusammenhang zwischen dem Potenzial zum Abfangen von Peroxylradikalen und dem Polymerisationsgrad der procyanidinreichen Fraktionen des Extraktes AS03B.** ORAC-Einheiten der bei 0.4 µg/ml getesteten Fraktionen (—) sind dem in der jeweiligen Fraktion vorherrschenden Polymerisationsgrad (.....) gegenübergestellt.

Mit höherem Polymerisationsgrad konnte allerdings keine Zunahme des antioxidativen Potenzials verzeichnet werden. Bei Betrachtung dieses Zusammenhangs muss berücksichtigt werden, dass nicht bekannt ist, in welchen Mengen die einzelnen Procyanidine in den Fraktionen enthalten sind. Unsere sowie die meisten anderen bisher durchgeführten Untersuchungen entbehren bisher noch höhermeren Procyanidinen in reiner Form, sodass ein direkter Vergleich zwischen antioxidativer Aktivität und definierten Procyanidinverbindungen noch aussteht. Weiterhin könnte sich die zunehmende Komplexität ab einer bestimmten Molekülgröße negativ auf das antioxidative Potenzial auswirken. Ein Grund dafür könnte die sterische Hinderung sein, die den Zugang zu den Hydroxylgruppen einschränkt (Pinelo et al., 2004).

Dennoch gelten Procyanidine als vielversprechende Antioxidanzien, da sie im Vergleich zu bekannten antioxidativ wirksamen Verbindungen wie Glutathion, Vitamin C, Vitamin E und Trolox ein weitaus stärkeres Potenzial zum Abfangen von Radikalen aufweisen (Counet & Collin, 2003). Weiterhin ist von Catechinen und Procyanidinen bekannt, dass sie mit Zellmembranen assoziieren können und deren Lipide somit vor Oxidation schützen, wobei oligomere Verbindungen einen besseren Schutz vor oxidativem Stress bieten als die Monomere (Verstraeten et al., 2005). Die Reduktion oxidativer DNA-Schäden in Kolonkarzinomzellen durch die im Projekt verwendeten Extrakte sowie einige der darin enthaltenen Verbindungen wurde durch die Gruppe um Janzowski ebenfalls bestätigt (Schaefer et al., 2005), sodass dieser Effekt auch im Tier von Bedeutung sein könnte.

### 4.2.3 Hemmung der Tumorpromotion

Ein Eingriff in die Krebsentstehung auf Ebene der Tumorpromotion ist durch die Hemmung der Bildung von Tumorpromotoren möglich. Prostaglandine und Steroidhormone z. B. können durch die Beeinflussung der Signaltransduktion gewebespezifisch proliferative Effekte induzieren.

#### *Hemmung der Cyclooxygenase-1*

Die Cyclooxygenase-1 ist im Rahmen des Arachidonsäurestoffwechsels für die Bildung von Prostaglandinen verantwortlich. Höhere Konzentrationen dieser Entzündungsmediatoren werden mit einer Steigerung der Proliferation, einer Verminderung der Apoptoseinduktion sowie der Begünstigung der tumorassoziierten Angiogenese in Verbindung gebracht (Kelloff & Sigman, 2003). Gerade in der Chemoprävention des Dickdarmkarzinoms wird der Hemmung von Cyclooxygenasen eine bedeutende Rolle zugesprochen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die regelmäßige Einnahme nicht-steroidaler antiinflammatorischer Drogen (NSAID), die zu einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase-1 und -2 führen, mit einer Verringerung des Darmkrebsrisikos verbunden ist (Smalley & Dubois, 1997). Zudem wird Cox-2 in 90 % aller kolorektalen Adenokarzinome überexprimiert (Eberhart et al., 1994). Chulada et al. zeigten, dass sowohl Cox-1 als auch Cox-2 unabhängig voneinander bei der Adenomentwicklung in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen eine entscheidende Rolle spielen. Die Kreuzung der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus mit einer Cox-1-Knockoutmaus führte zu einer 77 %igen Reduktion der Tumorzahl (Chulada et al., 2000). Ferner wurden durch die Behandlung von *Apc1309*-Knockoutmäusen mit einem Cox-1-selektiven Inhibitor intestinale Adenome deutlich vermindert (Kitamura et al., 2002).

Die Hemmung des Enzyms wurde bereits in früheren Studien zur Charakterisierung des chemopräventiven Potenzials sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe herangezogen. Zu den für den Apfel typischen Verbindungen, die in der Lage sind, die Cox-Aktivität zu hemmen, zählen vor allem die Flavanole Catechin und Epicatechin sowie das Dihydrochalcon Phloretin (Landolfi et al., 1984; Seeram et al., 2003). Die drei Verbindungen zeigten auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die stärkste Hemmung der Cox-1. Vor allem Epicatechin schien dabei maßgeblich an der Cox-1-hemmenden Wirkung des

gesamten Extraktes bzw. der Fraktionen beteiligt zu sein. Der AS03B hemmte in einer Konzentration von 400 µg/ml die Cox-1-Aktivität zu 74 % (Kapitel 3.2.1, Tabelle 8). Er enthielt 10.3 mg Epicatechin pro Gramm Extrakt (Kapitel 3.4, Tabelle 16). In 400 µg/ml entspricht dies einer Menge von 3.9 µg/ml, das wiederum einer Konzentration von 13.4 µM äquivalent ist. Zur 50 %igen Hemmung der Cox-1 waren 7.5 µM erforderlich. Auf Grundlage der Daten zur Berechnung des IC<sub>50</sub> konnte ermittelt werden, dass der Einsatz von 13.4 µM Epicatechin zu einer Hemmung von ca. 64 % führte. Somit kann die Cox-1-Hemmung des Extraktes zum größten Teil auf die Existenz von Epicatechin zurückgeführt werden. Catechin erbrachte ähnlich gute Effekte. Die Tatsache, dass sich Catechin als Reinsubstanz im *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell bereits als äußerst effektiv erwiesen hat (Weyant et al., 2001), legt die Vermutung nahe, dass dieser Mechanismus auch im vorliegenden Fall für die *in vivo* Aktivität von Bedeutung sein könnte.

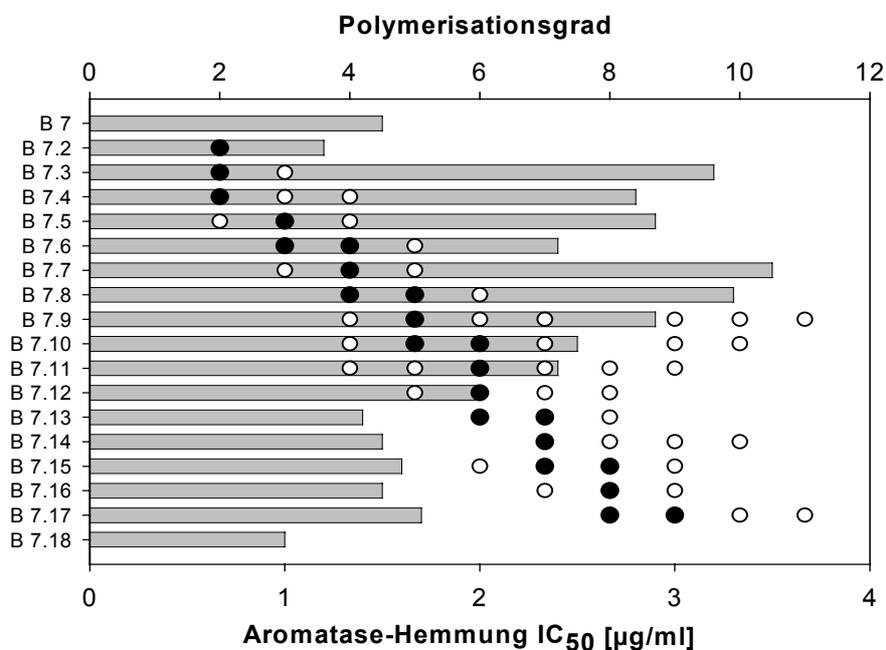
#### *Hemmung der Aromatase*

Die auch unter dem Namen Cytochrom P450 19 bekannte Aromatase katalysiert die Bildung des Steroidhormons Estradiol, das bei hormonabhängigen Krebsarten als Tumorpromotor agiert (Simpson et al., 1994). Das Hormon führte auch in humanen Kolonkarzinomzelllinien zu einer verstärkten Proliferation (Di Domenico et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Aromatase in humanen Kolonkarzinomzellen erhöht ist und durch Flavonoide gehemmt werden kann (Fiorelli et al., 1999). Der Mechanismus könnte somit hinsichtlich der tumorhemmenden Wirkung der Apfelpolyphenole relevant sein.

Eine Hemmung der Aromatase wurde für die Inhaltsstoffe des Apfels bisher nur für das Aglykon Quercetin beschrieben, während die Wirkung der Glykoside bisher noch nicht untersucht wurde (Seralini & Moslemi, 2001). Interessanterweise erwies sich das Glukosid Isoquercitrin (4c) als äußerst effektiver Aromatasehemmer, der mit einem IC<sub>50</sub> von 1.5 µM sogar die Aktivität des Aglykons übertraf.

Ein vielversprechendes Potenzial zur Hemmung des östrogenbildenden Enzyms ging auch von den Procyanidinen aus. Sowohl bei den Reinsubstanzen bis zum Pentamer als auch bei den Fraktionen zeichnete sich mit zunehmendem Grad der Polymerisation ein Anstieg der Aktivität ab. Das Maximum wurde mit der letzten Subfraktion B 7.18, einem Gemisch aus

hochkomplexen Procyanidinen, erreicht (Abbildung 36). Die Hemmung der Aromatase wurde von Eng et al. bereits für Procyanidin-Dimere aus Rotwein *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Eng et al., 2003).



**Abbildung 36: Zusammenhang zwischen der Aromatase-Hemmung und dem Polymerisationsgraden der procyanidinreichen Fraktionen des Extraktes AS03B.** IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Fraktionen (graue Balken) sind den in der jeweiligen Fraktion vorherrschenden Polymerisationsgraden (schwarze Punkte) und in geringeren Mengen enthaltenen Polymerisationsgraden (weiße Punkte) gegenübergestellt.

Hinsichtlich der Verwendung enzymbasierter Testsysteme muss berücksichtigt werden, dass Polyphenolen, und dabei gerade hochkomplexen Verbindungen, eine hohe Affinität zu Proteinen nachgewiesen werden konnte. Die Substanzen können dadurch zum Teil selektiv, zum Teil jedoch auch unspezifisch an Proteine binden (Hagerman & Butler, 1981; Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Charlton et al., 2002). Dennoch zeigten Untersuchungen zur kompetitiven Hemmung des *Angiotensine-Converting Enzyme* durch Procyanidine deutlich, dass eine spezifische Hemmung der Enzymaktivität durchaus möglich ist (Ottaviani et al., 2005; Actis-Goretta et al., 2006). Auch unveröffentlichte Daten der Gruppe um Marko (Universität Karlsruhe) deuteten darauf hin, dass die procyanidinreichen Fraktionen aus dem verwendeten Tresterextraktionssaft zu einer spezifischen Hemmung der Tyrosin-Kinase Aktivität des EGF-Rezeptors führten, die sowohl am isolierten Rezeptor, als auch in der Zellkultur nachgewiesen werden konnte.

#### 4.2.4 Proliferationshemmung und Induktion von Apoptose

##### *Hemmung der Proliferation*

Auf der Suche nach krebshemmenden Naturstoffen werden vielfach Proliferationstests eingesetzt, um den Einfluss dieser Verbindungen auf das Wachstum entarteter Zellen aus unterschiedlichen Geweben zu betrachten. So wurden Fruchtextakte auf ihre proliferationshemmende Wirkung mit Krebszelllinien aus Leber, Brust und Kolon untersucht. Äpfel zählten dabei in einigen Zelllinien zu den Früchten mit der stärksten proliferationshemmenden Wirkung (Sun et al., 2002; Olsson et al., 2004). Apfelextrakte führten zu einer dosisabhängigen Hemmung des Wachstums der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, wobei die Verarbeitung der Früchte inklusive der Schale im Vergleich zu Äpfeln ohne Schale in deutlich höherer Toxizität resultierte (Eberhardt et al., 2000). Die Beteiligung polyphenolischer Inhaltsstoffe am wachstumshemmenden Effekt wurde in einer weiteren Studie an Leberkrebszellen unter Beweis gestellt, in der Extrakte aus verschiedenen Apfelsorten, jeweils mit und ohne Schale, Gegenstand der Untersuchungen waren. Die antiproliferative Aktivität, die wiederum in Schalenextrakten am stärksten ausgeprägt war, stand dabei in einem positiven Zusammenhang zum Flavonoidgehalt der entsprechenden Extrakte (Wolfe et al., 2003).

Lapidot et al. führten die proliferationshemmende Wirkung der Apfelflavonoide darauf zurück, dass die Polyphenole in höherer Konzentration und unter bestimmten *in vitro* Bedingungen Wasserstoffperoxid bilden, das sich als toxische Verbindung auf das Wachstum der Zellen auswirkt (Lapidot et al., 2002). Diese Hypothese konnte jedoch mehrfach widerlegt werden. Liu und Sun zeigten, dass es unter Standardbedingungen in Zellkulturmedien durch Apfelextrakte nicht zur Bildung von Wasserstoffperoxid kam. Ferner konnte ausgeschlossen werden, dass Wasserstoffperoxid alleine bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  die Proliferation beeinflusste. Die Zugabe von Katalase zum Medium zur Inaktivierung von Wasserstoffperoxid führte zu keiner veränderten Wirkung des Extraktes auf das Zellwachstum. Des Weiteren wurde erneut eine positive Korrelation zwischen dem Polyphenolgehalt der Extrakte und deren antiproliferativer Aktivität aufgezeigt (Liu & Sun, 2003). In ähnlicher Weise bestätigten Veeriah et al., dass ein im Projekt verwendeter Apfelsaftextrakt die Proliferation der humanen

Kolonkarzinomzelllinie HT-29 hemmte und durch die Zugabe von Katalase (1 U/ml Medium für 24, 48 und 72 h) nicht weniger aktiv war (Veeriah et al., 2006).

Dieselbe Gruppe verglich die proliferationshemmende Wirkung des Extraktes mit einem synthetisch hergestellten Gemisch, das aus den im Extrakt identifizierten Verbindungen in äquivalenten Konzentrationen in Form von Reinsubstanzen bestand. Es zeigte sich, dass die bekannten Inhaltsstoffe alleine nicht für die gesamte antiproliferative Aktivität verantwortlich waren (Veeriah et al., 2006). Dieser Sachverhalt wurde durch Kern et al. bestätigt (Kern et al., 2005). Beide Gruppen zeigten weiterhin, dass die Einzelkomponenten mit Ausnahme der Aglyka Quercetin und Phloretin in physiologisch relevanten Konzentrationen keinen Effekt auf das Wachstum von HT-29 Zellen ausübten und schlussfolgerten, dass bisher noch nicht identifizierte Verbindungen für die wachstumshemmende Wirkung des Extraktes verantwortlich sein müssen. Für Quercetin wurde die Wachstumshemmung von Kolonkarzinomzellen zuvor bereits beschrieben (Wenzel et al., 2004).

Hinsichtlich der Beeinflussung des Kolonkarzinomzellwachstums durch Apfelsaftextrakte und deren Inhaltsstoffe stehen die Ergebnisse unserer Untersuchungen in Übereinstimmung mit den zuvor diskutierten Publikationen. Unter den getesteten Reinsubstanzen zeigten lediglich die Aglyka Phloretin und Quercetin antiproliferatives Potenzial in einem Konzentrationsbereich bis 100  $\mu$ M. Zusätzlich konnten jedoch im Rahmen der *activity-guided fractionation* Fraktionen isoliert werden, die im Vergleich zu den getesteten Reinsubstanzen ein deutlich stärkeres Potenzial zur Wachstumshemmung aufzeigten, und die die Aktivität des gesamten Extraktes möglicherweise vollständig erklären könnten. Es handelte sich dabei um die procyanidinreichen Fraktionen B 7.2 bis B 7.18 und deren Mutterfraktion B 7, die vier- bis neunmal toxischer waren als der Extrakt selber (Kapitel 3.3.1, Tabelle 15). Aus 20 g Extrakt wurden im Rahmen der Fraktionierung 2.09 g oligomere und polymere Procyanidine in Form der Mutterlauge der Fraktion B 7 isoliert (siehe Kapitel 2.1.2). Dies entspricht einer Konzentration von 10 % (0.1 g/g) Extrakt. Der Extrakt hemmte die Proliferation von HCT116 Zellen mit einem  $IC_{50}$  von 34.7  $\mu$ g/ml. Darin waren entsprechend 3.6  $\mu$ g/ml Procyanidine enthalten. Durch die Procyanidine alleine wurde die Proliferation in einer Konzentration von 6.7  $\mu$ g/ml zu 50 % gehemmt. Sie könnten somit zu einem gewissen Anteil an der proliferationshemmenden Wirkung des Extraktes beteiligt sein.

Die Hemmung der Proliferation durch Procyanidine stand dabei in Zusammenhang zum Grad der Polymerisation dieser Verbindungen. In verschiedenen humanen Brustkrebszellen konnte dieser Effekt bis zum Dekamer bereits an aus Kakao gewonnenen Reinsubstanzen nachgewiesen werden, wobei die höhermeren Procyanidine ab dem Pentamer bei einer Testkonzentration von 100 µg/ml die höchste Aktivität aufwiesen (Kozikowski et al., 2003). Jüngste Untersuchungen zeigten, dass die Hemmung der Proliferation durch Procyanidine durch gezielte Dephosphorylierung bzw. Herunterregulierung zellzyklusregulierender Proteine bedingt war und sich selektiv auf Krebszellen beschränkte, während normale Zellen durch die Behandlung nicht gehemmt wurden (Ramljak et al., 2005). Diese selektive Zytotoxizität nach Behandlung mit einem Proanthocyanidinextrakt aus Traubenkernsamen wurde auch an normalen und entarteten Mukosazellen des Darms beobachtet (Ye et al., 1999). Die Selektivität für Krebszellen ist eine entscheidende Voraussetzung für den Einsatz potenziell chemopräventiv wirkender Verbindungen in Tier und Mensch.

#### *Induktion von Apoptose*

Als ein möglicher Mechanismus der antiproliferativen Wirkung untersuchten wir die Induktion von Apoptose. Sowohl der Extrakt AS03B als auch die aus Procyanidinen verschiedener Polymerisationsgrade bestehende Fraktion B 7 führten nach Behandlung von HCT116 Zellen zur Spaltung des Apoptosemarkers PARP (Poly (ADP Ribose) Polymerase) (Kapitel 3.3.2, Abbildung 20). Die Aktivierung der Caspase-8 gab Aufschluss über die Beteiligung des rezeptorvermittelten Weges zur Induktion des Zelltodes. Als Ursache für die Proliferationshemmung in Krebszellen des Kolons wurde die Induktion von Apoptose durch Traubenkernprocyanidine bereits beschrieben (Kim et al., 2005).

Ein Signalweg, dem seit kurzer Zeit ebenfalls ein pro-apoptotischer Charakter zugestanden wird, ist der MAPK-Weg (Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen). Die Aktivierung von ERK 1 und 2 (extrazellulär regulierte Protein-Kinase) wurde bisher meist mit Überlebensstrategien der Zelle in Verbindung gebracht, die pro-apoptotischen Effekten entgegenwirken (Johnson & Lapadat, 2002). Nun wurde jedoch gezeigt, dass die Induktion von Apoptose in humanen Kolonkarzinomzellen durch die Aktivierung von MAPK vermittelt werden kann (Park et al., 2004). Auch Procyanidine waren in der Lage die Aktivität von MAPK zu induzieren (Gosse et al., 2005). Interessanterweise konnten Kern

et al. unter Beweis stellen, dass die Phosphorylierung der MAPK ERK 1 und 2 durch die Behandlung mit dem im Projekt verwendeten Apfelsaftextrakt in geringen Konzentrationen zwar gehemmt, in höheren Konzentrationen jedoch deutlich induziert wurde. Da trotz Aktivierung der ERKs keine verstärkte Proliferation beobachtet wurde, ist auch hier die Involvierung zelltodfördernder Signalwege naheliegend (Kern et al., 2005).

Die Untersuchung von Kozikowski et al. auf die Induktion von Apoptose durch Procyanidine in Brustkrebszellen wies darauf hin, dass der programmierte Zelltod zwar in einem Teil der Zellen ausgelöst wurde, die Beteiligung eines zusätzlichen Signalweges jedoch nicht ausgeschlossen werden kann (Kozikowski et al., 2003). Diese Hypothese deckt sich mit unseren Ergebnissen, da die PARP-Spaltung als Merkmal für die Apoptose nicht sehr stark ausgeprägt war. Ein beträchtlicher Anteil des Proteins lag noch in der ungespaltenen Form vor.

Ramljak et al. generierten Daten, die darauf hinwiesen, dass das Procyanidinpentamer aus Kakao in humanen Brustkrebszellen zur Beeinflussung einer Reihe regulatorischer Proteine führte, die u. a. an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind (Ramljak et al., 2005). Untersuchungen der Gruppe um Francis Raul wiesen in die gleiche Richtung. Eine procyanidinreiche Fraktion aus Mostäpfeln hemmte das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie SW620 mit einem  $IC_{50}$  von 45  $\mu\text{g/ml}$ . Die Procyanidine riefen einen für die Induktion von Apoptose charakteristischen Sub  $G_0/G_1$  Peak hervor und führten zur Aktivierung der Caspase-3, die als ausführendes Element der Caspase-Kaskade letztlich zur Spaltung von PARP führt. Bei dem überwiegenden Teil der Zellen kam es jedoch zum Wachstumsarrest in der  $G_2/M$  Phase des Zellzyklus (Gosse et al., 2005).

Auch im  $Apc^{Min/+}$  Maus Modell ist die Induktion von Apoptose ein vielfach diskutierter Mechanismus, der der tumorhemmenden Wirkung einiger Verbindungen zugrunde liegt. In einer Studie von Mahmoud et al. führte die Behandlung mit Kaffesäurephenethylester bzw. Curcumin zu einer signifikanten Hemmung der Tumorzahl, die mit einer zehnfachen Erhöhung der Apoptoserate einherging (Mahmoud et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte dem AS03B, der zur Hälfte auch im Tierexperiment eingesetzt wurde, das Potenzial zur Induktion von Apoptose *in vitro* nachgewiesen werden. Auch Gosse et al. diskutierten anhand von *in vitro* Daten die mögliche Beteiligung apoptotischer Mechanismen an der

darmkrebspräventiven Wirkung von Apfelprocyanidinen in der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese *in vivo* (Gosse et al., 2005).

#### 4.2.5 Bioverfügbarkeit – Studien am Tier

Die Übertragung der *in vitro* Aktivitäten auf die *in vivo* Situation im Tier ist spekulativ. Die Prävention ROS-induzierter Schädigungen der Magenmukosa durch polyphenolreiche Apfelextrakte konnte jedoch in Ratten bereits nachgewiesen werden (Graziani et al., 2005). Ebenso führte der Konsum von Apfelsaft bei Mäusen zur Vorbeugung oxidativer Schäden im Gehirn (Rogers et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass sowohl die lokale Wirkung der Verbindungen im Gastrointestinaltrakt, als auch ein systemischer Effekt nach Resorption aktiver Inhaltsstoffe von Bedeutung sein könnte. Flavonole und Dihydrochalkone können im Darm resorbiert werden, wobei die Aglyka durch passive Diffusion in die Enterozyten gelangen, während Glykoside über Transportersysteme aufgenommen werden (Scalbert & Williamson, 2000; Wolfram et al., 2002). Eine Spaltung des Zuckerrestes kann entweder durch die Laktase Phloridzin Hydrolase am Bürstensaum des Dünndarms (Day et al., 2000) oder in den Darmzellen durch Aktivität der zellulären  $\beta$ -Glukosidase erfolgen (Ioku et al., 1998). Im Plasma liegen Glykoside meist in konjugierter und zu geringen Anteilen in freier Form vor (Crespy et al., 2002; Sesink et al., 2003). Die Frage nach der Wirksamkeit der Konjugationsmetabolite ist in vielen Fällen allerdings noch nicht geklärt.

Monomere Catechine liegen im Plasma von Ratten ebenfalls ausschließlich in konjugierter Form vor (Tsang et al., 2005). Procyandine hingegen waren nach oraler Gabe von procyanidinreichen Apfelextrakten bis zum Pentamer im Rattenplasma ungebunden nachweisbar (Shoji et al., 2006b). Die Untersuchungen von Gonthier et al. ließen die Schlussfolgerung zu, dass ein wesentlicher Anteil der komplexen Verbindungen nach oraler Aufnahme jedoch auch im Darm verblieb, wobei sie durch die Darmflora nicht abgebaut wurden (Gonthier et al., 2003). Eine Spaltung der oligomeren Komplexe in ihre Monomere während der Passage von Magen und Dünndarm konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Tsang et al., 2005). Für die diskutierten Verbindungen ist somit sowohl ein lokaler als auch ein systemischer Effekt denkbar.

### 4.3 Krebsprävention durch Apfelsaft und Apfelpolyphenole *in vivo*

Die in Kapitel 4.2 diskutierten Daten belegen, dass Äpfel bzw. daraus gewonnene Produkte und Inhaltsstoffe den Prozess der Kolonkarzinogenese *in vitro* hemmen können. Auch für ihre krebspräventive Aktivität *in vivo* gibt es deutliche Hinweise. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Entstehung genetisch bedingter Darmtumore durch Apfelinhaltsstoffe im Tiermodell signifikant reduziert werden konnte. Im Gegensatz zu den meisten bisherigen Untersuchungen wurden hier nicht nur isolierte polyphenolische Inhaltsstoffe des Apfels, sondern im Vergleich das Lebensmittel Apfelsaft untersucht. Trüber Apfelsaft reduzierte die Tumorzahl im gesamten Darm der Mäuse um 36 %, während der in einer Konzentration von 0.2 % eingesetzte Polyphenolextrakt eine 40 %ige Reduktion erwirkte (Kapitel 3.4.3, Tabelle 19).

Interessanterweise erzielten beide Interventionen einen ähnlichen Effekt, obwohl die verabreichte Polyphenoldosis über den Saft fast fünfmal niedriger war als über den Extrakt (Kapitel 3.4.2, Tabelle 18). Zur Erklärung dieses Resultates können drei Hypothesen aufgestellt werden. Zum einen besteht die Vermutung, dass sich im Saft zusätzliche Inhaltsstoffe befinden, die mit der Isolierung der Polyphenole nicht in den Extrakt übergegangen sind. Dabei könnte es sich z. B. um Trubstoffe handeln, die im Trübsaft in beträchtlichen Mengen von 1 g/l enthalten sind. Trub besteht zum größten Teil aus Proteinen und Lipiden. Außerdem wurde ein Gehalt von 5 % Procyanidinen nachgewiesen (Dietrich et al., 1996). Möglicherweise führt die Bindung an Trubpartikel zu einer Stabilisierung der im Saft enthaltenen Flavonoide.

Die zweite Hypothese basiert auf einem Sättigungsphänomen. Ein solches Phänomen wurde kürzlich von Ju et al. beobachtet. Epigallocatechin-gallat (EGCG) wurde in der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus in Konzentrationen von 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 und 0.32 % getestet. Obwohl EGCG die Tumorbildung dosisabhängig reduzierte, erfolgte mit zunehmender Konzentration eine Art Sättigung der Tumorchemmung. Während zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration ein Faktor von 16 lag, bewegte sich die Aktivität lediglich in einem Bereich von 36 bis 48 % der Tumorchemmung (Ju et al., 2005).

Die dritte Hypothese ist die Beeinflussung unterschiedlicher Mechanismen durch die beiden Behandlungen. Immunhistochemische Untersuchungen sollten in diesem Zusammenhang Aufschluss darüber geben, inwieweit eine Hemmung der Proliferation für die Tumorreduktion verantwortlich ist. Der Proliferationsmarker PCNA, der dazu verwendet wurde, erwies sich bereits in einer Vielzahl von Untersuchungen an *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäusen als geeignet (Mahmoud et al., 2000; Roy et al., 2002; Williams et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte keine der Behandlungen eine Beeinflussung der Proliferation in den Bereichen des Dünndarms, in denen eine deutliche Hemmung der Tumorbildung erfolgte. Als wesentlicher Bestandteil des Wnt-Signalweges wurde außerdem  $\beta$ -Catenin immunhistochemisch untersucht. Die Interventionen übten auch in diesem Fall keinen Effekt auf die Expression des Proteins aus. Die mechanistische Aufklärung war somit im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und ist zentraler Bestandteil der Arbeiten des Anschlussprojektes.

#### **4.3.1 Vergleich zu weiteren Interventionen mit der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus**

Eine Vielzahl von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wurde bereits erfolgreich im *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modell auf ihr darmkrebspräventives Potenzial untersucht (<http://corpet.net/min>). Weitaus seltener kamen allerdings komplexe Lebensmittel zum Einsatz. So wurde beispielsweise der Einfluss von Tee auf die Tumorentstehung im Darm getestet (Suganuma et al., 2001; Orner et al., 2003). Orner et al. verabreichten den Tieren über einen Zeitraum von 12 Wochen weissen und grünen Tee in einer Konzentration von jeweils 1.5 % im Trinkwasser und berücksichtigten bei der Auswertung Lokalisation und Größe der Adenome. Weisser Tee reduzierte die Gesamttumorzahl um 58 % und grüner Tee erzielte eine Hemmung von 45 %, die mit der Wirkung des Apfeltrübsaftes in der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist (Orner et al., 2003). Die Tumorverteilung in den einzelnen Segmenten des Dünndarms zeigte bei den Kontrolltieren eine gute Übereinstimmung mit unseren Daten sowie den Ergebnissen weiterer Studien, in denen unter Verwendung dieses Tiermodells eine ähnliche Unterteilung des Darms zur Auswertung herangezogen wurde. Es konnte jeweils eine Zunahme der Tumorzahl entlang des Dünndarms beobachtet werden, während die Adenomentwicklung im Kolon auf einige wenige Adenome beschränkt war (Abbildung 24) (Sorensen et al., 1998; Ritland et al., 1999; Kim et al., 2003; Orner et al., 2003; Ju et al., 2005).

### *Beeinflussung von Größe und Lokalisation der Tumore*

In unseren Untersuchungen hatten beide Interventionen nur im mittleren und distalen Teil des Dünndarms mit Hemmungen zwischen 39 und 52 % signifikante Auswirkungen auf die Adenombildung. Vor allem mittlere und große Tumore wurden um bis zu 61 % reduziert (Kapitel 3.4.3, Tabelle 20 und Tabelle 21). Kleine Adenome wurden nur durch den Trübsaft um 32 % signifikant gehemmt. Die Behandlung mit Teeextrakten führte ebenfalls nur im mittleren und distalen Teil des Dünndarms zur signifikanten Hemmung der Tumorzahl. Orner begründete das Ausbleiben signifikanter Einflüsse im proximalen Bereich des Dünndarms damit, dass die Tumorzahl hier zu niedrig sei, um deutliche Effekte aufzeigen zu können (Orner et al., 2003). Dieses Argument ist auf unsere Daten nur bedingt übertragbar. Bezüglich der Tumorklassifikation weist der proximale Teil des Dünndarms tatsächlich die geringste Tumorzahl auf. Hinsichtlich der Tumorklassifikation ist diese Begründung allerdings fraglich, da große Tumore im Vergleich zu kleinen in unserer Studie in weitaus geringerer Anzahl auftraten, aber dennoch wesentlich stärker durch die Interventionen vermindert wurden. Auch in den Untersuchungen von Ju et al. führte EGCG nur zu einer Verminderung mittlerer und großer Adenome, beeinflusste kleine Adenome jedoch nicht signifikant, obwohl diese in größerer Anzahl vorhanden waren (Ju et al., 2005). Suganuma et al. beobachteten ebenfalls, dass Tumore mit einem Durchmesser von mehr als einem mm deutlich stärker durch grünen Tee reduziert wurden als kleinere Adenome. Die Ergebnisse wurden dahingehend diskutiert, dass die Behandlung sowohl die Bildung als auch das Wachstum der Tumore hemmte (Suganuma et al., 2001). Die Tatsache, dass in unserer Studie durch den Saft alle Tumorklassifikationen reduziert wurden, wobei die Ausprägung bei den mittleren und großen Adenomen am stärksten war, könnte ebenfalls zu der Vermutung führen, dass sowohl die Bildung als auch das Wachstum der Adenome gehemmt wird. Ohne die mechanistische Aufklärung der tumorhemmenden Wirkung kann allerdings keine genaue Aussage getroffen werden.

### *Relevanz einzelner Polyphenole*

Sowohl der trübe Apfelsaft als auch der polyphenolreiche Extrakt hemmten die Entstehung intestinaler Tumore im Tierversuch. Dies zeigt, dass Polyphenole offensichtlich für die tumorhemmende Wirkung von Bedeutung sind. Der Extrakt verminderte die Entstehung intestinaler Tumore um 40 %. Als bekannter Apfelinhaltsstoff wurde Catechin im

*Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell bereits getestet. Die Reinsubstanz hemmte das Tumorstwachstum in einer Konzentration von 0.1 % um über 70 % (Weyant et al., 2001). Catechin ist mit 3.3 mg auch in der 0.2 %igen Extraktlösung der vorliegenden Studie enthalten (Kapitel 3.4, Tabelle 16) und könnte somit teilweise zum beobachteten Effekt des Extraktes beigetragen haben. Im Saft war das Flavanol jedoch nicht nachweisbar.

Mit Ausnahme von Quercetin wurden die übrigen in Saft und Extrakt nachgewiesenen Substanzen bisher noch nicht im *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell untersucht. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass viele dieser Verbindungen *in vitro* ein breites Spektrum chemopräventiver Aktivitäten aufwiesen, die, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, für die darmkrebshemmende Wirkung von Bedeutung sein könnten. Dies wird auch in Tabelle 23 deutlich. Sie enthält eine Auswahl an Polyphenolen, die sowohl im *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell als auch hinsichtlich der Beeinflussung einiger der in der vorliegenden Arbeit betrachteten Biomarker *in vitro* untersucht wurden.

**Tabelle 23: Gegenüberstellung des chemopräventiven Potenzials ausgewählter Verbindungen *in vitro* und *in vivo*.**

Verbindung	Dosis <sup>a</sup>	Tumorhemmung in <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> Mäusen <sup>b</sup> (%) <sup>c</sup>	<i>in vitro</i> Aktivitäten (Hemmpotenzial)				
			ROS <sup>d</sup>	Cyp 1A <sup>d</sup>	Cox-1 <sup>d</sup>	Prolifera- tion	EGFR- kinase
Curcumin	0.1 %	64*	X	X	-	X <sup>e</sup>	-
Resveratrol	0.2 %	28*	X	X	X	X <sup>f</sup>	-
Quercetin	2.0 %	15	X	X	-	X <sup>g</sup>	X <sup>g</sup>
(+)-Catechin	0.1 %	73*	X	-	X	-	-
Epigallocatechin-gallat	0.3 %	45*	X	-	X	X <sup>g</sup>	X <sup>g</sup>

<sup>a</sup>% in Futter und Trinkwasser; <sup>b</sup><http://corpet.net/min>; <sup>c</sup>Behandlungseffekt berechnet als: 100 x (Tumorzahl der Behandlungsgruppe)/(Tumorzahl der Kontrollgruppe), Prozentwerte < 100 kennzeichnen eine protektive Wirkung; \* = signifikante Effekte; <sup>d</sup>(Gerhauser et al., 2003); <sup>e</sup>(Sharma et al., 2005); <sup>f</sup>(Liang et al., 2003); <sup>g</sup>(Kern et al., 2005).

Mit Ausnahme von Quercetin hemmten alle Verbindungen die Tumorentstehung im Tierexperiment und wiesen dabei jeweils mehrere chemopräventive Eigenschaften *in vitro* auf, die auch den Apfelpolyphenolen nachgewiesen werden konnten. Gerade der Kombination chemopräventiver Substanzen wird aufgrund von synergistischen oder additiven Effekten bzw. der sich ergänzenden oder überlappenden Mechanismen, die durch sie beeinflusst werden, eine hohe Wirksamkeit zugesprochen (De Flora et al., 2001; Liu, 2003).

Torrance et al. stellten dies unter Verwendung des *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modells sehr eindrucksvoll unter Beweis, indem sie den EGFR-Kinaseinhibitor EKB-569 mit dem Cox

Hemmer Sulindac kombinierten. EKB-569 hemmte die Adenombildung in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht um 87 %. Sulindac, das bei der gleichen Dosis zu einer Hemmung von 69 % führte, zeigte bei einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht keinen Einfluss auf die Tumorzahl. Die Kombination des EGFR-Kinaseinhibitors (20 mg/kg Körpergewicht) mit Sulindac (5 mg/kg Körpergewicht) führte zu einer Verminderung der Adenome um 96 %. Fast die Hälfte der Tiere dieser Behandlungsgruppe entwickelten überhaupt keine Tumore – ein Ergebnis, das bei der Verwendung des Modells äußerst selten ist (Torrance et al., 2000). Die Modulation von zwei unterschiedlichen Mechanismen, die für die Darmkrebsentstehung von Bedeutung sind, konnte somit einen enormen Beitrag zur Prävention intestinaler Neoplasien leisten.

Auch bei den im Projekt verwendeten Apfelsaftextrakten handelt es sich um äußerst potente EGFR-Kinaseinhibitoren. Durch den AS02, der dem AS04 in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich ist, wurde die Kinaseaktivität mit einem  $IC_{50}$  von  $10 \pm 5 \mu\text{g/ml}$  effektiv gehemmt (Kern et al., 2005). Zusammen mit der bereits beschriebenen Cox-1 Hemmung durch den AS03B bzw. das darin enthaltene Epicatechin (Kapitel 4.2.3) könnte die *in vivo* Wirkung ebenfalls, wie oben beschrieben, auf einen Kombinationseffekt zurückzuführen sein. Dieser sehr vielversprechende Ansatzpunkt wird in zukünftigen Untersuchungen zur mechanistischen Aufklärung der darmkrebspräventiven Eigenschaften von Apfelsaftinhaltsstoffen Berücksichtigung finden.

#### **4.3.2 Hemmung der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese durch Apfelsaft und polyphenolische Apfelinhaltsstoffe**

Neben dem *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus Modell zählt auch die durch Azoxymethan (AOM) oder 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) induzierte Karzinogenese im Kolon von Ratten zu den wichtigsten Tiermodellen, die zur Identifikation darmkrebspräventiver Verbindungen eingesetzt werden. Als Endpunkt wird in vielen Fällen die Entwicklung präneoplastischer Läsionen in Form von aberranten Krypt Foci (ACF) betrachtet (Corpet & Tache, 2002). In diesem Modell wurde der Einfluss von Apfelsaft auf die Kolonkarzinogenese bereits untersucht. Barth et al. verglichen die Wirkung von klarem und trübem Apfelsaft auf die Entstehung aberranter Krypten, die in einem Präinitiationsprotokoll durch DMH induziert wurden. Die durch den Trübsaft verabreichte Polyphenoldosis betrug 40.67 mg pro kg

Körpergewicht und Tag, während die Tiere über den Klarsaft 37.89 mg pro kg Körpergewicht und Tag an Polyphenolen zu sich nahmen. Der trübe Apfelsaft führte im distalen Kolon zu einer signifikanten Reduktion großer ACF (> 4 aberrante Krypten pro Focus) um 50 %. Ferner konnte der Trübsaft durch DMH induzierte DNA-Schäden auf ein Maß reduzieren, dass sich nicht mehr signifikant von dem der Trübsaftgruppe ohne DMH-Behandlung unterschied. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie, zeigten Barth et al. durch Inkorporation von 5-Bromo-2'-deoxyuridin eine signifikante Reduktion der durch DMH induzierten Proliferation in den Epithelzellen des Kolons, die durch Trübsaft wesentlich stärker ausgeprägt war als durch den Klarsaft (Barth et al., 2005).

Die Tatsache, dass die durch DMH induzierten Veränderungen im Vergleich zu Klarsaft stärker (Proliferation) bzw. ausschließlich (Genotoxizität und Bildung großer ACF) durch trüben Apfelsaft präventiv beeinflusst wurden, spricht für die Bedeutung von Trubstoffen an diesem Effekt. Die in Kapitel 4.3 aufgestellte Hypothese über die Beteiligung dieser Apfelsaftinhaltsstoffe an der darmkrebshemmenden Wirkung von Apfeltrübsaft im *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modell wird somit durch die Daten von Barth et al. untermauert (Barth et al., 2005).

Abgesehen von der Existenz der Trubstoffe unterschieden sich klarer und trüber Apfelsaft im Bezug auf ihr Polyphenolprofil durch den Gehalt an Procyanidin B1 und B2 (Barth et al., 2005). Interessanterweise wurde dieser Klasse von Verbindungen hinsichtlich der Darmkrebsentstehung ebenfalls ein chemopräventives Potenzial zugesprochen. Eine an oligomeren Procyanidinen reiche Apfelfraktion unterdrückte in einem Rattenmodell nach sechs Wochen Intervention postinitiativ die Entstehung präneoplastischer Läsionen, die durch Azoxymethan induziert wurden (Gosse et al., 2005). In einer Konzentration von 0.01 % hemmten oligomere Procyanidine die Bildung aberranter Krypten zu 50 %. Der Gehalt an oligomeren Procyanidinen, der im Rahmen unserer Tierstudie zum Einsatz kam, konnte nur auf Basis der Fraktionierung des AS03B Extraktes bestimmt werden. Der Mutterextrakt bestand in Form der Fraktion B 7 zu 10 % aus oligomeren und polymeren Procyanidinen (siehe Kapitel 2.1.2, Abbildung 6). Das 1:1 Gemisch von AS03B und AS04 wurde in einer Konzentration von 0.2 % eingesetzt, sodass vom AS03B 0.1 % enthalten waren. Entsprechend leistete er, analog zu der von Gosse et al. eingesetzten Fraktion, einen Beitrag von 0.01 % an Procyanidinen. Der Procyanidingehalt im AS04 wurde im Rahmen dieser Projektphase noch nicht bestimmt. Von höheren Procyanidinkonzentrationen im

verwendeten Gemisch kann demnach ausgegangen werden. Die genaue Analyse von Procyanidinen in Apfelsaft steht ebenso aus und ist Bestandteil der Arbeiten des Folgeprojektes.

### 4.3.3 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf weitere Tumorarten

Die krebspräventive Wirkung polyphenolischer Apfelinhaltsstoffe beschränkt sich nicht nur auf die Bildung von Tumoren und präneoplastischen Läsionen im Darm. Auch hinsichtlich der Karzinogenese von Haut und Brust zeigten die im folgenden beschriebenen *in vivo* Studien deutliche Effekte.

Unter Verwendung eines Modells zur zwei Phasen Hautkarzinogenese erhielten Mäuse Extrakte aus Apfelschalen im Trinkwasser gelöst *ad libitum*. Zwei Tage nach Interventionsbeginn erfolgte die Initiation durch einmalige, äußerliche Applikation von 7,12-Dimethylbenzanthrazen (DMBA). Vierzehn Tage später wurde mit der Tumorpromotion begonnen, indem in regelmäßigen Abständen 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) ebenfalls oberflächlich angewendet wurde. Nach 20 Wochen TPA-Behandlung entwickelten die Kontrolltiere durchschnittlich  $12.8 \pm 3.65$  Papillome pro Maus. Der über die gesamte Dauer des Experiments verabreichte Apfelschalenextrakt reduzierte die Tumorzahl um mehr als 50 % auf  $5.8 \pm 1.8$  pro Maus. Außerdem hatte die Intervention einen Einfluss auf die Tumorgöße, da die Papillome in der Kontrollgruppe auf eine Größe von bis zu sechs mm Durchmesser anwuchsen, während in der Extraktgruppe Tumore dieser Größe nicht nachgewiesen wurden (Ding et al., 2004).

In einer Untersuchung an Ratten wurden durch Gabe von DMBA Brusttumore induziert. Zwei Wochen vor Injektion des Karzinogens erhielten die Tiere Extrakte aus ganzen Äpfeln, die in einer Dosis von 3.3, 10.0 und 20.0 g pro kg Körpergewicht per Schlundsonde verabreicht wurden. Nach 24 Wochen Intervention reduzierte der Apfelextrakt die Tumorinzidenz dosisabhängig um 17, 39 ( $p < 0.02$ ) bzw. 44 % ( $p < 0.01$ ) sowie die kumulative Tumorzahl um 25, 25 bzw. 61 % ( $p < 0.01$ ). Der Zeitraum bis zum Erscheinen der Tumore wurde von 11 Wochen in der Kontrolle auf 13 Wochen in der hochkonzentrierten Extraktgruppe verlängert. Insgesamt reduzierte sich die Tumorbelastung von  $4.79 \pm 5.90$  g pro Ratte auf bis zu  $0.88 \pm 1.80$  g pro Ratte durch die höchste Dosis (Liu et al., 2005).

Die beiden Studien geben indirekt Aufschluss über die Bioverfügbarkeit der Apfelinhaltsstoffe, die in Kapitel 4.2.5 bereits diskutiert wurde. Für eine systemische Wirkung, wie sie in den beiden Untersuchungen beschrieben wurde, ist die Aufnahme der Verbindungen in den Organismus eine wesentliche Voraussetzung. Die deutlichen Effekte sprechen dafür, dass eine wirksame Form der Polyphenole im Darm resorbiert wird, in die betroffenen Gewebe gelangt und dort den Prozess der Krebsentstehung hemmt.

## 4.4 Relevanz der Ergebnisse für den Menschen

### 4.4.1 Gegenüberstellung der Kolonkarzinogenese in Tier und Mensch

Die *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus zählt zu den wichtigsten Tiermodellen, die zur Identifikation darmkrebspräventiver Verbindungen verwendet werden. Weit über 200 Testsubstanzen wurden bisher in diesem Modell eingesetzt (<http://corpet.net/min>). Risikofaktoren wie Fleisch, tierische Fette und Alkohol, die beim Menschen mit einem vermehrten Auftreten von Darmkrebs in Verbindung gebracht werden (Potter, 1999; Martinez, 2005), fördern auch in der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus die Entstehung von Tumoren (Wasan et al., 1997; Mutanen et al., 2000; Roy et al., 2002). Die chemisch induzierte Karzinogenese in Ratten mittels Azoxymethan oder 1,2-Dimethylhydrazin wird ebenso häufig eingesetzt (Corpet & Tache, 2002). Wie bereits unter 1.4.4 beschrieben, weist jedes der beiden Modelle im Bezug auf ihre Übertragbarkeit auf den Menschen Vor- und Nachteile auf. Ein wesentlicher Kritikpunkt am *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modell ist, dass sich die Tumore hauptsächlich im Dünndarm befinden, wohingegen die präneoplastischen Läsionen der Ratte wie beim Menschen ausschließlich im Kolon auftreten. Dennoch führte die Anwendung der beiden unterschiedlichen Modelle auf eine Vielzahl von Verbindungen zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Corpet & Pierre, 2003). Die größten Übereinstimmungen waren dabei zwischen dem Kolon der Ratten und dem Dünndarm der Mäuse zu finden. Die Betrachtung des Kolons der Mäuse wies jedoch bei einigen Substanzen Diskrepanzen auf. Die meisten Testsubstanzen übten hier keinen Einfluss auf die Tumorentstehung aus. Nicht-steroidale antiinflammatorische Drogen (NSAID) wie Peroxicam, Sulindac und Celecoxib führten sogar zu einer tendenziellen Erhöhung der Tumorzahl, obwohl sie im Dünndarm der Tiere

sowie im Kolon der Ratten präventiv wirkten und auch in klinischen Studien am Menschen bereits erfolgreich eingesetzt wurden (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Einfluss nicht-steroidaler antiinflammatorischer Drogen (NSAID) auf die Tumorentstehung im *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modell.**

Verbindung	Dosis im Futter <sup>a</sup>	Behandlungseffekt <sup>b</sup> (% im Vgl. zur Kontrolle)	
		Dünndarm	Kolon
Celecoxib <sup>c</sup>	500 ppm	71*	37
Celecoxib <sup>c</sup>	1500 ppm	48*	253
Peroxicam <sup>d</sup>	100 ppm	18*	200
Sulindac <sup>e</sup>	320 ppm	7*	33

<sup>a</sup>ppm = parts per million, 1000 ppm = 0.1 %; <sup>b</sup>Behandlungseffekt berechnet als:  $100 \times (\text{Tumorzahl der Behandlungsgruppe}) / (\text{Tumorzahl der Kontrollgruppe})$ , Prozentwerte < 100 kennzeichnen eine protektive Wirkung; \* = signifikante Effekte; <sup>c</sup>(Jacoby et al., 2000); <sup>d</sup>(Jacoby et al., 1996); <sup>e</sup>(Chiu et al., 1997).

Für die widersprüchlichen Ergebnisse gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Aufgrund der niedrigen Tumorzahlen im Kolon der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse könnte die Anzahl der Adenome in einigen Fällen rein zufällig erhöht sein, da die Daten in den wenigsten Fällen signifikant sind. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Unterschiede in der Expression bestimmter Schlüsselenzyme von Bedeutung sind. Phospholipase A-2 und Cyclooxygenase-2 sind in Tumoren des Kolons von Menschen und Ratten sowie in Dünndarmtumoren der *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus hochreguliert (Rao et al., 1996; Dimberg et al., 1998). Die daraus resultierende Erhöhung der Prostaglandin E2 Konzentration fördert das Tumorzellwachstum. Im Kolon von Mäusen sind die Enzyme nicht überexprimiert (Takaku et al., 2000; Kawajiri et al., 2002), sodass NSAIDS hier keinen direkten Angriffspunkt haben. Diese Argumente sowie der Vergleich zum Menschen lässt darauf schließen, dass der Dünndarm der *Apc<sup>Min/+</sup>* Mäuse ein besseres Modell für den menschlichen Dickdarm darstellt als der Kolon der Tiere (Corpet & Pierre, 2003). Unter diesem Gesichtspunkt und aufgrund der Tatsache, dass trüber Apfelsaft, wie von uns und Barth et al. gezeigt (Barth et al., 2005), die Karzinogenese des Darms in beiden Tiermodellen gehemmt hat, ist eine Wirkung beim Menschen ebenfalls denkbar.

Corpet und Pierre führten kürzlich eine Meta-Analyse darmkrebspräventiver Studien für Verbindungen durch, die sowohl in den zuvor beschriebenen Tiermodellen als auch am Menschen eingesetzt wurden. Sie schlussfolgerten, dass die Daten aus Tierexperimenten

zwar teilweise mit den Resultaten aus Humanstudien übereinstimmten, eine exakte Voraussage für die Wirksamkeit beim Menschen jedoch nicht für alle Agenzien möglich ist (Corpet & Pierre, 2005). Im Falle von Selen, Celecoxib und Sulindac waren die Ergebnisse aus den Humanstudien in Kongruenz zu den Resultaten der Studien unter Verwendung der beiden Tiermodelle.

#### 4.4.2 Bioverfügbarkeit - Studien am Menschen

Die Frage nach der Wirkung polyphenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe im menschlichen Darm hängt im Wesentlichen davon ab, ob und in welchen Konzentrationen die Verbindungen den Kolon erreichen. Systemische Effekte erfordern weiterhin die Resorption aktiver Verbindungen über die Darmbarriere ins Blut. Flavonole, Dihydrochalkone, Hydroxyzimtsäuren und Catechine liegen im menschlichen Plasma zum Großteil in konjugierter Form vor (Williamson & Manach, 2005), obwohl Epicatechin z. B. nach Verzehr von Schokolade auch in freier Form im Plasma gefunden wurde (Richelle et al., 1999). Wie bereits für die *in vivo* Situation im Tiermodell diskutiert (Kapitel 4.2.5), werden die meisten Glykoside und Aglyka im Dünndarm resorbiert. Beim Transport durch Enterozyten ins Blut kommt es meist zur Abspaltung der Zuckerreste. Sie erfolgt entweder vor dem Transport durch die membranständige Laktase Phloridzin Hydrolase (LPH) oder in der Zelle durch die zytosolische  $\beta$ -Glukosidase (Nemeth et al., 2003). Intrazellulär werden die Verbindungen anschließend z. B. durch Phase 2 Enzyme konjugiert, sodass sie als Glucuronide, Sulphate oder in methylierter Form im Plasma nachweisbar sind (Petri et al., 2003; Manach et al., 2004). Inwieweit biologische Aktivitäten allerdings von diesen Konjugaten ausgehen, ist noch unklar. Einigen Epicatechinmetaboliten konnte *in vitro* ein antioxidatives Potenzial nachgewiesen werden, wobei das freie Flavanol jedoch deutlich aktiver war (Natsume et al., 2004).

Indirekte Beweise für die Aktivität erbringen Messungen des antioxidativen Potenzials im Plasma nach Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel. Das antioxidative Potenzial im Plasma kann für die Prävention von Darmkrebs insofern von Bedeutung sein, da die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht ist (van der Logt et al., 2005). Der Konsum von Fruchtsäften führte bei gesunden Probanden u. a. zu einer Verbesserung des

antioxidativen Status und reduzierte DNA-Schäden in Lymphozyten (Bub et al., 2003). In einer weiteren Probandenstudie führte die Verabreichung von Apfelsaft bereits nach 30 min zu einer Verminderung reaktiver Sauerstoffspezies im Plasma (Ko et al., 2005). Ebenso erwirkte die Aufnahme von Äpfeln einen antioxidativen Effekt im Plasma, der nach 3 h ein Maximum erreichte und vor allem die wasserlöslichen Bestandteile des Plasmas vor Oxidation schützte (Mayer et al., 2001). Die Zeitabhängigkeit der physiologischen Effekte ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen analytischer Studien zur Aufnahme von Flavonoiden nach dem Verzehr flavonoidreicher Mahlzeiten. Die maximale Plasmakonzentration der meisten Verbindungen wird ebenfalls in einem Zeitraum zwischen 30 min und 3 h gemessen (Manach et al., 2005). Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Studien steht eine Untersuchung von Lotito und Frei. Der Konsum von Äpfeln ging dabei auch mit einer erhöhten antioxidativen Kapazität des Plasmas einher. Gleichzeitig wurde jedoch der Anstieg von Harnsäure im Plasma beobachtet, der auf die Zufuhr von Fruktose zurückgeführt wurde. Die Verabreichung einer äquivalenten Menge an Fruktose alleine erzielte einen vergleichbaren Anstieg des antioxidativen Potenzials sowie von Harnsäure im Plasma wie er nach Apfelkonsum beobachtet wurde (Lotito & Frei, 2004).

Unabhängig davon, welche Rolle die Substanzen im System spielen, gilt es als gesichert, dass Polyphenole in relevanten Konzentrationen im Gastrointestinaltrakt vorliegen und direkt auf die Zellen des Darms einwirken können (Halliwell et al., 2005). Eine lokale Wirkung ist somit sehr wahrscheinlich. Die Wiederfindungsraten aufgenommener Polyphenole in Blut und Urin weisen darauf hin, dass ein bedeutender Anteil der Verbindungen den Dickdarm erreicht (Manach et al., 2005). Eine von Kahle et al. durchgeführte Studie mit Kolostomie-Patienten bestätigte, dass nach Verzehr von einem Liter Apfelsaft bis zu 30 % der enthaltenen Polyphenole den Dünndarm ungehindert passieren können. Die Verbindungen Quercetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-arabinosid, Chlorogensäure, Phloretin, Phloretin-2'-xyloglukosid und Epicatechin waren unverändert im Stoma-Inhalt nachweisbar und hätten unter normalen Umständen den Kolon erreicht. Die Wiederfindungsraten lagen im Einzelnen zwischen 6 und 33 %. Außerdem wurde ein Phloretin-glucuronid detektiert (Kahle et al., 2005). Konjugierte Verbindungen können auf zwei Wegen in den Kolon gelangen. Zum einen können sie nach der Metabolisierung über Exportpumpen wieder aus den Enterozyten ausgeschleust werden (Walgren et al., 2000).

Zum anderen können sie über das Blut zur Leber und von dort über den enterohepatischen Kreislauf in der Gallenflüssigkeit zurück in den Darm befördert werden (Manach et al., 2004). Auch bei einer lokalen Wirkung im Darm ist fraglich, inwieweit die Metabolite über die gleichen Aktivitäten verfügen wie die freien Verbindungen. Interessanterweise wies eine *in vitro* Untersuchung kürzlich darauf hin, dass es im Rahmen von Entzündungsprozessen in verschiedenen Geweben zur Deglucuronidierung von Metaboliten durch  $\beta$ -Glucuronidasen kommen kann. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass humane Kolonkarzinomzellen besonders hohe Aktivitäten dieses Enzyms aufweisen, sodass eine Freisetzung von freien Polyphenolen im Kolon durchaus denkbar wäre (Shimoi & Nakayama, 2005). Die Mikroflora des Dickdarms ist ebenfalls in der Lage, Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren aus ihrer konjugierten Form freizusetzen (Couteau et al., 2001; Aura et al., 2002). Ebenso kann es durch die Darmbakterien jedoch auch zum Abbau der Verbindungen kommen (Braune et al., 2001; Rechner et al., 2004). In diesem Fall ist zu berücksichtigen, inwieweit ein positiver Effekt auf die Polyphenole selber oder auf die aus ihnen hervorgehenden Abbauprodukte zurückzuführen ist.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen erneut unter Beweis, dass pflanzliche Lebensmittel durch ihren Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Menschen haben könnten. Der Apfelsaft und seine polyphenolischen Inhaltsstoffe wurden exemplarisch herangezogen, um ihre chemopräventive Wirkung auf die Entstehung von Darmkrebs genauer zu beleuchten. Die im Saft identifizierten Verbindungen zeichneten sich durch ein breites Spektrum chemopräventiver Eigenschaften *in vitro* aus, die sich hinsichtlich der Beeinflussung der Karzinogenese vermutlich in synergistischer oder additiver Weise ergänzen. Procyanidine wurden als besonders aktive Verbindungen identifiziert, die hinsichtlich ihres chemopräventiven Potenzials künftig verstärkt untersucht werden sollten.

Der Einsatz eines polyphenolreichen Extraktes im Tierexperiment stellte die Beteiligung dieser Verbindungen an der tumorhemmenden Wirkung von trübem Apfelsaft deutlich unter Beweis. Dennoch zeigte sich sehr eindrucksvoll, dass vom komplexen Lebensmittel im Vergleich zu den isolierten Inhaltsstoffen eine weitaus stärkere Wirkung ausging. Bei

annähernd gleichem Effekt auf die Adenombildung war die Konzentration an Polyphenolen im Saft fünfmal niedriger. Die biologische Matrix scheint somit für die Wirkung bioaktiver Lebensmittelinhaltsstoffe von entscheidender Bedeutung zu sein. Dieser Tatsache sollte in weiterführenden Untersuchungen Rechnung getragen werden.

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse, die im Rahmen des vorliegenden Projektes gewonnen wurden, leisten einen entscheidenden Beitrag, um die Durchführung von Studien am Menschen zu rechtfertigen. In Form von humanen Interventionsstudien sollte die Bedeutung von trübem Apfelsaft und darin enthaltenen Inhaltsstoffen für die menschliche Gesundheit aufgeklärt werden. Auf dieser Basis ist es möglich, gezielte Empfehlungen auszusprechen, die als Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Strategien zur Krankheitsprävention dienlich sein können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war innerhalb eines BMBF geförderten Netzwerkprojektes das darmkrebspräventive Potenzial von Apfelsaft und dessen polyphenolischen Inhaltsstoffen zu charakterisieren.

In Zusammenarbeit mit der Universität des Saarlandes und der Forschungsanstalt Geisenheim wurde im Rahmen einer „*activity-guided fractionation*“ ein polyphenolreicher Apfelsaftextrakt zunächst fraktioniert und analysiert. Die daraus hervorgegangenen 57 Fraktionen und Subfraktionen sowie 23 darin identifizierte Reinsubstanzen wurden in eine Reihe von zell- und enzymbasierten Testsystemen eingesetzt, um ihre chemopräventiven Eigenschaften zu charakterisieren und die aktivsten Inhaltsstoffe zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die einzelnen Verbindungen und Substanzklassen unterschiedliche Mechanismen beeinflussen können, die während der Initiations-, Promotions- und Progressionsphase der Darmkrebsentstehung von Bedeutung sind. Während Phenolcarbonsäuren des Apfels vornehmlich Radikale und reaktive Sauerstoffspezies unschädlich machen konnten, waren einige Dihydrochalkone, Flavanole und Flavonole zusätzlich in der Lage, durch die Hemmung von Cytochrom P450 1A den Fremdstoffmetabolismus zu modulieren und durch die Hemmung der Aromatase und der Cyclooxygenase-1 die Bildung von Tumorpromotoren wie Prostaglandinen und Estradiol zu vermindern. Vor allem bei den Procyanidinen handelte es sich um eine äußerst vielversprechende Gruppe von Apfelinhaltsstoffen. Alle betrachteten Angriffspunkte der Chemoprävention wurden durch sie in physiologisch relevanten Konzentrationen von 1-10  $\mu\text{M}$  höchst effektiv moduliert. Weiterhin hemmten sie die Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen, wobei die Induktion von Apoptose als möglicher Mechanismus an der Wachstumshemmung beteiligt sein könnte.

Zur Verifizierung der *in vitro* gewonnenen Daten wurde der Einfluss von trübem Apfelsaft und 0.2 % Apfelpolyphenolextrakt auf die Tumorentstehung in einem Tiermodell zur genetisch induzierten Karzinogenese im Darm untersucht. In der sog. *Apc*<sup>Min/+</sup> Maus führten beide Interventionen im mittleren und distalen Dünndarm zu einer signifikanten Reduktion der Adenome um 38 und 40 %. Dabei wurden vor allem Tumore mit einem

Durchmesser von 1-3 mm und >3 mm vermindert. Weiterhin wurden histopathologische Befunde sowie klinische Parameter wie Hämatokrit und Milzgewicht, die bei diesen Tieren aufgrund der Tumorentwicklung stark verändert sind, deutlich verbessert. Interessanterweise waren die Effekte bei beiden Behandlungen ähnlich stark ausgeprägt, obwohl die Tiere über den Extrakt eine fünfmal höhere Menge an Polyphenolen aufnahmen als über den Saft. Dem komplexen Lebensmittel muß somit im Vergleich zum isolierten Extrakt eine besondere Bedeutung beigemessen werden. Keine der Behandlungen führte in den Organen gesunder Tiere zu histopathologischen Auffälligkeiten, sodass eine durch Trübsaft oder polyphenolreichen Extrakt induzierte Toxizität ausgeschlossen werden konnte.

Die Ergebnisse des vorliegenden Teilprojektes sind in hoher Kongruenz mit den Resultaten anderer Teilprojekte des Netzwerkes. Die interdisziplinären Untersuchungen ergänzen sich in sinnvoller Weise. Sie belegen erneut, dass pflanzliche Lebensmittel durch ihren Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen einen bedeutenden Beitrag zur Gesunderhaltung des Menschen leisten könnten. Die bisherigen Erkenntnisse sollten in Zukunft um die genauere Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen erweitert und die Relevanz für den Menschen in Form von Humanstudien analysiert werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Fraga, C.G.** (2006). Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* **54**, 229-234.
- Alonso-Salces, R.M., Barranco, A., Abad, B., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F.** (2004a). Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *J Agric Food Chem* **52**, 2938-2952.
- Alonso-Salces, R.M., Ndjoko, K., Queiroz, E.F., Ioset, J.R., Hostettmann, K., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F.** (2004b). On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A* **1046**, 89-100.
- Arts, I.C., Hollman, P.C.** (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 317S-325S.
- Arts, I.C., Jacobs, D.R., Jr., Folsom, A.R.** (2002). Dietary catechins and cancer incidence: the Iowa Women's Health Study. *IARC Sci Publ* **156**, 353-355.
- Augenlicht, L.H.** (1998). The molecular genetics of colonic cancer. In *Gastrointestinal Oncology*, A.B. Benson, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publisher Group).
- Aura, A.M., O'Leary, K.A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimia, R., Nuutila, A.M., Oksman-Caldentey, K.M., Poutanen, K.** (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem* **50**, 1725-1730.
- Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S., Vogelstein, B.** (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **50**, 7717-7722.
- Barth, S.W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K., Rechkemmer, G.** (2005). Cloudy apple juice decreases DNA-damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* **26**, 1414-1421.
- Bartsch, H., Nair, J.** (2004). Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention* **28**, 385-391.

- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R.M.** (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* **31**, 1441-1444.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A.** (1998). Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z Ernährungswiss* **37**, 147-163.
- Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M.** (2001). Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5558-5567.
- Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegibel, U., Müller, H., Pool-Zobel, B.L., Rechkemmer, G.** (2003). Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* **14**, 90-98.
- Cao, G., Prior, R.L.** (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol* **299**, 50-62.
- Caro, A.A., Cederbaum, A.I.** (2006). Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **40**, 364-375.
- Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J., Haslam, E., Davies, A.P., Williamson, M.P.** (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem* **50**, 1593-1601.
- Chinnici, F., Bendini, A., Gaiani, A., Riponi, C.** (2004). Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem* **52**, 4684-4689.
- Chiu, C.H., McEntee, M.F., Whelan, J.** (1997). Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. *Cancer Res* **57**, 4267-4273.
- Chulada, P.C., Thompson, M.B., Mahler, J.F., Doyle, C.M., Gaul, B.W., Lee, C., Tiano, H.F., Morham, S.G., Smithies, O., Langenbach, R.** (2000). Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* **60**, 4705-4708.
- Chung, F.L., Conaway, C.C., Rao, C.V., Reddy, B.S.** (2000). Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* **21**, 2287-2291.
- Corpet, D.E., Tache, S.** (2002). Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer* **43**, 1-21.

- Corpet, D.E., Pierre, F.** (2003). Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 391-400.
- Corpet, D.E., Pierre, F.** (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer* **41**, 1911-1922.
- Counet, C., Collin, S.** (2003). Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J Agric Food Chem* **51**, 6816-6822.
- Couteau, D., McCartney, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G., Faulds, C.B.** (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol* **90**, 873-881.
- Crespi, C.L., Miller, V.P., Penman, B.W.** (1997). Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* **248**, 188-190.
- Crespy, V., Aprikian, O., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigné, C., Rémésy, C.** (2002). Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats. *J. Nutr.* **132**, 3227-3230.
- Crowell, J.A.** (2005). The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview. *Eur J Cancer* **41**, 1889-1910.
- da Silva Porto, P.A., Laranjinha, J.A., de Freitas, V.A.** (2003). Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochem Pharmacol* **66**, 947-954.
- Dashwood, R.H., Suzui, M., Nakagama, H., Sugimura, T., Nagao, M.** (1998). High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res* **58**, 1127-1129.
- Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R., Williamson, G.** (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* **468**, 166-170.
- De Filippo, C., Caderni, G., Bazzicalupo, M., Briani, C., Giannini, A., Fazi, M., Dolara, P.** (1998). Mutations of the Apc gene in experimental colorectal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Br J Cancer* **77**, 2148-2151.

- De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R.M., Noonan, D., Albini, A.** (2001). Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res* **480-481**, 9-22.
- Debatin, K.M., Krammer, P.H.** (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **23**, 2950-2966.
- Deneo-Pellegrini, H., De Stefani, E., Ronco, A.** (1996). Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay. *Nutr Cancer* **25**, 297-304.
- Dennison, B.A.** (1996). Fruit juice consumption by infants and children: a review. *J Am Coll Nutr* **15**, 4S-11S.
- Di Domenico, M., Castoria, G., Bilancio, A., Migliaccio, A., Auricchio, F.** (1996). Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* **56**, 4516-4521.
- Dietrich, H., Gierschner, K., Pecoroni, S., Zimmer, E., Will, F.** (1996). New findings regarding the phenomenon of cloud stability - first results from a continuous research program. *Flüssiges Obst* **63**, 7-10.
- DiGiovanni, J., Kleiner, H.E.** (2004). Modifiers of Cytochrome(s) P450. In *Cancer Chemoprevention*, G. Kelloff, E. Hawk, C.C. Sigman, eds (New Jersey: Humana Press Inc.).
- Dimberg, J., Samuelsson, A., Hugander, A., Soderkvist, P.** (1998). Gene expression of cyclooxygenase-2, group II and cytosolic phospholipase A2 in human colorectal cancer. *Anticancer Res* **18**, 3283-3287.
- Ding, M., Lu, Y., Bowman, L., Huang, C., Leonard, S., Wang, L., Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X.** (2004). Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract. *J Biol Chem* **279**, 10670-10676.
- Doll, R., Peto, R.** (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* **66**, 1191-1308.
- Druckrey, H., Preussmann, R., Matzkies, F., Ivankovic, S.** (1967). Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Naturwissenschaften* **54**, 285-286.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E.** (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* **12**, 1063-1073.

- Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H.** (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* **405**, 903-904.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giaardello, F.M., Ferrenbach, S., Dubois, R.N.** (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **107**, 1183-1188.
- Eng, E.T., Ye, J., Williams, D., Phung, S., Moore, R.E., Young, M.K., Gruntmanis, U., Braunstein, G., Chen, S.** (2003). Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. *Cancer Res* **63**, 8516-8522.
- Escarpa, A., Gonzalez, M.C.** (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A* **823**, 331-337.
- Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M.** (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benz[a]pyrene-induced stomach cancer. *PNAS* **99**, 7610-7615.
- Fazeli, A., Steen, R.G., Dickinson, S.L., Bautista, D., Dietrich, W.F., Bronson, R.T., Bresalier, R.S., Lander, E.S., Costa, J., Weinberg, R.A.** (1997). Effects of p53 mutations on apoptosis in mouse intestinal and human colonic adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10199-10204.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B.** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- Ferguson, L.R.** (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* **475**, 89-111.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N.** (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* **198**, 147-159.
- Feskanich, D., Ziegler, R.G., Michaud, D.S., Giovannucci, E.L., Speizer, F.E., Willett, W.C., Colditz, G.A.** (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1812-1823.
- Fiorelli, G., Picariello, L., Martinetti, V., Tonelli, F., Brandi, M.L.** (1999). Estrogen synthesis in human colon cancer epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **71**, 223-230.
- Fischer, M.** (2003). *Farbatlas Obstsorten*. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart.
- Fodde, R.** (2003). The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC. *Nat Cell Biol* **5**, 190-192.

- Fodde, R., Smits, R., Clevers, H.** (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 55-67.
- Gallus, S., Talamini, R., Giacosa, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Franceschi, S., Negri, E., La Vecchia, C.** (2005). Does an apple a day keep the oncologist away? *Ann Oncol* **16**, 1841-1844.
- Gerhauser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauff, J., Liu, G.Y., Sitthimonchai, S., Frank, N.** (2003). Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* **523-524**, 163-172.
- Gonthier, M.P., Donovan, J.L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., Scalbert, A.** (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med* **35**, 837-844.
- Goss, K.H., Groden, J.** (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* **18**, 1967-1979.
- Gosse, F., Guyot, S., Roussi, S., Lobstein, A., Fischer, B., Seiler, N., Raul, F.** (2005). Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**, 1291-1295.
- Graziani, G., D'Argenio, G., Tuccillo, C., Loguerico, C., Ritieni, A., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, C., Fogliano, V., Romano, M.** (2005). Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and in to rat gastric mucosa. *Gut* **54**, 193-200.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., Drilleau, J.F.** (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J Agric Food Chem* **51**, 6240-6247.
- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J.F.** (1998). Reversed-Phase HPLC following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterisation of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J Agric Food Chem* **46**, 1698-1705.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G.** (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem* **256**, 4494-4497.
- Halberg, R.B., Katzung, D.S., Hoff, P.D., Moser, A.R., Cole, C.E., Lubet, R.A., Donehower, L.A., Jacoby, R.F., Dove, W.F.** (2000). Tumorigenesis in the multiple intestinal neoplasia mouse: redundancy of negative regulators and specificity of modifiers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3461-3466.

- Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M.** (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* **33**, 819-830.
- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A.** (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* **81**, 268S-276S.
- Harris, C.C.** (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* **51**, 5023s-5044s.
- Hashimoto, K., Kawamata, S., Usui, N., Tanaka, A., Uda, Y.** (2002). In vitro induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in human hepatoma cells by food extracts. *Cancer Lett* **180**, 1-5.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B.** (1992). Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* **40**, 2379-2383.
- Hilbrand, C., Baumgartner, A.** (2000). "Wer den Apfel versteht, versteht die Welt". *Tabula* **3**, 16-19.
- Hoensch, H.P., Kirch, W.** (2005). Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. *Int J Gastrointest Cancer* **35**, 187-195.
- <http://corpet.net/min>**. Chemoprevention of Colorectal Cancer - Database of agents & diets ranked by efficacy. A systematic review of experimental studies (men, rats, mice).
- IARC.** (1987). International Agency for Research on Cancer. Cancer incidence in five continents. (Lyon: IARC Press).
- IARC.** (2003). International Agency for Research on Cancer. Fruit and Vegetables. (Lyon: IARC Press).
- Ilyas, M.** (2005). Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* **205**, 130-144.
- Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I.P., Bodmer, W.F.** (1999). Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* **35**, 1986-2002.
- Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N., Terao, J.** (1998). beta-Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1428-1431.

- Jacoby, R.F., Seibert, K., Cole, C.E., Kelloff, G., Lubet, R.A.** (2000). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* **60**, 5040-5044.
- Jacoby, R.F., Marshall, D.J., Newton, M.A., Novakovic, K., Tutsch, K., Cole, C.E., Lubet, R.A., Kelloff, G.J., Verma, A., Moser, A.R., Dove, W.F.** (1996). Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Cancer Res* **56**, 710-714.
- Jakubikova, J., Sedlak, J., Mithen, R., Bao, Y.** (2005). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathway in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **69**, 1543-1552.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M.** (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220.
- Johnson, G.L., Lapadat, R.** (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Ju, J., Hong, J., Zhou, J.N., Pan, Z., Bose, M., Liao, J., Yang, G.Y., Liu, Y.Y., Hou, Z., Lin, Y., Ma, J., Shih, W.J., Carothers, A.M., Yang, C.S.** (2005). Inhibition of intestinal tumorigenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res* **65**, 10623-10631.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Richling, E.** (2005). Colonic availability of apple polyphenols-a study in ileostomy subjects. *Mol Nutr Food Res* **49**, 1143-1150.
- Kawajiri, H., Hsi, L.C., Kamitani, H., Ikawa, H., Geller, M., Ward, T., Eling, T.E., Glasgow, W.C.** (2002). Arachidonic and linoleic acid metabolism in mouse intestinal tissue: evidence for novel lipoxygenase activity. *Arch Biochem Biophys* **398**, 51-60.
- Keck, A.S., Qiao, Q., Jeffery, E.H.** (2003). Food matrix effects on bioactivity of broccoli-derived sulforaphane in liver and colon of F344 rats. *J Agric Food Chem* **51**, 3320-3327.
- Kelloff, G., Sigman, C.C.** (2003). Arachidonic Acid Pathway in Cancer Prevention. In *Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Prevention*, V. H.U. ,E.K. Hietanen, eds (Berlin, New York: Springer Verlag), pp. 187-210.
- Kelloff, G.J., Boone, C.W., Steele, V.E., Fay, J.R., Lubet, R.A., Crowell, J.A., Sigman, C.C.** (1994). Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J Cell Biochem Suppl* **20**, 1-24.

- Kensler, T.W., Talalay, P.** (2004). Inducers of Enzymes That Protect Against Carcinogens and Oxidants. In *Cancer Chemoprevention*, G.J. Kelloff, E.T. Hawk, C.C. Sigman, eds (New Jersey: Humana Press Inc.).
- Kern, M., Tjaden, Z., Ngiewih, Y., Puppel, N., Will, F., Dietrich, H., Pahlke, G., Marko, D.** (2005). Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* **49**, 317-328.
- Khosravi-Far, R., Esposti, M.D.** (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* **3**, 1051-1057.
- Kim, D.J., Shin, D.H., Ahn, B., Kang, J.S., Nam, K.T., Park, C.B., Kim, C.K., Hong, J.T., Kim, Y.B., Yun, Y.W., Jang, D.D., Yang, K.H.** (2003). Chemoprevention of colon cancer by Korean food plant components. *Mutat Res* **523-524**, 99-107.
- Kim, R.** (2005). Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* **103**, 1551-1560.
- Kim, Y.J., Park, H.J., Yoon, S.H., Kim, M.J., Leem, K.H., Chung, J.H., Kim, H.K.** (2005). Anticancer effects of oligomeric proanthocyanidins on human colorectal cancer cell line, SNU-C4. *World J Gastroenterol* **11**, 4674-4678.
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B.** (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-170.
- Kitamura, T., Kawamori, T., Uchiya, N., Itoh, M., Noda, T., Matsuura, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K.** (2002). Inhibitory effects of mofezolac, a cyclooxygenase-1 selective inhibitor, on intestinal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**, 1463-1466.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A.** (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* **76**, 560-568.
- Ko, S.H., Choi, S.W., Ye, S.K., Cho, B.L., Kim, H.S., Chung, M.H.** (2005). Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J Med Food* **8**, 41-46.
- Kozikowski, A.P., Tuckmantel, W., Bottcher, G., Romanczyk, L.J., Jr.** (2003). Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4.(1) Synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4beta,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. *J Org Chem* **68**, 1641-1658.

- Landolfi, R., Mower, R.L., Steiner, M.** (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol* **33**, 1525-1530.
- Lapidot, T., Walker, M.D., Kanner, J.** (2002). Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem* **50**, 3156-3160.
- Lattanzio, V., Di Venere, D., Linsalata, V., Bertolini, P., Ippolito, A., Salerno, M.** (2001). Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *J Agric Food Chem* **49**, 5817-5821.
- Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N.** (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 154-160.
- Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Ci, z, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y.S., Jung, S.T., Trakhtenberg, S., Martin-Belloso, O.** (2002). Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J Nutr Biochem* **13**, 603-610.
- Levy, D.B., Smith, K.J., Beazer-Barclay, Y., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.** (1994). Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res* **54**, 5953-5958.
- Liang, Y.C., Tsai, S.H., Chen, L., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K.** (2003). Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol* **65**, 1053-1060.
- Linseisen, J., Radtke, J., Wolfram, G.** (1997). Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Z Ernährungswiss* **36**, 403-412.
- Lippman, S.M., Lee, J.J., Sabichi, A.L.** (1998). Cancer chemoprevention: progress and promise. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1514-1528.
- Liu, R.H.** (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* **78**, 517S-520S.
- Liu, R.H., Sun, J.** (2003). Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *J Agric Food Chem* **51**, 1718-1723.
- Liu, R.H., Liu, J., Chen, B.** (2005). Apples Prevent Mammary Tumors in Rats. *J Agric Food Chem* **53**, 2341-2343.

- Logan, C.Y., Nusse, R.** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.
- Lotito, S.B., Frei, B.** (2004). The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med* **37**, 251-258.
- Lotito, S.B., Actis-Goretta, L., Renart, M.L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H.H., Steinberg, F.M., Keen, C.L., Fraga, C.G.** (2000). Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 945-951.
- Luongo, C., Moser, A.R., Gledhill, S., Dove, W.F.** (1994). Loss of Apc<sup>+</sup> in intestinal adenomas from Min mice. *Cancer Res* **54**, 5947-5952.
- Lynch, H.T., de la Chapelle, A.** (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919-932.
- Mahmoud, N.N., Carothers, A.M., Grunberger, D., Bilinski, R.T., Churchill, M.R., Martucci, C., Newmark, H.L., Bertagnolli, M.M.** (2000). Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* **21**, 921-927.
- Mai, V., Colbert, L.H., Berrigan, D., Perkins, S.N., Pfeiffer, R., Lavigne, J.A., Lanza, E., Haines, D.C., Schatzkin, A., Hursting, S.D.** (2003). Calorie restriction and diet composition modulate spontaneous intestinal tumorigenesis in Apc(Min) mice through different mechanisms. *Cancer Res* **63**, 1752-1755.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 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**, 230S-242S.
- Martinez, M.E.** (2005). Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res* **166**, 177-211.
- Mata-Greenwood, E., Ito, A., Westenburg, H., Cui, B., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M.** (2001). Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. *Anticancer Res* **21**, 1763-1770.
- Matusheski, N.V., Jeffery, E.H.** (2001). Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J Agric Food Chem* **49**, 5743-5749.

- Mayer, B., Schumacher, M., Brandstatter, H., Wagner, F.S., Hermetter, A.** (2001). High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Anal Biochem* **297**, 144-153.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., Nakamura, Y.** (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* **1**, 229-233.
- Moolenbeek, C., Ruitenberg, E.J.** (1981). The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* **15**, 57-59.
- Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E.** (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* **20**, 187-210.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., Dove, W.F.** (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322-324.
- Moser, A.R., Dove, W.F., Roth, K.A., Gordon, J.I.** (1992). The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. *J Cell Biol* **116**, 1517-1526.
- Moser, A.R., Shoemaker, A.R., Connelly, C.S., Clipson, L., Gould, K.A., Luongo, C., Dove, W.F., Siggers, P.H., Gardner, R.L.** (1995). Homozygosity for the Min allele of *Apc* results in disruption of mouse development prior to gastrulation. *Dev Dyn* **203**, 422-433.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M., Blomhoff, R.** (2004). Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev* **125**, 315-324.
- Mukhtar, H., Ahmad, N.** (1999). Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol* **158**, 207-210.
- Mutanen, M., Pajari, A.M., Oikarinen, S.I.** (2000). Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in *Apc*(Min) mice: relation to beta-catenin and PKC isozymes. *Carcinogenesis* **21**, 1167-1173.
- Myzak, M.C., Dashwood, W.M., Orner, G.A., Ho, E., Dashwood, R.H.** (2006). Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in *Apc*<sup>Min</sup> mice. *FASEB J* **20**, 506-508.
- Natsume, M., Osakabe, N., Yasuda, A., Baba, S., Tokunaga, T., Kondo, K., Osawa, T., Terao, J.** (2004). In vitro antioxidative activity of (-)-epicatechin glucuronide metabolites present in human and rat plasma. *Free Radic Res* **38**, 1341-1348.

- Nemeth, K., Plumb, G.W., Berrin, J.G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A.** (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**, 29-42.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P.** (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**, 665-669.
- Olsson, M.E., Gustavsson, K.E., Andersson, S., Nilsson, A., Duan, R.D.** (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J Agric Food Chem* **52**, 7264-7271.
- Onoue, M., Kado, S., Sakaitani, Y., Uchida, K., Morotomi, M.** (1997). Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett* **113**, 179-186.
- Orner, G.A., Dashwood, W.M., Blum, C.A., Diaz, G.D., Li, Q., Dashwood, R.H.** (2003). Suppression of tumorigenesis in the Apc(min) mouse: down-regulation of beta-catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis* **24**, 263-267.
- Ottaviani, J.I., Actis-Goretta, L., Villordo, J.J., Fraga, C.G.** (2005). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* **88**, 359-365.
- Park, C.M., Reid, P.E., Walker, D.C., MacPherson, B.R.** (1987). A simple, practical 'swiss roll' method of preparing tissues for paraffin or methacrylate embedding. *J Microsc* **145 ( Pt 1)**, 115-120.
- Park, J.Y., Park, S.J., Shim, K.Y., Lee, K.J., Kim, Y.B., Kim, Y.H., Kim, S.K.** (2004). Echinomycin and a novel analogue induce apoptosis of HT-29 cells via the activation of MAP kinases pathway. *Pharmacol Res* **50**, 201-207.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P.** (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108.
- Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F.A., Bao, Y., Plumb, G.W., Bacon, J., O'Leary, K.A., Kroon, P.A., Knutson, L., Forsell, P., Eriksson, T., Lennernas, H., Williamson, G.** (2003). Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos* **31**, 805-813.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C.** (2004). Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **52**, 1177-1180.

- Pinto, D., Clevers, H.** (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* **306**, 357-363.
- Pitot, H.C.** (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* **72**, 962-970.
- Plastaras, J.P., Guengerich, F.P., Nebert, D.W., Marnett, L.J.** (2000). Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J Biol Chem* **275**, 11784-11790.
- Potter, J.D.** (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* **91**, 916-932.
- Potter, J.D., Slattery, M.L., Bostick, R.M., Gapstur, S.M.** (1993). Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* **15**, 499-545.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.** (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**, 235-237.
- Prochaska, H.J.** (1997). Chemoprevention Models. In *Encyclopedia of Cancer*, J.R. Bertino, ed (San Diego: Academic Press), pp. 330-339.
- Prochaska, H.J., Santamaria, A.B., Talalay, P.** (1992). Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2394-2398.
- Ramljak, D., Romanczyk, L.J., Metheny-Barlow, L.J., Thompson, N., Knezevic, V., Galperin, M., Ramesh, A., Dickson, R.B.** (2005). Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **4**, 537-546.
- Rao, C.V., Simi, B., Wynn, T.T., Garr, K., Reddy, B.S.** (1996). Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. *Cancer Res* **56**, 532-537.
- Rechner, A.R., Smith, M.A., Kuhnle, G., Gibson, G.R., Debnam, E.S., Srail, S.K., Moore, K.P., Rice-Evans, C.A.** (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med* **36**, 212-225.

- Rezk, B.M., Haenen, G.R., van der Vijgh, W.J., Bast, A.** (2002). The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 9-13.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.** (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**, 933-956.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Enslen, M., Offord, E.A.** (1999). Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr* **53**, 22-26.
- Ries, L.A.G., Eisner, M.P., Kosary, C.L., Hankey, B.F., Miller, B.A., Clegg, L., Mariotto, A., Feuer, E.J., Edwards, B.K.** (2004). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2002/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/) (National Cancer Institute).
- Ritland, S.R., Leighton, J.A., Hirsch, R.E., Morrow, J.D., Weaver, A.L., Gendler, S.J.** (1999). Evaluation of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) for cancer chemoprevention: lack of efficacy against nascent adenomatous polyps in the Apc(Min) mouse. *Clin Cancer Res* **5**, 855-863.
- Rogers, E.J., Milhalik, S., Orthiz, D., Shea, T.B.** (2004). Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *J Nutr Health Aging* **8**, 92-97.
- Roy, H.K., Gulizia, J.M., Karolski, W.J., Ratashak, A., Sorrell, M.F., Tuma, D.** (2002). Ethanol promotes intestinal tumorigenesis in the MIN mouse. Multiple intestinal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1499-1502.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., Drilleau, J.P.** (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J Agric Food Chem* **47**, 4847-4853.
- Santen, R.J.** (2002). To block estrogen's synthesis or action: that is the question. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 3007-3012.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A.** (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* **80**, 1094-1117.
- Sattar, A., Hewer, A., Phillips, D.H., Campbell, F.C.** (1999). Metabolic proficiency and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in APCMin mouse adenomas and uninvolved mucosa. *Carcinogenesis* **20**, 1097-1101.
- Scalbert, A., Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, 2073S-2085S.

- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Janzowski, C.** (2005). Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* **50**, 24-33.
- Schieber, A., Keller, P., Carle, R.** (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **910**, 265-273.
- Seeram, N.P., Zhang, Y., Nair, M.G.** (2003). Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr Cancer* **46**, 101-106.
- Sennewald, K.** (2005). Geschäftsbericht. VdF, Bonn.
- Seralini, G., Moslemi, S.** (2001). Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol Cell Endocrinol* **178**, 117-131.
- Sesink, A.L., Arts, I.C., Faassen-Peters, M., Hollman, P.C.** (2003). Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *J Nutr* **133**, 773-776.
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P.** (2005). Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* **41**, 1955-1968.
- Shimoi, K., Nakayama, T.** (2005). Glucuronidase deconjugation in inflammation. *Methods Enzymol* **400**, 263-272.
- Shoemaker, A.R., Luongo, C., Moser, A.R., Marton, L.J., Dove, W.F.** (1997). Somatic mutational mechanisms involved in intestinal tumor formation in Min mice. *Cancer Res* **57**, 1999-2006.
- Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Kanda, T., Ohtake, Y.** (2006a). Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J Chromatogr A* **1102**, 206-213.
- Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Akiyama, H., Kanda, T., Ohtake, Y., Goda, Y.** (2006b). Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **54**, 884-892.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., et al.**

- (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* **15**, 342-355.
- Sivaraman, L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L.** (1994). CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res* **54**, 3692-3695.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R.** (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1107-1112.
- Smalley, W., Dubois, R.N.** (1997). Colorectal cancer and non steroidal anti-inflammatory drugs. *Advances in Pharmacology* **39**, 1-20.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sohn, O.S., Fiala, E.S., Requeijo, S.P., Weisburger, J.H., Gonzalez, F.J.** (2001). Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res* **61**, 8435-8440.
- Somoza, V., Lindenmeier, M., Wenzel, E., Frank, O., Erbersdobler, H.F., Hofmann, T.** (2003). Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. *J Agric Food Chem* **51**, 6861-6869.
- Sorensen, I.K., Kristiansen, E., Mortensen, A., Nicolaisen, G.M., Wijnands, J.A., van Kranen, H.J., van Kreijl, C.F.** (1998). The effect of soy isoflavones on the development of intestinal neoplasia in ApcMin mouse. *Cancer Lett* **130**, 217-225.
- Spanos, G.A., Wrolstad, R.E., D.A., H.** (1990). Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Apple Juice. *J Agric Food Chem* **38**, 1572-1579.
- Sporn, M.B., Newton, D.L.** (1979). Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* **38**, 2528-2534.
- Sporn, M.B., Liby, K.T.** (2005). Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat Clin Pract Oncol* **2**, 518-525.
- Sporn, M.B., Dunlop, N.M., Newton, D.L., Smith, J.M.** (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by Vitamin A and its synthetic analogs. *Fed. Proc.* **35**, 1332-1338.
- Steele, V.E., Kelloff, G.J., Balentine, D., Boone, C.W., Mehta, R., Bagheri, D., Sigman, C.C., Zhu, S., Sharma, S.** (2000). Comparative chemopreventive

- mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis* **21**, 63-67.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D.** (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* **96**, 1027-1039.
- Stone, K., Uzieblo, A., Marnett, L.J.** (1990). Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides. *Chem Res Toxicol* **3**, 467-472.
- Stopar, M., Bolcina, U., Vanzo, A., Vrhovsek, U.** (2002). Lower crop load for Cv. Jonagold apples (*Malus x domestica Borkh.*) increases polyphenol content and fruit quality. *J Agric Food Chem* **50**, 1643-1646.
- Stresser, D.M., Turner, S.D., McNamara, J., Stocker, P., Miller, V.P., Crespi, C.L., Patten, C.J.** (2000). A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). *Anal Biochem* **284**, 427-430.
- Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., Dove, W.F.** (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**, 668-670.
- Suganuma, M., Ohkura, Y., Okabe, S., Fujiki, H.** (2001). Combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 69-72.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H.** (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* **50**, 7449-7454.
- Sun, S.Y., Hail, N., Jr., Lotan, R.** (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* **96**, 662-672.
- Surh, Y.** (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* **428**, 305-327.
- Takaku, K., Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T., Taketo, M.M.** (2000). Suppression of intestinal polyposis in Apc(delta 716) knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A(2) gene. *J Biol Chem* **275**, 34013-34016.
- Talalay, P., Fahey, J.W., Holtzclaw, W.D., Prester, T., Zhang, Y.** (1995). Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett* **82-83**, 173-179.

- Torrance, C.J., Jackson, P.E., Montgomery, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Wissner, A., Nunes, M., Frost, P., Discafani, C.M.** (2000). Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat Med* **6**, 1024-1028.
- Treutter, D.** (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* **34**, 71-89.
- Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Bornet, A., Rouanet, J.M., Crozier, A., Teissedre, P.L.** (2005). The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* **94**, 170-181.
- Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., Sawamura, M.** (1997). Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)-carbonyl-3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal Biochem* **251**, 206-209.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Marzur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1-40.
- van Amsterdam, F.T., Roveri, A., Maiorino, M., Ratti, E., Ursini, F.** (1992). Lacidipine: a dihydropyridine calcium antagonist with antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* **12**, 183-187.
- Van Buren, J.** (1970). Fruit Phenolics. In *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, E. H. A. C., ed (London, U.K.: Academic Press), pp. 269-295.
- van der Logt, E.M., Roelofs, H.M., Wobbes, T., Nagengast, F.M., Peters, W.H.** (2005). High oxygen radical production in patients with sporadic colorectal cancer. *Free Radic Biol Med* **39**, 182-187.
- van der Sluis, A.A., Dekker, M., van Boekel, M.A.** (2005). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *J Agric Food Chem* **53**, 1073-1080.
- Vanzani, P., Rossetto, M., Rigo, A., Vrhovsek, U., Mattivi, F., D'Amato, E., Scarpa, M.** (2005). Major phytochemicals in apple cultivars: contribution to peroxy radical trapping efficiency. *J Agric Food Chem* **53**, 3377-3382.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., Pool-Zobel, B.L.** (2006). Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* **45**, 164-174.

- Verstraeten, S.V., Hammerstone, J.F., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I.** (2005). Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. *J Agric Food Chem* **53**, 5041-5048.
- Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., Bose, P.** (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* **49**, 5315-5321.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.** (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* **55**, 5187-5190.
- Walgren, R.A., Karnaky, K.J., Jr., Lindenmayer, G.E., Walle, T.** (2000). Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 830-836.
- Wang, D., Dubois, R.N.** (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* **55**, 115-122.
- Wasan, H.S., Novelli, M., Bee, J., Bodmer, W.F.** (1997). Dietary fat influences on polyphenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3308-3313.
- Wattenberg, L.W.** (1966). Chemoprophylaxis of carcinogenesis: a review. *Cancer Res* **26**, 1520-1526.
- Wattenberg, L.W.** (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res* **43**, 2448s-2453s.
- Wattenberg, L.W.** (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* **45**, 1-8.
- Wattenberg, L.W.** (1992). Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res* **52**, 2085s-2091s.
- WCRF.** (1997). World Cancer Research Fund. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. (Washington DC: American Institute for Cancer Research).
- Weber, J.D., Zambetti, G.P.** (2003). Renewing the debate over the p53 apoptotic response. *Cell Death Differ* **10**, 409-412.
- Wenzel, U., Herzog, A., Kuntz, S., Daniel, H.** (2004). Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics* **4**, 2160-2174.

- Weyant, M.J., Carothers, A.M., Dannenberg, A.J., Bertagnolli, M.M.** (2001). (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+ mouse. *Cancer Res* **61**, 118-125.
- Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H.** (2000). Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. *Eur Food Res Technol* **211**, 291-297.
- Williams, J.L., Kashfi, K., Ouyang, N., del Soldato, P., Kopelovich, L., Rigas, B.** (2004). NO-donating aspirin inhibits intestinal carcinogenesis in Min (APC(Min/+)) mice. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 784-788.
- Williamson, G., Manach, C.** (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 243S-255S.
- Williamson, G., Plumb, G.W., Uda, Y., Price, K.R., Rhodes, M.J.** (1996). Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. *Carcinogenesis* **17**, 2385-2387.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H.** (2003). Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* **51**, 609-614.
- Wolfram, S., Block, M., Ader, P.** (2002). Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* **132**, 630-635.
- Wong, M.A., Pignatelli, M.** (2002). Beta-catenin-a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* **60**, 389-401.
- www.cancer.gov.** National Cancer Institute, Genetics of Colorectal Cancer.
- www.criver.com.** Charles River Laboratories.
- Ye, X., Krohn, R.L., Liu, W., Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., McGinn, T.R., Bagchi, M., Preuss, H.G., Stohs, S.J., Bagchi, D.** (1999). The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem* **196**, 99-108.
- Zeßner, H.** (2005). Bioaktivitätsgeleitete Isolierung der Polyphenole des Apfelsaftes. Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften. Saarbrücken, Universität des Saarlandes.

## PUBLIKATIONSLISTE

- Briviba, K., **Pan, L.**, Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J Nutr* 132, 2814-2818.
- Pan, L.**, Becker, H., Gerhäuser, C. (2005). Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon carcinoma cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Mol Nutr Food Res*, 49, 837-843.
- Pan, L.**, Zessner, H., Will, F., Garreta, A., Klimo, K., Frank, N., Dietrich, H., Bartsch, H., Becker, H., Gerhauser, C. Natural cloudy apple juice and a polyphenol-enriched apple extract prevent intestinal adenoma formation in a genetic model for colon cancer prevention. (in Vorbereitung)
- Gerhauser, C., Zessner, H., **Pan, L.**, Klimo, K., Will, F., Knauff, J., Niewöhner, R., Frank, N., Becker, H. Potential colon cancer chemopreventive activities of phenolic constituents of apple juice. (in Vorbereitung)
- Zessner, H., **Pan, L.**, Klimo, K., Will, F., Knauff, J., Niewöhner, R., Frank, N., Becker, H., Gerhauser, C. Activity-guided fractionation of apple polyphenols for the identification of potential cancer chemopreventive agents. (in Vorbereitung)
- Zessner, H., **Pan, L.**, Klimo, K., Will, F., Knauff, J., Niewöhner, R., Frank, N., Becker, H., Gerhauser, C. Identification of oligomeric procyanidins as potential cancer chemopreventive agent by activity-guided fractionation of an apple pomace polyphenol extract. (in Vorbereitung)
- Pan, L.**, Zessner, H., Will, F., Dietrich, H., Bartsch, H., Becker, H., Gerhauser, C. Chemopreventive potential of apple juice extracts. PhD Posterpräsentation am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, Deutschland, 5. Januar 2004
- Pan, L.**, Becker, H., Bartsch, H., Gerhauser, C. Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hop, induces apoptosis in cultured 40-16 colon carcinoma cells. Posterpräsentation auf dem 18. Treffen der European Association for Cancer Research in Innsbruck, Österreich, 3.-6. Juli 2004
- Pan, L.**, Zessner, H., Will, F., Klimo, K., Steinle, R., Frank, N., Dietrich, H., Bartsch, H., Becker, H., Gerhauser, C. Natural cloudy apple juice and a polyphenol-enriched apple extract prevent adenoma formation in the *Apc<sup>Min/+</sup>* model for colon cancer prevention. Posterpräsentation und Vortrag auf der 4. jährlichen internationalen

Konferenz der American Association for Cancer Research: Frontiers in Cancer Prevention Research in Baltimore, Maryland, USA, 30. Oktober – 2. November 2005

**Pan, L.**, Will, F., Frank, N., Dietrich, H., Bartsch, H., Gerhauser, G. Natural cloudy apple juice and polyphenol-enriched apple juice extract prevent intestinal adenoma formation in the *Apc<sup>Min/+</sup>* model for colon cancer prevention. Posterpräsentation auf der 4. internationalen Konferenz Cancer Prevention in St. Gallen, Schweiz, 16.-18. Februar 2006

## DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich die Gelegenheit nutzen all jenen zu danken, die diese Arbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. C. Gerhäuser dafür bedanken, dass sie mich in die Arbeitsgruppe Chemoprävention aufgenommen und mir dieses überaus interessante Thema überlassen hat. Das mir stets entgegengebrachte Vertrauen sowie ihre zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen waren für die Durchführung und Erstellung dieser Arbeit von größtem Nutzen.

Herrn Prof. Dr. H. Bartsch danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung für Toxikologie und Krebsrisikofaktoren des DKFZ, Heidelberg durchführen zu können und für seine Unterstützung in jeder Hinsicht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Rechkemmer für das Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, die Dissertation zu betreuen und vor der Technischen Universität München zu vertreten.

Frau PD Dr. V. Somoza danke ich ganz herzlich für die spontane Übernahme des Korreferats und ihr stetes Engagement.

Herrn Prof. Dr. H. Dietrich und Herrn Dr. F. Will gebührt mein Dank für die unermüdliche Herstellung und Bereitstellung des Apfelsaftes und der polyphenolischen Apfelsaftextrakte, für die Beantwortung aller Fragen sowie für die Korrektur der Manuskripte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Becker und Frau H. Zessner für die unzähligen Fraktionen, Subfraktionen und Reinsubstanzen, die uns zwecks Testung zur Verfügung gestellt wurden und für eine außerordentlich gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern des „BMBF-Apfel-Netzwerks“ sei für eine gute und konstruktive Zusammenarbeit gedankt.

Ein großer Dank geht an Dr. C. Gerhäuser, K. Klimo, J. Knauff, und R. Niewöhner für die rastlose Testung aller Apfelfraktionen und ein perfektes Teamwork sowie die Hilfe bei allen Problemen im Labor frei nach dem Motto: „Unmögliches erledigen wir sofort – Wunder dauern etwas länger!“

Herrn G. Erben und Herrn Dr. R. W. Owen danke ich für die Procyanidanalytik.

Den Mitarbeitern um Herrn Prof. Dr. A. Gescher, Leicester, und Herrn Prof. Dr. J. Köhrle, Berlin, sei für die Hilfestellung und die wertvollen Diskussionen bei der Etablierung des *Apc<sup>Min/+</sup>* Maus Modells gedankt. In diesem Zusammenhang gebührt auch dem Boehringer Ingelheim Fond ein Dankeschön, da durch die Gewährung eines *travel grants* der Aufenthalt in Leicester finanziell ermöglicht wurde.

Eine Danksagung an alle, die mich bei der Durchführung des Tierversuchs unterstützt haben:

- S. Fössel, M. Gehring, K. Musielak und R. Wittmann aus der Barriere II für die Versorgung der Tiere während der Intervention (vor allem für die Bestimmung der Trinkmengen an vielen Wochenenden),
- E. Bertl, R. Hussong, R. Niewöhner, G. Pappa, J. Raju, und I. Weber für die unentbehrliche Mitarbeit bei den Sektionen,
- Dr. C. Ittrich und Dr. W. Rittgen für die statistische Auswertung der Daten,
- PD Dr. A. Gruber, Prof. Dr. E. Karbe und K. Rebholz für die Aufarbeitung und Befundung der histologischen Proben und
- Renate Steinle für die immunhistochemische Färbung unzähliger Schnitte.

Allen Mitarbeitern des „ehemaligen“ dritten Stocks möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Miteinander danken.

Ausgezeichnete Korrekturarbeiten verdanke ich den kritischen Blicken von R. Hussong, S. Hockemeyer, G. Pappa und I. Weber. U. Knust und I. Weber danke ich außerdem für diverse Crash Kurse in „Formatieren mit Word“. Außerdem danke ich allen (ehemaligen) „Mädels“ für viele stets offene Ohren, Ratschläge und Hilfestellungen, unzählige fachliche sowie private Gespräche, viiiiiiiiiel Spaß und dafür, dass sie mich aufgebaut und mir Mut gemacht haben, wenn’s mal nicht so lief, wie’s laufen sollte.

Der gesamten Arbeitsgruppe Chemoprävention gilt mein Dank für die freundschaftliche und unkomplizierte Zusammenarbeit und viele unvergessliche Erinnerungen an einen Tag in Mailand, Käsefondue bei Jutta, Führung durch den Heidelberger Zoo und vieles mehr.

Zutiefst dankbar bin ich meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützen, immer an mich glauben und mir bedingungsloses Vertrauen entgegenbringen sowie Sven, der mir Tag für Tag zur Seite steht, mir Rückhalt gibt und, der es immer wieder schafft mir in einem Anflug von „Weltuntergangsstimmung“ ein Lächeln zu entlocken.

# LEBENS LAUF

## **Persönliche Daten**

---

Name: Lydia Pan  
Geburtsdatum: 09. 08. 1975  
Geburtsort: Goslar  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulbildung**

---

1982 - 1986 Grundschohle Lautenthal  
1986 - 1988 Orientierungsstufe Clausthal-Zellerfeld  
1988 - 1995 Robert-Koch-Gymnasium Clausthal-Zellerfeld

## **Hochschulbildung**

---

10/1996 – 04/2002 Studium der Ernährungswissenschaften an der Justus-Liebig  
Universität Gießen  
09/1998 Vordiplomprüfung  
08/2000 – 03/2001 Diplomarbeit am Institut für Ernährungsphysiologie der  
Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE), Karlsruhe,  
Labor PD Dr. K. Briviba, Zellphysiologie und -biochemie  
Titel: Wirkung von Rotwein und polyphenolischen  
Rotweininhaltsstoffen auf die Proliferation und  
Signaltransduktion von Kolonkarzinomzellen  
04/2002 Diplomprüfung, Abschluss: Diplom-Oecotrophologin

## **Promotion**

---

08/2002 – 12/2005 Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg  
(DKFZ), Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren,  
Arbeitsgruppe Chemoprävention, Dr. C. Gerhäuser  
Titel: Charakterisierung des darmkrebspräventiven Potenzials  
von Apfelsaft und polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen *in vitro* und *in vivo*