

**Untersuchungen zum Einfluss von Ferulasäure
auf zelluläre Mechanismen
der Kolonkarzinogenese und Tumorprogression
mit einem Zellkulturmodell (HT29 Klon 19A)**

Anja Osterhues

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. G. Rechkemmer
Universität Karlsruhe (TH)
2. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 17.12.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.04.2008 angenommen.

Meiner Familie

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III	TABELLENVERZEICHNIS	VI
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Kolorektales Karzinom	1
1.1.1	Vorkommen und Häufigkeit.....	1
1.1.2	Kolonkarzinogenese.....	1
1.1.2.1	Molekularbiologische Mechanismen	2
1.1.2.2	Ernährung und sonstige Einflussfaktoren	4
1.2	Phenolsäuren	8
1.2.1	Struktur, Biosynthese und Vorkommen.....	8
1.2.2	Bioverfügbarkeit, Absorption und Metabolisierung.....	11
1.2.3	Allgemeine Wirkungen und Funktionen bei der Kolonkarzinogenese	15
1.2.3.1	Antioxidative Wirkung	15
1.2.3.2	Antikarzinogene Wirkung	16
1.2.3.3	Antiinflammatorische Wirkung	18
1.3	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.2	Antikörper.....	22
2.1.3	Synthetische Oligonukleotid-Primer	23
2.1.4	Sonstige Materialien und Verbrauchsmittel.....	23
2.1.5	Geräte und Zubehör.....	24

2.1.6	Software und Datenbanken.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.1.1	Charakteristika der verwendeten Zelllinie HT29 Klon 19A.....	27
2.2.1.2	Kultivierung und Konservierung	28
2.2.1.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	29
2.2.2	Stabilitätsmessung mittels HPLC	29
2.2.3	Zytotoxizitätsmessung mittels MTT-Test.....	30
2.2.4	Durchflusszytometrische Apoptosemessung mittels Annexin V.....	31
2.2.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE und 2D-DIGE).....	33
2.2.5.1	Induktion mit Ferulasäure	33
2.2.5.2	Zellernte	33
2.2.5.3	Probenaufarbeitung	34
2.2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	35
2.2.5.5	Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung).....	35
2.2.5.6	Herstellung von SDS-Gelen für die zweite Dimension.....	37
2.2.5.7	Zweite Dimension	38
2.2.5.8	Proteindetektion (Färbung, Fluoreszenzmarkierung).....	39
2.2.5.9	Softwaregestützte Auswertung der Gele	42
2.2.6	Massenspektrometrie.....	45
2.2.6.1	Enzymatischer Verdau der Proteine	45
2.2.6.2	Analyse der Peptidextrakte mittels LC-ESI-MS/MS	47
2.2.7	Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.2.7.1	Induktion mit Ferulasäure	49
2.2.7.2	Probenaufarbeitung	49
2.2.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	51
2.2.7.4	Elektrophoretische Auftrennung.....	52
2.2.8	Western Blot	53
2.2.8.1	Proteinnachweis auf der Membran	54
2.2.8.2	Strippen von Membranen	55
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Real Time-Modus.....	55

2.2.9.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	55
2.2.9.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	55
2.2.9.3	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	56
2.2.9.4	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	57
2.2.9.5	Real Time-PCR.....	57
2.2.10	Indirekte Immunfluoreszenz	58
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	Stabilität von Ferulasäure unter Zellkulturbedingungen	60
3.2	Zytotoxizität von Ferulasäure	61
3.3	Apoptoseinduktion durch Ferulasäure.....	63
3.4	Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen.....	65
3.4.1	Etablierung einer geeigneten proteomanalytischen Durchführung.....	66
3.4.2	Proteomanalyse mittels 2D-PAGE	68
3.4.3	Proteomanalyse mittels 2D-DIGE	71
3.5	Untersuchung der ferulasäurevermittelten Proteinregulation am Beispiel von Annexin II, Annexin IV und Ezrin	74
3.5.1	Ferulasäurevermittelte Effekte auf die Proteinexpression ausgewählter Proteine mittels Western Blot-Analyse.....	75
3.5.2	Ferulasäurevermittelte Effekte auf die Genexpression ausgewählter Zielgene mittels Real Time-PCR-Analyse	78
3.5.3	Ferulasäurevermittelte Wirkung am Beispiel von Annexin II	79
3.5.3.1	Einfluss von Ferulasäure auf die Solubilisierung von Annexin II.....	80
3.5.3.2	Einfluss von Ferulasäure auf die Lokalisation von Annexin II in HT29 Klon 19A-Zellen.....	82
4	DISKUSSION	86
4.1	Stabilität von Ferulasäure unter Zellkulturbedingungen	86
4.2	Zytotoxische, antiproliferative, proapoptotische Effekte von Ferulasäure.....	87

4.3	Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen	90
4.3.1	Verwendete Ferulasäurekonzentrationen und Inkubationszeiten.....	90
4.3.2	Proteomanalytische Durchführung	91
4.3.3	Ferulasäureregulierte Proteine.....	93
4.4	Untersuchung der ferulasäurevermittelten Proteinregulation am Beispiel von Annexin II, Annexin IV und Ezrin	97
4.4.1	Ferulasäurevermittelte Regulation von Annexin II, Annexin IV und Ezrin auf Expressionsebene.....	100
4.4.2	Einfluss von Ferulasäure auf die Lokalisation und Solubilisierung von Annexin II	101
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	SUMMARY	108
7	LITERATURVERZEICHNIS	109

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese am Beispiel der Adenom-Karzinom-Sequenz	2
Abb. 2: Chemische Struktur der am häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren	9
Abb. 3: Chemische Struktur nativer Diferulasäuren.....	11
Abb. 4: Stabilität von Ferulasäure unter Standardzellkulturbedingungen	61
Abb. 5: Einfluss von Ferulasäure auf die Vitalität von HT29 Klon 19A-Zellen	62
Abb. 6: Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse von Annexin V-FITC/PI-gefärbten HT29 Klon 19A-Zellen.....	63
Abb. 7: Einfluss von Ferulasäure auf die Apoptoseinduktion in HT29 Klon 19A-Zellen	64
Abb. 8: HT29 Klon 19A-Proteom nach Silberfärbung und nach kolloidaler CBB-Färbung von 2D-PAGE-Gelen	67
Abb. 9: FS-regulierte Proteine im HT29 Klon 19A-Proteom nach 2D-PAGE	69
Abb. 10: FS-regulierte Proteine im HT29 Klon 19A-Proteom nach 2D-DIGE	72
Abb. 11: Lokalisation ausgewählter FS-regulierter Proteine im 2D-PAGE-Gel.....	74
Abb. 12: Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von FS auf die Proteinexpression von Anx II, Anx IV und Ezrin (Western Blot)	76
Abb. 13: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von FS auf die Proteinexpression von Anx II, Anx IV und Ezrin (Western Blot)	77
Abb. 14: Einfluss von FS auf die mRNA-Spiegel von Anx II, Anx IV und Ezrin	79
Abb. 15: Immunodetektion von Anx II im gesamten 2D-PAGE-Gel.....	81
Abb. 16: Immunfluoreszenz von Anx II in unbehandelten und FS-inkubierten HT29 Klon 19A-Zellen.....	83
Abb. 17: Immunodetektion von Anx II nach Zellfraktionierung von unbehandelten und FS-inkubierten HT29 Klon 19A-Zellen.....	84

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Elutionsgradient für die HPLC.....	29
Tab. 2: Protokoll der ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung)	36
Tab. 3: Zusammensetzung von 12,5 %igen SDS-Gelen (Ansatz für 13 Gele).....	37
Tab. 4: Laufbedingungen der zweiten Dimension	39
Tab. 5: Protokoll der Silberfärbung nach Shevchenko	40
Tab. 6: Verwendete Parameter für den Fluoreszenzscan (<i>Typhoon Trio+</i>).....	43
Tab. 7: Elutionsgradient für die LC/MS	47
Tab. 8: Geräteparameter LC-ESI-MS/MS	48
Tab. 9: Verwendete Antikörperkonzentrationen für Western Blot.....	54
Tab. 10: Protokoll der RT-PCR.....	57
Tab. 11: Protokoll der Real Time-PCR	58
Tab. 12: Verwendete Antikörper/Fluorochrome in der indirekten Immunfluoreszenz	59
Tab. 13: Verwendete Filter für die Fluorochromdetektion (<i>Axioskop 40 FL</i>).....	59
Tab. 14: Übersicht über die FS-regulierten Proteine von HT29 Klon 19A-Zellen nach 2D-PAGE	70
Tab. 15: Übersicht über die FS-regulierten Proteine von HT29 Klon 19A-Zellen nach 2D-DIGE.....	73

IV Abkürzungsverzeichnis

(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
2D-DIGE	Zweidimensionale Differenzielle Gelelektrophorese
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
A	Adenosin
Å	Angström
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AgNO ₃	Silbernitrat
AICR	<i>American Institute of Cancer Research</i>
Anx	Annexin
Anx ₂ /p11 ₂	heterotetramer Komplex zwischen Annexin II und p11
AOM	Azoxymethan
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua pur.	entmineralisiertes Wasser
Aqua _{MS}	Wasser für die MS, <i>ultra resi-analysed</i>
Aqua _{PCR}	Wasser für die Molekularbiologie
Av.	durchschnittlich (<i>average</i>)
BisAA	Bisacrylamid
BP	Bandpass-Filter
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
bzgl.	bezüglich
C	Cytidin
C ₂ H ₃ NaO ₂	Natriumacetat
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
COX	Zyklooxygenase (<i>cyclooxygenase</i>)
CT	Schwellenwert-Zyklus (<i>Threshold Cycle</i>)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure (<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>)
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
EtOH	Ethanol

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FS	Ferulasäure
FT	Strahlteiler (<i>Fluorescence Threshold</i>)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma</i>)
HPFS	<i>Health Professionals Follow-Up Study</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
i. d. R.	in der Regel
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LP	Tiefpass-Filter (<i>Low Pass Filter</i>)
M	molar
mA	Milliampere
MCT	Monokarbonsäuretransporter (<i>Monocarboxylic Acid Transporter</i>)
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MP	Milchpuffer
M _r	relative Masse
MS	Massenspektrometrie; Massenspektrometer
MW	Molekulargewicht (<i>Molecular Weight</i>)
MW	Mittelwert
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	Natriumthiosulfat-Pentahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NL	nicht linear
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
Nr.	Nummer

NHS	<i>Nurses' Health Study</i>
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBS ⁻	PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
PBS ⁺	PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
psi	<i>pound per square inch</i> ; 1 bar = 14,5 psi
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	relativ
rev	revers, für <i>antisense</i> -Primer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sc	Sequenzabdeckung (<i>Sequence Coverage</i>)
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
seq	Sequenz, für <i>sense</i> -Primer
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Trispuffer-Tween (<i>Tris Buffered Saline Tween</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehung
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i>
µA	Mikroampere
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM; µmol/l	mikromolar

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Vorkommen und Häufigkeit

Das kolorektale Karzinom¹ stellt weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung dar, wobei sein Auftreten überwiegend auf Wohlstandsgesellschaften beschränkt ist [Stewart & Kleihues, 2003; Parkin *et al.*, 2005]. Allein in Europa erkrankten im Jahr 2004 über 375.000 Menschen an Kolorektalkrebs. Über 200.000 Menschen starben an den Folgen ihrer Erkrankung, was ungefähr zwölf Prozent aller krebsbedingten Todesfälle entspricht [Boyle & Ferlay, 2005]. In Deutschland zählt das Kolorektalkarzinom nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen zu der häufigsten Krebstodesursache. Im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer EU-Länder steht die Inzidenz in Deutschland für Frauen an erster Stelle, für Männer an vierter Stelle. Generell ist Darmkrebs eine Alterserkrankung mit der höchsten altersspezifischen Inzidenz bei den über 80-85 Jährigen [GEKID, 2006].

1.1.2 Kolonkarzinogenese

Die Mehrzahl aller Kolorektalkarzinome entsteht sporadisch. Weniger als 10 % der kolorektalen Tumoren sind auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen [Kitisin & Mishra, 2006; Souglakos, 2007]. Bei der Entwicklung von Darmkrebs spielen v. a. Lebensstilfaktoren, insbesondere die Ernährung, eine wichtige Rolle [Willett, 2001]. Der Entstehung liegen komplexe biologische Prozesse zugrunde. Durch Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen und klonaler Expansion der initiierten Zellen kommt es zu einer autonomen, progressiven und überschießenden Proliferation des Darmepithels. Dies führt letztlich zur Ausbildung eines Adenoms und schließlich zum Karzinom. Es dauert meist Jahrzehnte bis sich eine kritische Anzahl solcher genetischen und epigenetischen Ereignisse in einer Zelle angehäuft

¹ Das kolorektale Karzinom bezeichnet Tumoren des Kolons (Dickdarms) und des Rektums (Mastdarms).

hat. Dies stimmt mit der altersspezifischen Inzidenz für Darmkrebs überein [Gryfe *et al.*, 1997].

Im Folgenden sollen die Mechanismen der Kolonkarzinogenese sowie beeinflussende Faktoren näher beleuchtet werden.

1.1.2.1 Molekularbiologische Mechanismen

Im Jahre 1990 wurde von Fearon und Vogelstein ein Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese entwickelt, die sog. Adenom-Karzinom-Sequenz (s. Abb. 1). Dieses Modell beschreibt die Kolonkarzinogenese als einen mehrstufigen Prozess, bei dem die Akkumulation genetischer Veränderungen zum selektiven Wachstumsvorteil einer Zelle und über benigne Vorstufen letztendlich zur Ausbildung eines invasiven Karzinoms führt. Beteiligte Gene sind u. a. *APC*, *DCC*, *k-ras* und *p53* [Fearon & Vogelstein, 1990]. Inzwischen ist bekannt, dass neben genetischen Veränderungen auch epigenetische Ereignisse eine entscheidende Rolle bei der Darmkrebsentstehung spielen. Diese äußern sich in einem veränderten Methylierungsmuster bestimmter DNA-Abschnitte und können zum Verlust der Genfunktion führen [Shen & Issa, 2002].

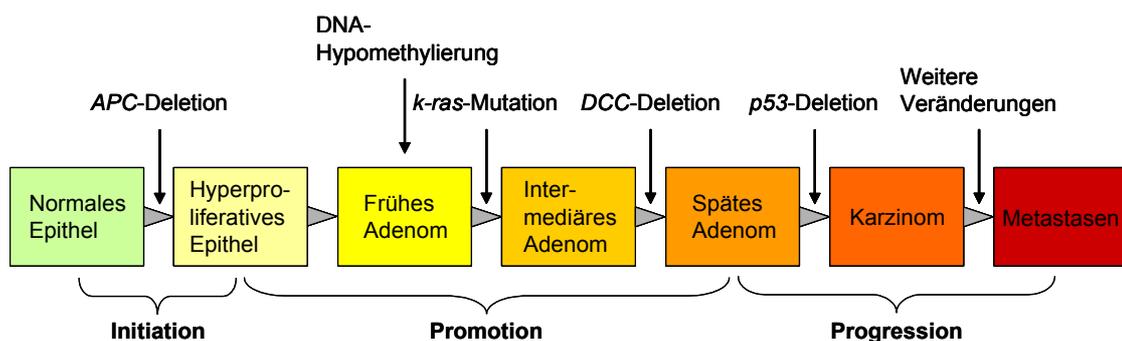


Abb. 1: Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese am Beispiel der Adenom-Karzinom-Sequenz

In der Initiationsphase der Kolonkarzinogenese kommt es zu einer Schädigung der DNA durch karzinogene Noxen. Sofern diese genetischen Veränderungen durch zelleigene Abwehrmechanismen nicht behoben werden, wird die irreversible Mutation an die nachfolgende Tochtergeneration weitergegeben. Die initiierte Epithelzelle kann sich der Zellzykluskontrolle entziehen und hyperproliferieren. Dabei bilden sich zunächst benigne Adenome aus (Promotion). Die Progressionsphase ist von weiteren genetischen Veränderungen gekennzeichnet und führt schließlich zu einer zunehmenden Entdifferenzierung der Zelle und zur Entstehung von Karzinomen. Durch zunehmende Autonomie kann sich ein invasiver Tumor mit der Fähigkeit zur Metastasierung entwickeln. Modifiziert nach [Fearon & Vogelstein, 1990].

Keimbahnmutationen führen zu hereditären Formen des Kolorektalkarzinoms; eine Anhäufung von somatischen Mutationen resultiert in einer sporadischen Form von Darmkrebs [Souglakos, 2007].

Von zentraler Bedeutung für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind genetische und/oder epigenetische Veränderungen in bestimmten Protoonkogenen, Tumorsuppressorgen sowie DNA-Reparaturgenen.

Protoonkogene kodieren für Proteine, die in Zellwachstum und -differenzierung eingebunden sind. Mutierte Protoonkogene, sog. Onkogene, führen zu einem verstärkten Zellwachstum. Ein wichtiger Vertreter dieser Familie ist *k-ras*. Mutationen im *k-ras*-Gen finden sich bei etwa 40 % aller kolorektalen Karzinome [Forrester *et al.*, 1987].

Tumorsuppressorgene sind in der Lage die Zellproliferation zu inhibieren und damit die Tumorentstehung zu unterbinden. Im Gegensatz zu den Onkogenen, die i. d. R. dominant wirken, verhalten sich Tumorsuppressorgene normalerweise rezessiv. Das heißt, beide Allele des Suppressorgens müssen durch Mutation, Deletion, Insertion oder durch epigenetische Mechanismen inaktiviert sein, damit eine Veränderung in der Genfunktion sichtbar wird [Vogelstein & Kinzler, 2004]. Beispiele für Tumorsuppressorgene sind *APC*- und *DCC*-Gene, *p53* und verschiedene *SMAD*-Gene².

Mutationen im *APC*-Gen (Chromosom 5q) sind verantwortlich für die Entstehung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), kommen aber auch in 30-70 % der sporadischen Kolonkarzinome vor [Nagase & Nakamura, 1993; Takayama *et al.*, 2006]. *APC*-Mutationen konnten bereits in frühen Läsionen nachgewiesen werden und stellen daher ein frühzeitiges Ereignis innerhalb der Adenom-Karzinom-Sequenz dar [Powell *et al.*, 1992].

60-80 % aller Kolonkarzinome weisen einen Verlust des langen Arms von Chromosom 18q auf. Neben der Lokalisation von *DCC* konnten mittlerweile auch die Tumorsuppressorgene *SMAD2* und *SMAD4* auf Chromosom 18 identifiziert werden [Eppert *et al.*, 1996]. Diese Art der Deletion ereignet sich meist nach Mutationen im *APC*-Gen bzw. in *k-ras*. Sie tritt jedoch häufig vor *p53*-Mutationen auf.

Das Gen *p53* ist auf dem Chromosom 17p lokalisiert und stellt das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen in verschiedenen Typen maligner Tumoren dar.

² *SMAD*-Proteine sind Homologe des *Drosophila*-Proteins, *mothers against decapentaplegic* (*MAD*) und des *C. elegans*-Proteins *SMA*. Die Bezeichnung ergibt sich aus der Kombination der beiden Proteinnamen.

Normalerweise induziert p53 DNA-Reparatur-Mechanismen über einen G1-Zellzyklusarrest oder fördert die Apoptoseinduktion. Mutationen im *p53*-Gen treten im Allgemeinen beim Übergang vom Adenom zum Karzinom auf und repräsentieren damit ein relativ spätes Ereignis in der Kolonkarzinogenese [Takayama *et al.*, 2006]. 75 % aller Kolonkarzinome sind durch einen Verlust von *p53* charakterisiert [Baker *et al.*, 1989].

Auf Grund von Mutationen in DNA-Reparaturgenen können diese keine fehlerfreie DNA-Replikation mehr gewährleisten. Ebenso kann durch eine aberrante Methylierung die Expression von DNA-Reparaturgenen vermindert werden [Jubb *et al.*, 2001]. Dies führt mitunter zu genetischen Veränderungen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen [Gryfe *et al.*, 1997]. DNA-Reparaturgene spielen nach dem heutigen Stand der Forschung im sporadischen Kolorektalkarzinom nur eine untergeordnete Rolle, sind jedoch von großer Wichtigkeit beim hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC). Ursache für die HNPCC-Entstehung ist eine Mikrosatelliteninstabilität auf Grund eines defekten DNA-Mismatch-Reparatursystems [Jass, 2006].

1.1.2.2 Ernährung und sonstige Einflussfaktoren

Die Ausbildung eines Tumors ist ein langjähriger multifaktorieller Prozess. Inzwischen ist bekannt, dass für die Krebsentstehung weniger eine genetische Prädisposition als vielmehr Umwelt- und Lebensstilfaktoren verantwortlich sind. Neben Tabakkonsum kommt dabei der Ernährung auf Grund ihrer komplexen Interaktion mit vielen Stoffwechselprozessen und ihrer Fähigkeit pathophysiologische Mechanismen der Kanzerogenese zu beeinflussen eine herausragende Bedeutung zu. Während bestimmte Nahrungsmittel bzw. deren Bestandteile protektive Effekte ausüben können, wirken andere potenziell kanzerogen [Willett, 2001].

Schätzungen ergaben, dass etwa 70 % aller kolorektalen Karzinome durch Ernährungsintervention vermieden werden könnten [Stewart & Kleihues, 2003]. Die epidemiologische Beweislage für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Darmkrebsentstehung weist allerdings noch viele Lücken auf.

In dem folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten Risikofaktoren und protektiven Faktoren diskutiert werden.

Risikofaktoren:

Es gibt zahlreiche Hinweise aus epidemiologischen Studien, dass ein hoher Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch das Risiko für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen erhöhen kann [Norat & Riboli, 2001; Matos & Brandani, 2002; Biesalski, 2002; Norat *et al.*, 2005]. In diesem Zusammenhang scheinen *N*-Nitroso-Verbindungen eine wichtige Rolle zu spielen. *N*-Nitroso-Verbindungen sind in gepökelten und geräucherten Fleischwaren zu finden, entstehen aber auch durch endogene Bildung beim Verzehr von rotem Fleisch. Fleisch, das bei hohen Temperaturen gebraten bzw. gegrillt wird, enthält zudem eine Reihe weiterer Mutagene wie z. B. heterozyklische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [Cross & Sinha, 2004]. Der *World Cancer Research Fund* (WCRF) und das *American Institute of Cancer Research* (AICR) empfehlen daher die wöchentliche Aufnahme von 500 g rotem Fleisch nicht zu überschreiten [WCRF/AICR, 2007].

Es besteht eine überzeugende Evidenz für eine dosisabhängige Beziehung zwischen dem Alkoholkonsum und der Darmkrebsentstehung. Die Aufnahme von mehr als 30 g Ethanol durch den Konsum alkoholhaltiger Getränke ist mit einem erhöhten Kolorektalkrebsrisiko assoziiert [WCRF/AICR, 2007]. Wird Ethanol verstoffwechselt, entstehen reaktive Metabolite wie Azetaldehyd, die karzinogen wirken können. Zudem könnte Alkohol als Lösungsmittel das Eindringen anderer Karzinogene in die Mukosazelle fördern [WCRF/AICR, 2007].

Faktoren wie ein hoher BMI, abdominale Fettleibigkeit und der Verzehr von zu viel tierischem Fett werden ebenfalls im Zusammenhang mit einem erhöhten Kolorektalkrebsrisiko diskutiert [WCRF/AICR, 2007].

Auch ein hoher Zuckerkonsum ist vermutlich mit einem gesteigerten Risiko verbunden [WCRF/AICR, 2007]. Häufige Zwischenmahlzeiten, die viel Saccharose enthalten, beispielsweise Kuchen und Desserts, können zur Entstehung von Kolorektalkarzinomen beitragen [Giovannucci, 2003].

Protektive Faktoren:

In vielen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Obst- und Gemüseverzehr und dem Darmkrebsrisiko untersucht. Die überwiegende Mehrheit dieser Studien zeigte eine inverse Assoziation zwischen der Höhe des Gemüse- und/oder Obstkonsums und dem Risiko Kolorektalkarzinome zu entwickeln. Die Evaluierung durch den WCRF/AICR ergab, dass zwar eine überzeugende Evidenz besteht, die Ergebnisse zum protektiven Einfluss von Obst und Gemüse jedoch nicht einheitlich sind [WCRF/AICR, 2007]. Eine von Riboli und Norat publizierte Metaanalyse veranschaulicht, dass letztendlich nur Fall-Kontroll-Studien eine signifikante Assoziation zwischen dem Obst- und Gemüseverzehr und einem verringerten Kolorektalkrebsrisiko aufzeigen konnten. Allerdings wird vermutet, dass die Wirkung eines hohen Obst- und Gemüsekonsums in prospektiven Studien häufig unterschätzt wird v. a. aus Gründen einer begrenzten Variabilität in der Nahrungsaufnahme innerhalb einer Kohorte [Riboli & Norat, 2003]. Vorläufige Ergebnisse der EPIC-Studie bestätigen die protektiven Effekte von Gemüse und/oder Obst. Es wird geschätzt, dass der tägliche Verzehr von 500 g Obst und Gemüse die Inzidenz für Darmkrebs um etwa 25 % reduzieren kann [Bueno-de-Mesquita *et al.*, 2002].

Für die krebsschutzende Wirkung eines hohen Verzehrs an Obst und Gemüse werden darin enthaltene potenziell antikarzinogene Bestandteile verantwortlich gemacht. Zu ihnen gehören neben Ballaststoffen, Vitamin C und E sowie Selen die sekundären Pflanzenstoffe [Steinmetz & Potter, 1991].

Die molekularen Mechanismen einer möglichen Krebsprävention durch Obst und Gemüse werden am Beispiel der Phenolsäuren in Kap. 1.2.3 beschrieben.

Wie bereits erwähnt, wird ein hoher Verzehr von Ballaststoffen im Zusammenhang mit einem verminderten Risiko für die Entstehung von kolorektalen Krebserkrankungen diskutiert [Marlett *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003]. Erste Ergebnisse der EPIC-Studie zeigen, dass das Kolorektalkrebsrisiko durch eine doppelt so hohe Ballaststoffaufnahme um bis zu 40 % gesenkt werden kann [Bingham *et al.*, 2003].

Nach der Definition der *American Association of Cereal Chemists* (AACC) sind Ballaststoffe essbare Pflanzenbestandteile oder analoge Kohlenhydrate³, die im Dünndarm nicht verdaut und absorbiert werden können, im Dickdarm jedoch vollständig oder teilweise fermentiert werden [DeVries, 2003].

Der präventive Effekt von Ballaststoffen auf das Kolorektalkrebsrisiko wird u. a. auf eine beschleunigte Darmassage, eine erhöhte Wasserbindungskapazität und eine Erhöhung des Stuhlvolumens zurückgeführt. Dadurch verweilen potenziell karzinogene Substanzen kürzer im Darmlumen und werden stärker verdünnt [Gazzaniga & Lupton, 1987]. Die gesteigerte Fermentation bewirkt zudem eine erhöhte Konzentration kurzkettiger Fettsäuren. Es konnte gezeigt werden, dass Butyrat die Zellproliferation von Tumorzellen inhibiert und Apoptoseprozesse induziert. Eine erhöhte Konzentration an Butyrat und Propionat führt zusätzlich zu einer Senkung des pH-Werts. Dies reduziert die Umsetzung von primären zu sekundären Gallensäuren. Damit wird die Löslichkeit der sekundären Gallensäuren, die mögliche Risikofaktoren darstellen, vermindert [Bingham *et al.*, 2003].

Inzwischen ist jedoch umstritten, ob Ballaststoffe generell einen protektiven Einfluss auf die Kolonkarzinogenese nehmen. Zweifel ergeben sich daraus, dass Ballaststoffe verschiedene Bestandteile umfassen, die unterschiedliche physiologische Effekte besitzen [Favre & Bonithon-Kopp, 2002]. Zudem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Ballaststoffe diverse bioaktive Substanzen enthalten, die für die krebspräventive Wirkung mitverantwortlich sein können. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist Ferulasäure, eine Hydroxymitsäure, die mit bestimmten Polysacchariden von Getreidezellwänden konjugiert ist (s. Kap. 1.2.1) [Rondini *et al.*, 2004; Ferguson, 2005].

Es gilt als sehr wahrscheinlich, dass körperliche Aktivität einen bedeutenden präventiven Effekt auf die Entstehung von Darmkrebs hat. Zahlreiche Studien konnten eine inverse Assoziation zwischen körperlicher Bewegung und dem Kolonkrebsrisiko aufzeigen [Colditz *et al.*, 1997; Friedenreich & Orenstein, 2002; Berglund, 2002]. Durch hohe körperliche Aktivität lässt sich die Inzidenz um etwa 30-50 % reduzieren [Giovannucci, 2003].

³ Analoge Kohlenhydrate entsprechen chemisch den natürlich vorkommenden Kohlenhydraten; sie entstehen durch chemische oder physikalische Prozesse (z. B. Hitzeeinwirkung). Zu ihnen gehören unverdauliche Dextrine, resistente Stärke und verschiedene synthetisch hergestellte Kohlenhydrate.

Auch Kalzium und Vitamin D scheinen einen moderat protektiven Effekt im Zusammenhang mit Darmkrebs auszuüben [Lipkin *et al.*, 1999]. Bei zwei großen prospektiven Kohortenstudien, der NHS und der HPFS, wurde eine inverse Korrelation zwischen einer höheren Kalziumaufnahme (bis 700 mg/Tag) und dem Risiko für distalen Kolonkrebs festgestellt [Wu *et al.*, 2002].

Als präventive Faktoren werden des Weiteren Mikronährstoffe diskutiert, die entweder an Vorgängen wie DNA-Methylierung, -Synthese bzw. -Reparatur beteiligt sind (beispielsweise Folsäure und Methionin) oder antioxidative Eigenschaften besitzen (z. B. Selen, Vitamin E und C) [Kune & Watson, 2006].

1.2 Phenolsäuren

1.2.1 Struktur, Biosynthese und Vorkommen

Phenolsäuren sind phenolische Verbindungen und bilden mit weiteren Substanzklassen wie z. B. Flavonoiden und Stilbenen die heterogene Stoffgruppe der Polyphenole. Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen. Unter diesem Begriff werden eine Reihe chemisch sehr unterschiedlicher Substanzen zusammengefasst, die – anders als primäre Pflanzenprodukte wie Kohlenhydrate, Lipide und Proteine – im sekundären Stoffwechsel von Pflanzen gebildet werden. Sekundäre Pflanzenstoffe erfüllen zahlreiche Funktionen in der Pflanze und dienen u. a. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge, Krankheiten und UV-Licht, als Wachstumsregulatoren sowie als Farbstoffe. Darüber hinaus werden sekundären Pflanzenstoffen vielfältige pharmakologische Effekte zugeschrieben.

Phenolsäuren lassen sich in Hydroxyzimtsäuren (C_6-C_3) und Hydroxybenzoesäuren (C_6-C_1) einteilen, wobei sich die jeweiligen Derivate in ihrem Hydroxy- bzw. Methoxymuster im aromatischen Ring unterscheiden (s. Abb. 2). Phenolsäuren kommen ubiquitär und in teilweise beträchtlichen Konzentrationen in pflanzlichen Lebensmitteln vor. Hydroxybenzoesäuren sind dagegen meist in nur geringen Mengen enthalten. Die wichtigsten Vertreter der Hydroxyzimtsäuren sind p-Kumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure. Ihre Bildung erfolgt in der Pflanze aus

Phenylalanin oder Tyrosin im Zuge des Shikimisäure-Weges [Bourne & Rice-Evans, 1998]. Hydroxyzimtsäuren kommen in wasserlöslicher Form im Zytoplasma vor, als lipidlösliche Komponenten in der Wachsschicht auf der Oberfläche der Pflanze sowie kovalent an pflanzliche Zellwände gebunden [Chesson *et al.*, 1999]. Dabei liegen sie selten in freier Form vor, sondern vorwiegend als Ester, z. B. von organischen Säuren wie China- und Weinsäure, als Amide oder als Glykoside [Clifford, 1999]. Häufige Hydroxybenzoesäuren sind Protokatechusäure, Gallussäure, Vanillinsäure und Syringasäure. Während Gallussäure mit Chinasäure oder Katechinen verestert ist bzw. als Kondensationsprodukt dieser Verbindungen vorliegt, bilden die anderen Hydroxybenzoesäuren Glykoside aus [Radtke *et al.*, 1998].

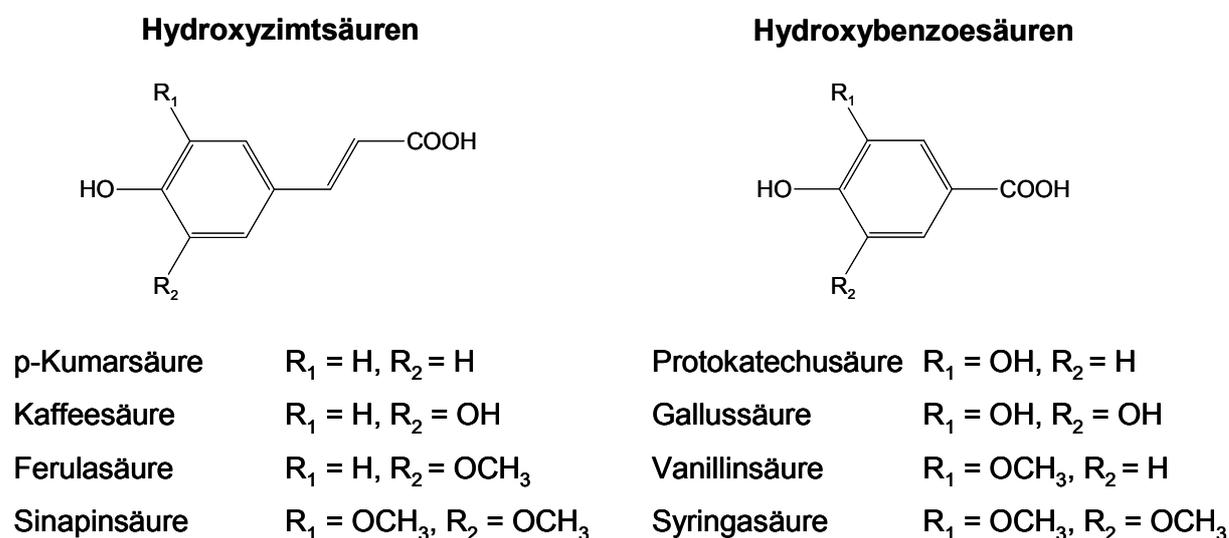


Abb. 2: Chemische Struktur der am häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren

Phenolsäuren tragen zu etwa einem Drittel zur Gesamtphenolzufuhr bei. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Phenolsäuren im Rahmen einer gemischten Kost beträgt ungefähr 200-300 mg [DGE, 2004].

Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) und Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure bzw. Kaffeesäure-3-methylether) sind die in pflanzlicher Nahrung am häufigsten vorkommenden Phenolsäuren. In der Pflanze entsteht Ferulasäure durch Methylierung von Kaffeesäure. Kaffeesäure wird aus p-Kumarsäure entweder direkt aus Tyrosin oder über das Zwischenprodukt Zimtsäure aus Phenylalanin gebildet.

Kaffeesäure liegt in hoher Konzentration in Kaffee vor. Ester von Kaffeesäure und Chinasäure bilden die gut lösliche Chlorogensäure, welche in vielen Früchten und in großer Menge in Kaffee zu finden ist. Eine Tasse Kaffee enthält etwa 25-75 mg Kaffeesäure bzw. 50-150 mg Chlorogensäure. Bei hohem Kaffeekonsum können pro Tag bis zu 1 g dieser Säuren aufgenommen werden [Watzl & Rechkemmer, 2001].

Ferulasäure kommt ubiquitär in Pflanzen vor. Sie stellt die häufigste Hydroxycinnamsäure in Getreide dar und ist hauptsächlich in der äußeren Schicht bzw. der Schale des Getreidekorns, der sog. Kleie, zu finden. Während Weizenkleie eine durchschnittliche Ferulasäuremenge von 5 g/kg enthält, beträgt der Gehalt in Vollkornweizen 500 mg/kg, in niedrig ausgemahlenem Mehl nur noch 50 mg/kg [Watzl & Rechkemmer, 2001]. Menschen mit einem hohen Verzehr an Getreideprodukten können täglich mehr als 100 mg Ferulasäure aufnehmen [Kroon & Williamson, 1999]. Weitere pflanzliche Lebensmittel, die vergleichsweise größere Mengen an Ferulasäure enthalten, sind z. B. Beeren und Zitrusfrüchte, verschiedene Gemüsesorten wie Tomaten und Spargel sowie Kaffee [Herrmann, 1989; Graf, 1992; Manach *et al.*, 2004].

In der pflanzlichen Zellwand ist Ferulasäure kovalent an Mono- und Disaccharide, verschiedene Polysaccharide, Glykoproteine, Polyamine, Lignin sowie an Hydroxyfettsäuren in Suberin und Kutin gebunden [Graf, 1992; Bourne & Rice-Evans, 1998]. 98 % der Gesamtmenge an Ferulasäure sind in der Aleuronschicht und dem Perikarp eines Weizenkorns lokalisiert, wobei der größte Teil an Arabinoseeinheiten der Arabinoxylane in den Zellwänden gebunden ist. Etwa 10 % der Ferulasäuremenge in Weizenkleie liegen in Form der löslichen freien Säure vor [Manach *et al.*, 2004].

Durch Dimerisierung zweier Ferulasäuremoleküle bilden sich in Getreide Brückenstrukturen zwischen benachbarten Arabinoxylanen und Lignin aus. Überwiegend geschieht dies durch radikalische Kopplung und führt zur Bildung 8-5', 8-8', 8-O-4', 4-O-5'- und 5-5'-gekoppelter Diferulasäuren, die in der Zellwand zu Dehydroferulasäureestern reagieren [Ralph *et al.*, 1994; Bunzel & Steinhart, 2003].

Abb. 3 gibt einen Überblick über die in Getreide vorkommenden Diferulasäuren. Die Ausbildung von Dehydrodimeren hat Auswirkung auf den Vernetzungsgrad und damit auf die Zellwandstabilität. Dies beeinflusst möglicherweise auch die Löslichkeit sowie die mikrobielle Fermentierbarkeit dieser Polysaccharide im menschlichen Dickdarm [Bunzel & Steinhart, 2003].

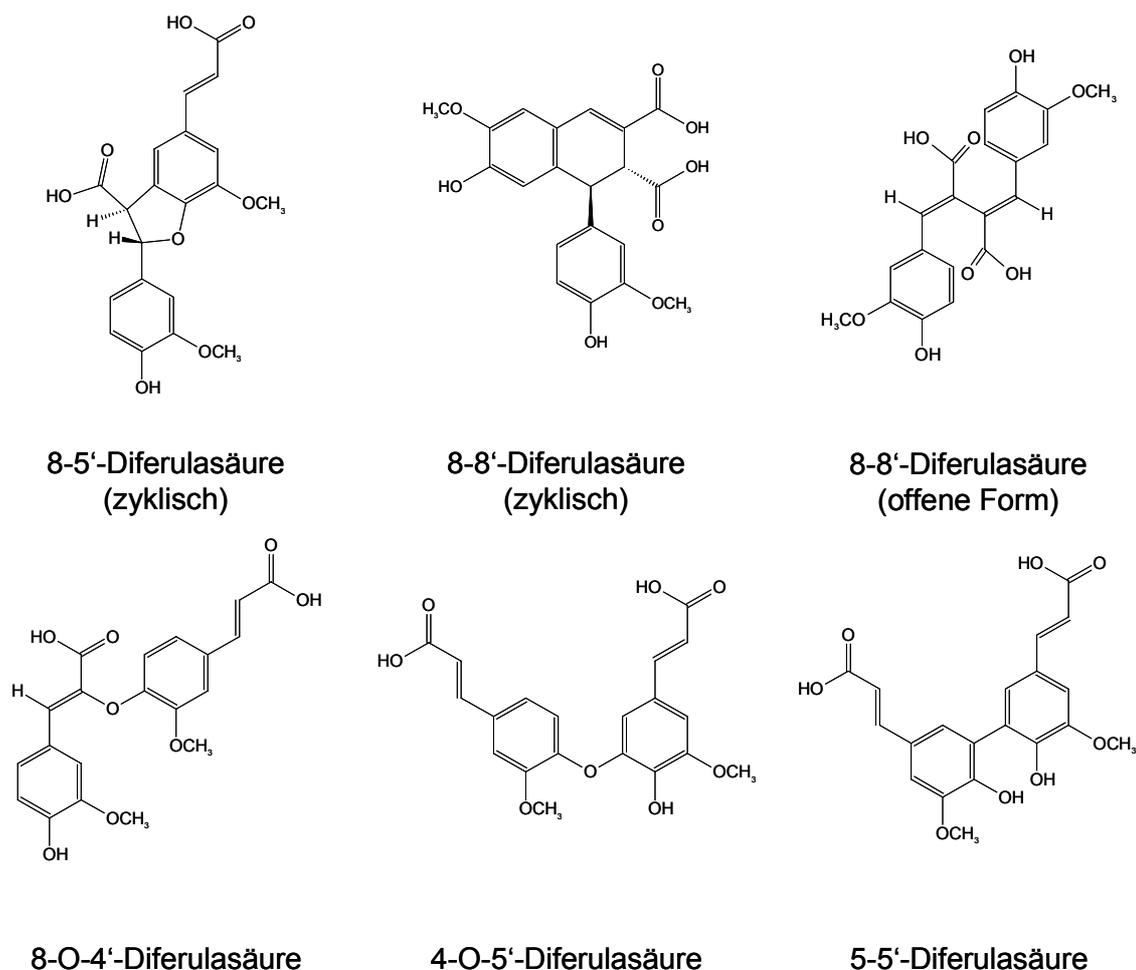


Abb. 3: Chemische Struktur nativer Diferulasäuren

1.2.2 Bioverfügbarkeit, Absorption und Metabolisierung

Die Bioverfügbarkeit sekundärer Pflanzenstoffe hat großen Einfluss auf das Ausmaß ihrer pharmakologischen Wirkung *in vivo*. Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen, beinhalten chemische und physikalische Eigenschaften der jeweiligen Substanz, De- und Rekonjugationsprozesse, Absorption sowie Metabolisierung [Yang *et al.*, 2001].

Im Gegensatz zu anderen Polyphenolen wurde die Bioverfügbarkeit von Phenolsäuren bislang in nur wenigen Studien untersucht [Manach *et al.*, 2005].

Freie Hydroxyzimtsäuren werden im menschlichen Organismus i. d. R. im Dünndarm rasch absorbiert [Manach *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005]. Allerdings liegen die meisten Phenolsäuren als Ester vor und sind häufig an Polysaccharide pflanzlicher

Zellwände gebunden, was die Bioverfügbarkeit beeinträchtigt. Veresterte Hydroxyzimtsäuren sowie Diferulasäuren stellen komplexe Moleküle dar und können als solche nicht bzw. in nur geringem Maße absorbiert werden. Bestimmte Esterasen im Dünndarm sowie in der Mikroflora des Kolons sind jedoch in der Lage durch Spaltung der Esterbindungen Hydroxyzimtsäuren freizusetzen, welche dann aufgenommen werden können [Buchanan *et al.*, 1996; Andreasen *et al.*, 2001a]. Allerdings ist die Absorption im Dickdarm generell weniger effizient als jene im Dünndarm, da die Fläche für einen Stoffaustausch sowie die Dichte von Transportsystemen im Kolon geringer sind [Manach *et al.*, 2004].

Für freie Ferulasäure konnte beim Menschen eine effiziente Aufnahme aus Tomaten (bis zu 25 %) und Bier nachgewiesen werden [Bourne & Rice-Evans, 1998; Bourne *et al.*, 2000]. Im Getreide liegt Ferulasäure durch Veresterung mit Arabinoxylanen und Lignin dagegen in einer sehr komplexen unlöslichen Matrix vor, was die Absorption sowohl im Menschen als auch in der Ratte erschwert [Adam *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2003a]. Matrixdegradierenden Enzymen (Xylanasen, Esterasen) mit einem Molekulargewicht größer 20 kDa ist es nicht möglich in komplexe Zellwände einzudringen, so dass ein Abbau überwiegend an der Oberfläche erfolgt. Kovalent gebundene Ferulasäuren können daher nur durch exzessive Metabolisierung durch Enzyme der Mikroflora im Dickdarm freigesetzt werden [Chesson *et al.*, 1999]. Dabei spalten Xylanasen Polymere in kleine, lösliche Oligosaccharide, aus denen nachfolgend Esterasen freie Ferulasäure freisetzen [Manach *et al.*, 2004]. Es wird vermutet, dass die Freisetzung von Ferulasäuremolekülen zu über 95 % durch Fermentation im Dickdarm erfolgt [Kroon *et al.*, 1997]. Nicht metabolisierte Hydroxyzimtsäuren bzw. deren Ester werden über den Fäzes ausgeschieden [Buchanan *et al.*, 1996].

Für die Aufnahme von Hydroxyzimtsäuren aus dem Darmlumen in die Enterozyten der intestinalen Mukosa werden sowohl passive als auch aktive Transportmechanismen diskutiert [Wolffram *et al.*, 1995; Ader *et al.*, 1996; Adam *et al.*, 2002]. Am Beispiel der Ratte konnte gezeigt werden, dass Hydroxyzimtsäuren neben passiver Diffusion voraussichtlich über einen Na⁺-abhängigen Transport entlang der Bürstensaummembran im Jejunum absorbiert werden [Wolffram *et al.*, 1995]. Für Ferulasäure und Kaffeesäure wurde die intestinale Absorption über einen Monokarbonsäuretransporter (MCT) in Caco2-Zellen nachgewiesen [Konishi & Shimizu,

2003; Konishi & Kobayashi, 2004]. Eine MCT-medierte Aufnahme von Phenolsäuren findet vermutlich bereits im Magen statt [Konishi *et al.*, 2006]. Jüngste Ergebnisse zeigen, dass Ferulasäure überwiegend durch passive transzelluläre Diffusion in die Enterozyten transportiert wird [Silberberg *et al.*, 2006; Poquet *et al.*, 2007]. Nur ein geringer Prozentsatz an freier Ferulasäure wird höchstwahrscheinlich über carrier-vermittelte Transportmechanismen in die Epithelzellen aufgenommen [Poquet *et al.*, 2007].

Während oder nach erfolgter Absorption werden Hydroxyzimtsäuren im Rahmen der Biotransformation für die spätere Eliminierung über die Galle und den Urin metabolisiert. Die Konjugationsreaktionen des Phase-II-Metabolismus umfassen hauptsächlich Methylierungs-, Sulfatierungs- bzw. Sulfonierungs- sowie Glukuronidierungsprozesse. Dies geschieht in den Enterozyten des Dünndarms oder nachfolgend in der Leber [Manach *et al.*, 2004]. Kern *et al.* konnten zeigen, dass Hydroxyzimtsäuren in enterozytenähnlichen Caco2-Zellen durch Phase I- sowie Phase II-Enzyme metabolisiert werden. Die Hydrolyse von Hydroxyzimtsäureestern und Diferulasäuren durch Esterasen fand sowohl intra- als auch extrazellulär statt, wobei Phase II-Konjugate bzw. -Metabolite nur in der Zelle gebildet wurden. Ferulasäure, Sinapinsäure und p-Kumarsäure wurden überwiegend sulfatiert [Kern *et al.*, 2003b]. Bei der Ratte konnten neben sulfatierten Konjugaten auch glukuronidierte Metabolite im Plasma und im Urin nach Ferulasäureaufnahme nachgewiesen werden [Rondini *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004]. Dagegen wurden im menschlichen Plasma und Urin vermehrt Glukuronsäurekonjugate von Ferulasäure oder anderen Hydroxyzimtsäuren detektiert [Bourne & Rice-Evans, 1998; Rechner *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2003a]. Aus diesem Grund wird vermutet, dass Sulfatierungsreaktionen von Hydroxyzimtsäuren hauptsächlich im Dünndarmepithel stattfinden, während Glukuronidierungsprozesse v. a. in der Leber erfolgen [Kern *et al.*, 2003b; Mateos *et al.*, 2006]. Kaffeesäure wird nach erfolgter Absorption über O-Methylierung hauptsächlich zu Ferulasäure, Isoferulasäure und Dihydroferulasäure metabolisiert. Glukuronide dieser Verbindungen konnten im menschlichen Urin nach Kaffeekonsum nachgewiesen werden. Bei Fermentation von Ferulasäure, Isoferulasäure und Dihydroferulasäure im Kolon entsteht 3-Hydroxyphenylpropionsäure, die in der Leber letztendlich zur 3-Hydroxyhippursäure abgebaut wird. 3-Hydroxyhippursäure kann damit als Biomarker für die

Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Hydroxyzimtsäuren *in vivo* fungieren [Rechner *et al.*, 2001].

Die Bioverfügbarkeit nativer Phenolsäuren wird im Vergleich zu anderen sekundären Pflanzenstoffen auf 3-15 % geschätzt [DGE, 2004]. Manach *et al.* verglichen die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen verschiedener Studien [Manach *et al.*, 2005]. Um eine direkte Aussage über die Bioverfügbarkeit unterschiedlicher polyphenolischer Verbindungen treffen zu können, wurden die Daten auf die Zufuhr von 50 mg des jeweiligen Aglykonäquivalents umgerechnet. Die höchsten Plasmakonzentrationen wurden bei der Hydroxybenzoesäure Gallussäure sowie bei freien Hydroxyzimtsäuren, die überwiegend im Dünndarm absorbiert werden, nach durchschnittlich 1,5 h erreicht. Dabei wurde von allen Polyphenolen Gallussäure mit einer maximalen Plasmakonzentration von 4 $\mu\text{mol/l}$ am besten aufgenommen. Die Ausscheidung über den Urin betrug 38 %. Die maximale Plasmakonzentration von Ferulasäure betrug 0,03 $\mu\text{mol/l}$, wobei durchschnittlich 27,6 % über den Urin ausgeschieden wurden. Für Kaffeesäure bzw. Chlorogensäure wurde im Schnitt eine Plasmakonzentration von maximal 0,96 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 0,26 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Über den Urin wurden 10,7 % der aufgenommenen Kaffeesäure eliminiert und nur 0,3 % der absorbierten Chlorogensäure. Die Aussagekraft der berechneten Mittelwerte ist letztlich jedoch fraglich, da nur wenige Daten zur Bioverfügbarkeit von Phenolsäuren vorliegen und die Ergebnisse zwischen verschiedenen Studien stark voneinander abweichen. Letzteres kann durch Variation in der gewählten Lebensmittelmatrix oder durch interindividuelle Unterschiede erklärt werden [Manach *et al.*, 2005]. Generell werden als höchste Plasmakonzentration für einzelne Hydroxyzimtsäuren bis zu 200 nM angegeben [Watzl & Rechkemmer, 2001].

Verschiedene Hydroxyzimtsäuren bzw. deren Derivate konnten ebenfalls im Fäzeswasser nachgewiesen werden. Jenner *et al.* konnten bei Probanden ohne diätetische Einschränkung eine durchschnittliche Ferulasäurekonzentration von 4,6 μM im Fäzeswasser messen. Die Konzentration von Kaffeesäure betrug im Schnitt 51,8 μM [Jenner *et al.*, 2005]. In einer anderen Humanstudie wurde Ferulasäure in einer durchschnittlichen Konzentration von 18,3 μM , Kaffeesäure in einer Konzentration von 136,1 μM im Fäzeswasser ermittelt [Halliwell *et al.*, 2005]. Generell wird vermutet, dass Fäzeswasser in stärkerem Umfang mit dem Kolonepithel interagiert

als die feste Phase und daher größeren Einfluss auf die Entstehung von Dickdarmkrebs hat [Jenner *et al.*, 2005].

1.2.3 Allgemeine Wirkungen und Funktionen bei der Kolonkarzinogenese

Phenolsäuren werden zahlreiche protektive Effekte zugesprochen. Neben einer zum Teil starken antioxidativen Wirkung üben Phenolsäuren antikarzinogene bzw. antimutagene sowie antiinflammatorische Funktionen aus. Auch besitzen einige Phenolsäuren antimikrobielle Eigenschaften. Im Folgenden sollen die Hauptwirkungen der Phenolsäuren und ihr Einfluss auf die Kolonkarzinogenese näher beleuchtet werden.

1.2.3.1 Antioxidative Wirkung

Phenolsäuren können vor oxidativem Stress schützen, da sie als Radikalfänger und Chelatbildner für Metalle wirken können. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie z. B. Hydroxyl-, Superoxidanionradikale und Singulett-Sauerstoff sind hochreaktive Verbindungen, die Lipide, Proteine sowie Nukleinsäuren oxidativ schädigen. Oxidativer Stress kann die Entstehung von Arteriosklerose und damit von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, aber auch die Entwicklung von Krebserkrankungen fördern. Phenolsäuren sind in der Lage ROS zu neutralisieren, wobei die Stärke ihrer antioxidativen Wirkung i. d. R. von der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül abhängt [Graf, 1992]. Das antioxidative Potenzial von Phenolsäuren wurde mittels verschiedener *in vitro*-Methoden bestimmt. Die antioxidative Kapazität für Ferulasäure beträgt im Trolox-Test 1,9 und ist damit doppelt so hoch wie die von Ascorbinsäure (Trolox-Wert 1,0). Für das antioxidative Potenzial von Kaffeesäure wurde ein Wert von 1,3 ermittelt [Rice-Evans *et al.*, 1997]. Unter Berücksichtigung des hohen Vorkommens von Phenolsäuren in der pflanzlichen Nahrung spielen Ferulasäure und Kaffeesäure höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle für den Antioxidantienstatus [Watzl & Rechkemmer, 2001]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sowohl Ferulasäure als auch Kaffeesäure die LDL-Oxidation *in vitro* inhibierten. Eine 50 %ige Hemmung der LDL-Oxidation wurde durch eine 0,3 µM Kaffeesäurekonzentration bzw. durch eine Ferulasäurekonzentration von 0,9 µM erreicht

[Castelluccio *et al.*, 1996]. Ebenso konnten Diferulasäuren die LDL-Oxidation inhibieren. Diferulasäuren stellen im Vergleich zu verschiedenen Hydroxyzimtsäuren mitunter bessere Antioxidantien dar. Besonders effektiv waren 8-O-4'- bzw. 8-8'-Diferulasäuren [Garcia-Conesa *et al.*, 1999; Andreasen *et al.*, 2001c]. Obwohl nach dem heutigen Wissensstand noch keine Daten über mögliche Plasmakonzentrationen von Phenolsäureestern bzw. freien Diferulasäuren im menschlichen Organismus vorliegen, konnte bei Ratten die Absorption von Diferulasäuren aus Getreidekleie nachgewiesen werden. Dies lässt eine generelle Bioverfügbarkeit dieser Substanzen vermuten [Andreasen *et al.*, 2001b]. Jayaprakasam *et al.* konnten zeigen, dass auch verschiedene synthetisierte Ferulasäure- bzw. Kaffeesäureester Lipidperoxidationsprozesse verhindern [Jayaprakasam *et al.*, 2006].

1.2.3.2 Antikarzinogene Wirkung

Bestimmte Phenolsäuren können sowohl Initiation als auch Promotion der Karzinogenese inhibieren. Verschiedene Umweltkarzinogene wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Mykotoxine und Nitrosamine können durch Phenolsäuren in ihrer Bildung gehemmt bzw. unschädlich gemacht werden. Für die antimutagene und antikarzinogene Wirkung der Phenolsäuren werden die phenolischen Hydroxylgruppen verantwortlich gemacht [Wattenberg *et al.*, 1980]. Die karzinogenesehemmenden Mechanismen umfassen neben antioxidativen Effekten die Hemmung von Phase-I-Enzymen, die Induktion von Phase-II-Enzymen, die Wechselwirkung mit dem aktivierten Karzinogen und die Verhinderung einer Karzinogenanlagerung an die DNA. Auch antiproliferative und proapoptotische Effekte spielen eine wichtige Rolle [Watzl & Rechkemmer, 2001]. Es liegen zahlreiche Hinweise aus *in vitro*-Experimenten bzw. Tierstudien zur krebsprotektiven Wirkung von Phenolsäuren vor. Ergebnisse aus Humanstudien, die einen direkten Einfluss von Phenolsäuren auf die Karzinogenese und die Tumorpromotion untersuchen, fehlen bislang [Watzl & Rechkemmer, 2001].

Die Oxidation der DNA bewirkt eine Veränderung ihrer Struktur sowie der Genfunktion und fördert damit eine mögliche Krebsentstehung. Phenolsäuren können durch ihre antioxidativen Eigenschaften (s. Kap. 1.2.3.1) zum Schutz vor DNA-Schädigung beitragen. So konnten beispielsweise die im Tomatensaft vorhandene p-Kumarsäure und Chlorogensäure durch ihre antioxidative Wirkung die Nitrosaminbildung *in vitro* unterdrücken [Helser & Hotchkiss, 1994]. Nitrosamine wirken karzinogen, da sie nach Umwandlung in alkylierende Verbindungen mit der DNA reagieren können [Preussmann, 1984]. Auch Ferulasäure besitzt die Fähigkeit die Zelle vor DNA-Schädigung zu schützen. In HT29-Kolonkarzinomzellen konnte Ferulasäure die Anzahl von durch Wasserstoffperoxid induzierten DNA-Strangbrüchen vermindern [Ferguson *et al.*, 2005].

Phase-I-Enzyme wie Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen katalysieren im Rahmen der Biotransformation Reaktionen, bei denen lipophile Substanzen mit reaktiven Gruppen versehen werden. Dadurch entstehen potenziell elektrophile Moleküle, die u. a. mit Nukleinsäuren reagieren können [Depeint *et al.*, 2002]. Phenolsäuren sind in der Lage Phase-I-Enzyme in ihrer Aktivität zu hemmen. Ein Beispiel ist die durch Kaffee-, Chlorogen- und Gallussäure nachgewiesene Inaktivierung Cytochrom P450-abhängiger Enzyme, die mitunter die Umwandlung von Aflatoxin B₁ in das aktive Karzinogen katalysieren. Damit konnte im Tierversuch die Entstehung von Leberkrebs signifikant vermindert werden [Stich & Rosin, 1984]. Auch in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde durch Ferulasäure und p-Kumarsäure die Cytochrom P450 1A-Aktivität verringert [Ferguson *et al.*, 2005].

Im Tierversuch konnte die Induktion verschiedener Phase-II-Enzyme (z. B. Glutathion-S-Transferase und Quinon-Reduktase) sowie deren gesteigerte hepatische Synthese durch Ellagsäure, einem oxidativen Kopplungsprodukt der Gallussäure, gezeigt werden [Barch *et al.*, 1995; Barch *et al.*, 1996]. Durch Phase-II-Konjugationsreaktionen wird die Löslichkeit hydrophober Substanzen verbessert, was zu deren Entgiftung bzw. Eliminierung führt.

Phenolsäuren können mit aktivierten Karzinogenen kovalente Bindungen eingehen und damit zu deren biologischen Inaktivierung führen. Wood *et al.* zeigten, dass Kaffee-, Chlorogen-, Ferula- und Ellagsäure in direkte Wechselwirkung mit poly-

zyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen treten und dadurch die Karzinogenese hemmen konnten. Ellagsäure war dabei 80-300 Mal effektiver als die anderen Phenolsäuren [Wood *et al.*, 1982].

Die Karzinogenese ist gekennzeichnet von einer erhöhten Zellproliferation und/oder einer verminderten Zelltodesrate, was zu einem unkontrollierten Zellwachstum und folglich zur Ausbildung von Tumoren führen kann. Phenolsäuren besitzen antiproliferative Eigenschaften und können die Apoptose von Zellen induzieren. Kampa *et al.* konnten eine Proliferationshemmung von T47D-Brustkrebszellen durch verschiedene Phenolsäuren (z. B. Kaffeesäure und Ferulasäure) nachweisen. Kaffeesäure bewirkte eine Apoptoseinduktion über das Fas/FasL-System [Kampa *et al.*, 2004]. Kaffeesäure und Kaffeesäurephenylethylester (CAPE) konnten die Proliferation und Metastasierung von HepG2-Leberkarzinomzellen durch Hemmung des nukleären Transkriptionsfaktors (NF- κ B) sowie durch Inaktivierung der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) inhibieren [Chung *et al.*, 2004]. Auch verschiedene synthetisierte Ester von Ferula- und Kaffeesäure waren in der Lage die Proliferation von HCT116-Kolonkarzinomzellen zu hemmen [Jayaprakasam *et al.*, 2006].

In vivo-Versuche mit Ratten zeigten eine starke Inhibierung AOM-induzierter aberranter Krypt Foci (ACF) durch Ferulasäure [Wargovich *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2000]. Damit scheint Ferulasäure eine vielversprechende chemopräventive Wirkung bei der Initiationsphase der Kolonkarzinogenese auszuüben [Wargovich *et al.*, 2000].

1.2.3.3 Antiinflammatorische Wirkung

Verschiedene Polyphenole, darunter einige Phenolsäuren, besitzen antiinflammatorische Eigenschaften. Sie können in den Arachidonsäurestoffwechsel, der bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt, eingreifen. Durch die Hemmung der Aktivität verschiedener beteiligter Enzyme wie beispielsweise Phospholipase A₂, Zyklooxygenase (COX) und Lipoxygenase können sie die Bildung von Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) unterbinden. Besonders effektiv erwies sich in diesem Zusammenhang Kurkumin (Diferuloylmethan) [Huang *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 2004]. Auch Ferulasäure konnte neben Kurkumin in HT29-Kolonkarzinomzellen die COX-2-Aktivität inhibieren [Ferguson *et al.*, 2005]. Sowohl die COX-1- als auch die COX-2-Aktivität ließ sich durch Ester von Ferula- und

Kaffeensäure signifikant unterbinden [Jayaprakasam *et al.*, 2006]. Es gilt als sehr wahrscheinlich, dass die Hemmung von COX-2 die Inzidenz für Kolonkrebs reduziert [Peek, Jr., 2004]. Bis zu 10 % aller Krebsfälle sind möglicherweise auf chronische Entzündungsprozesse zurückzuführen [Gerhaeuser, 2001].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der Phenolsäure Ferulasäure, eine der in pflanzlicher Nahrung am häufigsten vorkommenden Hydroxycimtsäuren, auf zelluläre Mechanismen der Kolonkarzinogenese und Tumorprogression im Zellkulturmodell untersucht werden. Dazu wurden permanent differenzierte HT29 Klon 19A-Kolonkarzinomzellen verwendet, die durch Behandlung mit Natriumbutyrat aus der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 entstanden sind und ein rückdifferenziertes Modell für das intestinale Epithel darstellen [Augeron & Laboisse, 1984].

Zunächst wurden die Stabilität von Ferulasäure unter Standardzellkulturbedingungen, mögliche zytotoxische Effekte sowie die Auswirkung von Ferulasäure auf Proliferation und Apoptose von HT29 Klon 19A-Zellen analysiert. Ein weiterer Teil der Arbeit sollte sich mit dem potenziellen Einfluss von Ferulasäure auf Mechanismen der Kolonkarzinogenese und Tumorprogression auf Proteinebene beschäftigen. Mittels Proteomanalyse sollten durch Ferulasäure regulierte Proteine identifiziert werden, die Aufschluss über die Wirkungsweise dieser Phenolsäure geben könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die im Folgenden aufgelisteten Chemikalien von in Deutschland ansässigen Firmen bezogen.

Substanz	Hersteller/Lieferant
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
2-Iodacetamid	AppliChem, Darmstadt
Acetonitril (ACN) LC-MS <i>Chromasolv</i>	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30 %/0,8 % (37,5:1)	VWR, Darmstadt
Agarose	QBiogen, Heidelberg
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Riedl-de Haen, Seelze
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	VWR, Darmstadt
Antifade	AppliChem, Darmstadt
Benzonase Nuklease 2,5 KU	VWR, Darmstadt
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	NeoLab, Heidelberg
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	VWR, Darmstadt
CHAPS	Roth, Karlsruhe
Chemolumineszenz-Reagenz <i>SuperSignal[®] West Pico</i>	Pierce, Bonn
Coomassie [®] Brilliant Blau G250	AppliChem, Darmstadt
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
DMEM mit stabilem Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
dNTP-Mix	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100 %	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethanol 99 %, vergällt mit 1 % MEK	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
<i>FACS Clean</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FACS Rinse</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Ferulasäure	Fluka, Neu-Ulm
Fluoreszenzfarbstoffe <i>CyDye[™] DIGE</i> <i>Fluor minimal dyes Cy2, Cy3, Cy5</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
Formaldehyd 37 %	AppliChem, Darmstadt
Formamid, deionisiert	AppliChem, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS) Gold	Gibco, Eggenstein

Glutardialdehyd 25 %	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
HEPES	VWR, Darmstadt
Kalibrierlösungen pH-Meter	WTW, Weilheim
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
Kit zur Apoptosedetektion <i>Annexin V-Fluos Staining Kit</i>	Roche, Mannheim
Kit zur Aufreinigung von Gesamt-RNA <i>Perfect RNATM, Eucaryotic, Mini</i>	Eppendorf, Hamburg
Kit zur Proteinkonzentrationsbestimmung <i>Bradford Protein Assay</i>	Bio-Rad, München
Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lysispuffer (10 x)	Cell Signaling, Frankfurt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt
Mastermix <i>RealMasterMix (2,5 x)</i>	Eppendorf, Hamburg
Methanol 99,9 %	Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase <i>(mit 5 x Erst Strang-Puffer)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker <i>PageRulerTM Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
MOPS	AppliChem, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	VWR, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	AppliChem, Darmstadt
Normalserum Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Gibco, Eggenstein
Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare Life Sciences, München
Phosphorsäure 85 %	NeoLab, Heidelberg
PMSF	Roche, Mannheim
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Proteaseinhibitor <i>CompleteTM-Mini</i>	Roche, Mannheim
Random Hexamer-Primer	Biomers, Ulm
Ribonuklease-Inhibitor <i>Prime RNase InhibitorTM</i>	Eppendorf, Hamburg
Ribonuklease-Inhibitor <i>RNaseOUTTM</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Röntgen-Entwickler <i>Kodak GBX Developer</i>	Kodak, Stuttgart
Röntgen-Fixierer <i>Kodak GBX Replenisher</i>	Kodak, Stuttgart
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	NeoLab, Heidelberg
SDS	AppliChem, Darmstadt

Silbernitrat (AgNO ₃)	AppliChem, Darmstadt
Silikonöl	GE Healthcare Life Sciences, München
<i>ImmobilineTM DryStrip Cover Fluid</i>	
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	VWR, Darmstadt
Thioharnstoff	VWR, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka, Neu-Ulm
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Tris-Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
Trypanblau	Gibco, Eggenstein
Trypsin, <i>Proteomics Grade</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (2,5 g/l Trypsin; 0,38 g/l EDTA · 4 Na)	Gibco, Eggenstein
Tween [®] 20	AppliChem, Darmstadt
Wasser für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Wasser für die MS, <i>ultra resi-analyzed</i>	Mallinckrodt Baker, Griesheim
ε-Aminocaprinsäure	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper	Eigenschaften	Hersteller/Lieferant
Anti-β-Actin	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes β-Actin	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Annexin II	Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes Annexin II	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Annexin IV	Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes Annexin IV	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Ezrin	Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes Ezrin	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IκB-α	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes IκB-α	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-IL-1R1	Monoklonaler Rattenantikörper gegen murines IL-1R1 (p80)	Pharmingen, San Diego, USA
Sekundärantikörper	Eigenschaften	Hersteller/Lieferant
Anti-mouse IgG HRP	Peroxidasekonjugiert	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-rabbit IgG HRP	Peroxidasekonjugiert	Upstate, Lake Placid, New York, USA
Anti-rat IgG HRP	Peroxidasekonjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-mouse IgG FITC	Peroxidasekonjugiertes F(ab') ₂ -Fragment	Dianova, Hamburg

2.1.3 Synthetische Oligonukleotid-Primer

Kodiertes Protein	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (<i>sense</i> = seq; <i>antisense</i> = rev)
Annexin II (P07355)	huAnxII1seq huAnxII117rev	seq: ATG TCT ACT GTT CAC GAA ATC CTG TG rev: AGC ATC CCG CTC AGC ATC A
Annexin IV (P09525)	huAnxIV77seq huAnxIV216rev	seq: GCC ATG GCA ACC AAA GGA G rev: GTG TTG CGG TAG GCA AGG AC
Ezrin (P15311)	huEzr1746seq huEzr1819rev	seq: TGA CAT CAT CCA CAA CGA GAA CA rev: TGC CCT GCC GGA TCT G
Aldolase A (P04075)	huAldoAseq1302 huAldoArev1382	seq: AAA TCC AAG GGC GGT GTT rev: GGT GGT AGT CTC GCC ATT TGT C

Alle Primer wurden hergestellt von der Firma Biomers, Ulm.

2.1.4 Sonstige Materialien und Verbrauchsmittel

Material/Verbrauchsmittel	Hersteller/Lieferant
μ -Vials <i>8004-WM-D/i3μ</i>	Infochroma, Zug, Schweiz
Aufsätze für IEF-Probenapplikation <i>Sample Cups</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
Biopsiestanzer 2, 3, 4 und 5 mm	Kai Europe, Solingen
Deckglas, 12 mm x 12 mm	Henneberg-Sander, Gießen
Einfrierröhrchen (<i>Cryogenic vials</i>) 1,2 ml	Nunc, Wiesbaden
Einwegküvetten <i>Plastibrand</i> [®]	Brand, Wertheim
Filterpapier <i>Whatman 3MM</i>	Schleicher und Schuell, Dassel
Gelstreifen <i>ImmobilineTM DryStrip</i> pH 3-10 NL, 18 cm	GE Healthcare Life Sciences, München
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm <i>M</i> [®]	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Platte 96-well <i>twin.tec</i>	Eppendorf, Hamburg
pH-Indikatorstäbchen	VWR, Darmstadt
PP-Feindosierungsspritze 1 ml	Roth, Karlsruhe
PP-Kanüle 22G	NeoLab, Heidelberg
PP-Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
PP-Spatel	Brand, Wertheim
PP-Pipetten 1, 2, 5, 10 und 25 ml	Corning Costar, Bodenheim
PS-Rundbodenröhrchen 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Präpariernadel	NeoLab, Heidelberg
Quarzküvette, 10 mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße <i>Eppendorf Safe-Lock</i> 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg

Röntgenfilme <i>Agfa Curix Cronex 5</i>	Agfa, Köln
Schlauchfolie	NeoLab, Heidelberg
Schraubkappen <i>8004-WM-C-Si/Te</i>	Infochroma, Zug, Schweiz
Spinfilter 0,45 µm	Corning Costar, Bodenheim
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Costar, Bodenheim
Zellkulturplatten 6-, 12- und 96-well	Corning Costar, Bodenheim
Zellkulturschalen 3,5 und 10 cm	Corning Costar, Bodenheim
Zellschaber	Corning Costar, Bodenheim

2.1.5 Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	Hersteller/Lieferant
Analysenwaage <i>APX-1502</i>	Denver Instrument, Göttingen
Aufrechtes Mikroskop <i>Axioskop 40 FL</i> mit Digitalkamera <i>AxioCam MRc</i> und Filtersätzen <i>02 (DAPI)</i> und <i>09 (FITC)</i>	Zeiss, Hallbergmoos
Begasungsbrutschrank <i>ThermoForma 371</i>	Thermo Electron, Karlsruhe
Durchflusszytometer <i>BD LSR II System</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzscanner <i>Typhoon Trio+</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
Fokussierungssystem <i>Ettan IPGphor</i> <i>Isoelectric Focusing System-UM</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentationsgerät <i>GeneFlash</i>	Syngene, Cambridge, UK
Gelelektrophoresekammer <i>EasyCast™</i> <i>Horizontal System B1A</i>	Owl Separation Systems, PEQLAB, Erlangen
Gelelektrophoresekammer <i>Minigel Twin®</i>	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresekammer <i>PROTEAN Plus™ Dodeca Cell</i>	Bio-Rad, München
Gelgießkammer <i>PROTEAN plus®</i> <i>Multi-Casting Chamber</i>	Bio-Rad, München
Gelkassetten <i>PROTEAN plus®</i> <i>Hinged Spacer Plates</i> 25 x 20,5 x 0,1 cm ³	Bio-Rad, München
HPLC <i>Waters 2695 Alliance</i> (quaternäre Pumpe) mit <i>Photodioden-Array-Detektor Waters 996</i>	Waters, Eschborn
HPLC-Säule <i>Jupiter Proteo</i> 4 µm, 90 Å, 250 x 2 mm ²	Phenomenex, Aschaffenburg
HPLC-Säule <i>Prontosil 120-5-c18 ace-EPS</i> 5 µm, 250 x 4,6 mm ²	Bischoff, Leonberg
Inverses Mikroskop <i>Nikon TMS</i>	Nikon, Düsseldorf
Keramikschalen <i>Ettan IPGphor Strip Holder</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kompaktschüttler <i>KS 15 B</i>	NeoLab, Heidelberg
Kühlzentrifuge <i>Avanti J-25</i> mit Rotor <i>JA-25.50</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Kühlzentrifuge <i>SIGMA 4K15</i>	Sigma, Osterode
Magnetrührer <i>IKAMAG® RCT basic</i>	IKA, Staufen

Massenspektrometer <i>LC-ESI-MSD-Ion-Trap System</i> <i>Agilent 1100 Series: 1100 Micro-LC mit Autosampler (G1377A), binärer Hochdruckpumpe mit Flow-Restrictor (G1376A), Degasser (G1379A), Dioden-Array-Detektor (G1315B), Elektrospray-Ionenquelle (G1948A), Ion-Trap XCT (G2446A)</i>	Agilent, Waldbronn
Mikrotiterplattenreader <i>Multiskan Spectrum</i>	Thermo Electron, Karlsruhe
Mikrotiterplattenschüttler <i>Titramax 100</i>	Heidolph, Schwabach
PCR-Cycler <i>Px2 Thermal Cycler</i>	Thermo Electron, Karlsruhe
pH-Meter <i>inoLab pH Level 1</i>	WTW, Weilheim
Plastikröhren zur Äquilibration <i>Equilibration Tube Set</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
Power Supply <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra, Göttingen
Präzisionswaage <i>TB-215D</i>	Denver Instrument, Göttingen
Real-Time PCR-Cycler <i>Mastercycler® ep realplex</i>	Eppendorf, Hamburg
Rehydratationssystem <i>Immobline DryStrip Reswelling Tray</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
Röntgenkassette	Rego, Augsburg
Scanner <i>PowerLook III</i>	Umax, Willich
Spektrophotometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank <i>HeraSafe</i>	Heraeus, Hanau
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Thermostat <i>HAAKE DC10</i>	Thermo Haake, Karlsruhe
Tischzentrifuge <i>5415 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallprozessor <i>UP 200S</i>	Dr. Hielscher, Teltow
Ultrazentrifuge <i>Optima TLX</i> mit Rotor <i>TLA 55</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Vakuumkonzentrator <i>SpeedVac SPD 111V</i>	Thermo Electron, Karlsruhe
Vorsäulenkartuschen <i>MaxRP</i> 4 µ, 90 Å, 4 x 2 mm ²	Phenomenex, Aschaffenburg
Vortex-Schüttler <i>MS 2 Minishaker</i>	IKA, Staufen
Wasserbad <i>GN 1/1-150</i> mit Thermostat <i>DC 30</i>	Thermo Haake, Karlsruhe
Wasserbad <i>WB 20</i>	Medingen, Dresden
Western-Blot-Apparatur <i>Trans-Blot® SD Cell</i>	Bio-Rad, München
Wippschüttler <i>Rocky</i>	Fröbel, Lindau

2.1.6 Software und Datenbanken

Software	Hersteller
<i>AxioVision 4.6.1.0</i>	Zeiss, Hallbergmoos
<i>DataAnalysis 5.3</i>	Agilent, Waldbronn
<i>DeCyder™ 6.5</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
<i>BD FACS DiVa™ 3.0</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>ImageQuant 5.2</i>	Molecular Dynamics, Krefeld
<i>ImageQuant TL 2005</i>	GE Healthcare Life Sciences, München
<i>Mastercycler® ep realplex 1.5</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Multiskan Spectrum 1.0</i>	Thermo Electron, Karlsruhe
<i>Phoretix PowerScan™ 2003.01</i>	Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK
<i>Proteomweaver 3.0.9.3</i>	Definiens, München
<i>SigmaStat 3.10</i>	Statcon, Witzenhausen
Datenbank	Anbieter
<i>Spectrum Mill Proteomics Workbench 3.02.060a</i>	Agilent, Waldbronn
<i>Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/)</i>	Amos Bairoch, Universität Genf, Schweiz und European Bioinformatics Institute, EBI, Hinxton, UK

2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die im Folgenden aufgeführten Lösungen mit Aqua pur. hergestellt.

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Charakteristika der verwendeten Zelllinie HT29 Klon 19A

HT29 Klon 19A-Zellen (zur Verfügung gestellt von C. Laboisse) sind Klonzellen der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29, die 1964 von J. Fogh aus dem Kolonadenokarzinom einer 44-jährigen Frau etabliert wurde. Unter Standardzellkulturbedingungen (glukosehaltiges Medium mit Zusatz von FCS) sind HT29-Zellen undifferenziert und wachsen in Form eines Multilayers aus unpolarisierten Zellen [Pinto *et al.*, 1982]. Werden die Kulturbedingungen modifiziert, z. B. durch die Verwendung von glukosefreiem Medium mit Zusatz von Galaktose oder Inosin, kommt es zu einer enterozytenähnlichen Differenzierung von HT29-Zellen [Pinto *et al.*, 1982; Wice *et al.*, 1985]. Während diese Form der Differenzierung jedoch reversibel ist, sind HT29 Klon 19A-Zellen permanent differenziert. HT29 Klon 19A-Zellen entstanden aus HT29-Zellen durch Behandlung mit Natriumbutyrat [Augeron & Laboisse, 1984]. Unter Standardkulturbedingungen, d. h. ohne weiteren Zusatz von Natriumbutyrat, differenzieren HT29 Klon 19A-Zellen spontan. Morphologisch wachsen sie nach Erreichen der Konfluenz als polarisierte Monolayer unter Ausbildung von *Tight Junctions* und Domen, die transepitheliale Transportprozesse ermöglichen [Augeron & Laboisse, 1984; Rousset, 1986]. Somit kann die Zelllinie HT29 Klon 19A als ein rückdifferenziertes Zellkulturmodell für das intestinale Epithel angesehen werden [Busche *et al.*, 1993].

2.2.1.2 Kultivierung und Konservierung

Lösungen:

Kulturmedium 89 % (v/v) DMEM mit stabilem Glutamin
 10 % (v/v) FCS Gold
 1 % (v/v) PenStrep

Einfriermedium 60 % (v/v) DMEM mit stabilem Glutamin
 20 % (v/v) FCS Gold
 20 % (v/v) DMSO

Kulturmedium, PBS und Trypsin/EDTA wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Das Einfriermedium wurde vor Gebrauch auf 4 °C vorgekühlt. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Kultivierung:

HT29 Klon 19A-Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen (wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 5 % CO₂, 37 °C) in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Subkultivierung der Zellen wurde bei etwa 85-95 % Konfluenz durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 2 ml PBS⁻ gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Schalenboden abgelöst. Der Trypsinierungsprozess (durchschnittliche Dauer ca. 5-7 min bei 37 °C) wurde durch Zugabe von 2 ml Kulturmedium gestoppt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min bei 306 x g wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser Suspension wurde mit frischem Medium in eine neue 10 cm-Zellkulturschale ausgesät, so dass das Verhältnis der Subkultivierung 1:3 bis 1:6 betrug.

Konservierung:

Zur Konservierung wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung zunächst trypsiniert. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (5 min bei 306 x g) wurde das Zellpellet in Medium aufgenommen und die Suspension erneut zentrifugiert, um Reste von Trypsin/EDTA zu entfernen. Die Resuspension der Zellen erfolgte in eiskaltem Einfriermedium (5 x 10⁶ Zellen/ml). Die Zellen wurden in Einfrierröhrchen bei -80 °C für mindestens 24 h eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zellzählung und Vitalitätsbestimmung erfolgten mit einem Gemisch aus Zellsuspension und 0,13 %igem Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Trypanblau ist ein blauer DNA-Farbstoff, welcher nur bei Verlust der Membranintegrität in die Zelle eindringen kann und damit nur nekrotische Zellen anfärbt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch. Nekrotische Zellen sind deutlich blau gefärbt, während vitale Zellen durchsichtig erscheinen.

2.2.2 Stabilitätsmessung mittels HPLC

Lösungen:

Eluent A 1 % (v/v) Ameisensäure
hergestellt mit Aqua_{MS}

Eluent B 1 % (v/v) Ameisensäure in ACN

Die Stabilität von Ferulasäure (FS) wurde mittels HPLC analysiert. Dazu wurden verschiedene FS-Konzentrationen in jeweils 2 ml Kulturmedium in einer 3,5 cm-Zellkulturschale gelöst und unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden je 200 µl der inkubierten Lösung mit 800 µl 1 %iger Ameisensäure (30 % Eluent B, 70 % Eluent A) versetzt und diese Mischung in die HPLC injiziert. Die stationäre Phase bildete die HPLC-Säule *Prontosil 120-5-c18 ace-EPS*. Die Thermostatisierung betrug 30 °C; das Injektionsvolumen lag zwischen 10 und 100 µl. Die Elution erfolgte in Form eines linearen Gradienten bei einer Flussrate von 1 ml/min (s. Tab. 1), wobei FS bei 323 nm detektiert wurde.

Tab. 1: Elutionsgradient für die HPLC

Zeit (min)	0	25	33	38	45	55
Eluent A (%)	95	45	5	5	95	95
Eluent B (%)	5	55	95	95	5	5

2.2.3 Zytotoxizitätsmessung mittels MTT-Test

Lösungen:

<i>MTT-Stammlösung</i>	5 mg/ml MTT in PBS ⁺⁺	
<i>MTT-Gebrauchslösung</i>	MTT-Stammlösung 1:9 mit Komplettmedium verdünnt	
<i>Lysispuffer</i>	SDS	10 g
	DMSO	99,4 ml
	100 % Essigsäure	0,6 ml
	bei 50 °C unter leichtem Rühren lösen	

Um mögliche zytotoxische bzw. antiproliferative Effekte von FS abschätzen zu können, wurde die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten FS-Konzentration mittels MTT-Test untersucht. Der MTT-Test ist ein quantitativ kolorimetrischer Test, der lebende Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität identifiziert. Er beruht auf dem Nachweis von blauen Formazankristallen, die durch den Umsatz von MTT, einem gelben Tetrazoliumsalz, durch mitochondriale Dehydrogenasen in vitalen Zellen entstehen.

Für die Zytotoxizitätsmessung wurden zunächst 30.000 vitale HT29 Klon 19A-Zellen pro Vertiefung in 96-well-Zellkulturplatten in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Die äußeren Vertiefungen wurden zum Schutz vor Verdunstung mit je 100 µl PBS befüllt. Nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz (i. d. R. zwei Tage nach der Aussaat) erfolgte ein Mediumwechsel mit gleichzeitiger Zugabe von FS in unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils in Fünffachbestimmung). Verwendet wurden eine 1 M FS-Stammlösung in DMSO sowie eine 0,25 M FS-Stammlösung in EtOH. Die Endkonzentration an DMSO betrug 0,5 %, die von EtOH 2 %. Um mögliche Lösungsmittelleffekte ausschließen zu können, wurde pro Versuchsansatz zusätzlich eine DMSO- bzw. eine EtOH-Kontrolle in Fünffachbestimmung eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Medienüberstände abgesaugt und durch jeweils 100 µl MTT-Gebrauchslösung ersetzt. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die MTT-Umsetzung durch Zugabe von 120 µl Lysispuffer pro Vertiefung gestoppt. Um Verdunstungsverluste zu verhindern, wurden die Zellkulturplatten mit einer Klebefolie versehen und bis zur vollständigen Lösung der gebildeten Formazankristalle ÜN bei 300 U/min und 37 °C geschüttelt. Die MTT-Umsetzung konnte nachfolgend bei einer Wellenlänge von 560 nm (Referenz

690 nm) gegen einen Leerwert (100 µl MTT-Gebrauchslösung ohne Zellen, in Dreifachbestimmung) am Plattenreader *Multiskan Spectrum* photometrisch bestimmt werden. Die Vitalität der behandelten Zellen in Prozent errechnete sich wie folgt: Absorptionswert nach Abzug des mittleren Leerwerts geteilt durch den Mittelwert der Absorptionen der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle multipliziert mit 100.

2.2.4 Durchflusszytometrische Apoptosemessung mittels Annexin V

Lösungen:

<i>Inkubationspuffer</i>	10 mM HEPES 140 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
<i>Propidiumiodid-Lösung</i>	50 µg/ml PI in Aqua pur.
<i>Annexin V-PI-Färbelösung</i>	Ansatz für 10 Versuche: Inkubationspuffer 500 µl <i>Annexin V-Fluos</i> -Lösung 10 µl (gebrauchsfertig) Propidiumiodid-Lösung 10 µl

Das Prinzip dieser Methode ist die spezifische kalziumabhängige Anlagerung von FITC-gekoppeltem Annexin V an Phosphatidylserin apoptotischer Zellen. Während des Apoptosevorganges translozieren Phosphatidylserin-Reste von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite [van Engeland *et al.*, 1998]. Da Annexin V durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls an Phosphatidylserin von nekrotischen Zellen bindet, wurde eine Simultanfärbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI durchdringt die permeabilisierte Membran und lagert sich an die DNA nekrotischer Zellen an. Die durchflusszytometrische Messung erlaubt damit die Unterscheidung von apoptotischen (FITC⁺/PI⁻) und nekrotischen (FITC⁺/PI⁺) Zellen.

Für die Apoptosemessung wurden zunächst 1 x 10⁶ vitale HT29 Klon 19A-Zellen pro Vertiefung in 6-well-Zellkulturplatten in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach drei Tagen erfolgte bei etwa 80-85 % Konfluenz ein Mediumwechsel mit gleichzeitiger Zugabe von FS in unterschiedlichen Konzentrationen. Verwendet wurden eine 1 M FS-Stammlösung in DMSO sowie eine 0,25 M FS-Stammlösung in EtOH. Die Endkonzentration an DMSO betrug 0,5 %, die von Ethanol 2 %. Als Positivkontrolle

diente ein Ansatz mit 0,5 μM Staurosporin in Kombination mit 0,5 μM Brefeldin A. Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium verwendet. Um mögliche Lösungsmittelleffekte ausschließen zu können, wurde pro Versuchsansatz zusätzlich eine DMSO- bzw. eine EtOH-Kontrolle eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Medienüberstände in 15 ml-PP-Röhrchen überführt. Daran schloss sich ein zweimaliges Waschen der Zellen mit 1 ml PBS⁻ (37 °C) an, wobei die Waschflüssigkeit zu den Medienüberständen in die PP-Röhrchen gegeben wurde. Die Ablösung der Zellen von der Kulturfläche erfolgte mit 250 μl Trypsin/EDTA bei 37 °C. Der Trypsinierungsprozess wurde mit 1 ml Kulturmedium abgestoppt, sobald mikroskopisch ein Abrunden der Zellen zu erkennen war. Die abgelösten Zellen wurden in die entsprechenden Röhrchen zu den Medienüberständen und Waschlösungen überführt und für 5 min bei 212 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl und -vitalität mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Je $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in PS-Rundbodenröhrchen überführt und für 5 min bei 359 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Nach Waschen der Zellen mit je 1 ml PBS⁺⁺ und wiederholter Zentrifugation für 5 min bei 359 x g erfolgte die Anfärbung der Zellen mit je 50 μl Annexin V-PI-Färbelösung für 10 min im Dunkeln bei RT. Im Anschluss daran wurden zu jedem Röhrchen 400 μl Inkubationspuffer gegeben und die Proben bis zur Messung vor Licht geschützt auf Eis gestellt.

Mit dem Durchflusszytometer *BD LSR II System* wurden unter Verwendung der Software *BD FACS DiVaTM 3.0* sowohl die Lichtstreuung in Vor- und Seitwärtsrichtung (engl. *forward-scatter* (FSC) und *sideward-scatter* (SSC)) als auch die Fluoreszenzemission bestimmt. Folgende Parameter wurden gemessen: Relative Zellgröße (FSC), relative Zellgranularität (SSC; 575 nm Bandpass-Filter), Annexin V-FITC (530 nm Bandpass-Filter) und PI (585 nm Bandpass-Filter).

Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Probenaufarbeitung gelagert.

2.2.5.3 Probenaufarbeitung

Lösungen:

<i>2D-PAGE-Lysispuffer</i>	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % (w/v) CHAPS 2 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 1 % (w/v) DTT 0,05 % (v/v) Proteaseinhibitor-Stammlösung 0,001 % (v/v) Benzonase
<i>Proteaseinhibitor-Stammlösung</i>	2 Tabletten <i>Complete™-Mini</i> in 1 ml Aqua pur.
<i>2D-DIGE-Lysispuffer</i>	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % (w/v) CHAPS 30 mM Tris-Base mit HCl auf pH 8,5 einstellen

Ziel der Probenaufarbeitung ist die Disaggregation, Denaturierung, Reduktion sowie eine möglichst vollständige Lösung der Proteine.

Zunächst wurden die eingefrorenen Zellpellets (vgl. 2.2.5.2) in jeweils ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Jedes Zellpellet, d. h. geerntete Zellen aus insgesamt drei T75-Zellkulturflaschen, wurde mit 250 µl 2D-PAGE-Lysispuffer bzw. bei nachfolgender Fluoreszenzmarkierung mit 2D-DIGE-Lysispuffer versetzt und die Lysate mittels Plastikspatel homogenisiert. Der vollständige Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizierung mit Hilfe eines Ultraschallstabes (10 Stöße, 35 % Amplitude, 50 % Pulsierung). Daran schloss sich eine einstündige Zentrifugation der Lysate bei 16.100 x g und 10 °C an. Die Überstände, die die Proteine enthielten, wurden abgenommen und jeweils in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur nachfolgenden Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford verblieben die Lysate auf Eis.

2.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [Bradford, 1976] mittels *Bradford Protein Assay*.

2D-DIGE-Proben wurden vor der Konzentrationsbestimmung mit 50 mM NaOH auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Zur Herstellung einer Eichgeraden dienten BSA-Konzentrationen von 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 µg/ml als Standards. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit PBS verdünnt. Die BSA-Standards bzw. 2 µl Probe wurden mit 1 ml dieser Gebrauchslösung versetzt. Die spektralphotometrische Messung der Extinktionen und Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels des Spektrophotometers *BioPhotometer*.

Die Proteinkonzentration der Proben sollte 5-10 mg/ml betragen. Sofern nötig, wurden die Proben mit 2D-PAGE- bzw. 2D-DIGE-Lysispuffer entsprechend verdünnt. Aliquotierte Proben wurden bis zur isoelektrischen Fokussierung bei -80 °C gelagert.

2.2.5.5 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Lösungen:

<i>Rehydrierungspuffer</i>	6 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 1 % (w/v) CHAPS 0,5 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 0,4 % (w/v) DTT 0,002 % (w/v) Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung)
<i>Bromphenolblau-Stammlösung</i>	1 % (w/v) Bromphenolblau 50 mM Tris-Base

Die Proteine wurden in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mit dem Fokussierungssystem *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System-UM* durchgeführt.

Verwendung fanden 18 cm lange Gelstreifen mit einem nicht linearen immobilisierten pH-Gradienten von 3-10 (*ImmobilineTM DryStrips*, pH 3-10 NL). Diese wurden zunächst über Nacht (10-15 h) mit je 350 µl Rehydrierungspuffer in einer speziellen Vorrichtung (*Reswelling Tray*) rehydriert. Die gequollenen Streifen wurden danach in die zur *IPGphor* gehörenden Keramikschaalen (*Ettan IPGphor Strip Holder*) gelegt und mit Silikonöl (*Cover Fluid*) überschichtet, um ein Austrocknen der Gelstreifen

während der IEF zu verhindern. Die Probenapplikation erfolgte am anodischen Ende mittels *Cup Loading*, d. h. die Proben wurden in trichterförmige Aufsätze (*Sample Cups*) pipettiert. Bei Durchführung einer 2D-PAGE wurden für eine nachfolgende CBB-Färbung jeweils 550 µg Protein aufgetragen, bei anschließender Silberfärbung 70 µg Protein. Erfolgte eine 2D-DIGE wurden 150 µg Protein appliziert. Sowohl für 2D-PAGE als auch für 2D-DIGE wurden für jede Probe zwei Replikate angefertigt.

Die IEF wurde bei 20 °C und einer konstanten Stromstärke von 50 µA je Gelstreifen bis zum Erreichen von ca. 29.000 Volt-Stunden durchgeführt (s. Tab. 2). Bei Verwendung von 2D-DIGE-Proben erfolgte die IEF im Dunkeln.

Nach beendeter Fokussierung lagerten die Gelstreifen bis zur zweiten Dimension bei -80 °C.

Tab. 2: Protokoll der ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Schritt	Betriebsart	Spannung (V)	Zeit (h:min)	Volt-Stunden (Vh)
1	Step-n-Hold	100	1:00	100
2	Step-n-Hold	150	1:00	150
3	Gradient	500	0:10	54
4	Gradient	4.000	1:30	3.375
5	Step-n-Hold	8.000	-	25.000
Volt-Stunden gesamt				28.679

2.2.5.7 Zweite Dimension

Lösungen:

<i>Äquilibriumspuffer I</i>	6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,05 M Tris-Hydrochlorid, pH 8,8 1 % (w/v) DTT 0,002 % (w/v) Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung)
<i>Äquilibriumspuffer II</i>	6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,05 M Tris-Hydrochlorid, pH 8,8 4 % (w/v) Iodacetamid 0,002 % (w/v) Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung)
<i>Agaroselösung</i>	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Agarose 0,002 % (w/v) Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung)
<i>1 x SDS-Laufpuffer</i>	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS hergestellt mit Aqua dest.

In der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht nach dem Prinzip einer SDS-PAGE.

Die nach der ersten Dimension eingefrorenen Gelstreifen wurden aufgetaut und zwei Äquilibriumsschritten unterzogen. Dazu wurden die Streifen jeweils 15 min unter leichtem Schütteln in speziellen Plastikröhren (*Equilibration Tube Set*) zunächst in Äquilibriumspuffer I und anschließend in Äquilibriumspuffer II inkubiert. Die äquilibrierten Gelstreifen wurden kurz in 1:1 mit Aqua pur. verdünnten 1 x SDS-Laufpuffer getaucht und danach auf die 12,5 %igen SDS-Gele aufgelegt. Um bei der Auswertung der Gele das Molekulargewicht der Proteinspots annähernd bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*) aufgetragen. Dazu wurde ein mit Marker getränktes Filterpapierstück neben den Gelstreifen auf das SDS-Gel aufgebracht. Nach der

Fixierung des Streifens mit 2 ml warmer Agaroselösung wurden die Gelkassetten mit den SDS-Gelen in die Gelelektrophoresekammer *PROTEAN Plus™ Dodeca Cell* eingesetzt, die mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt war. Die zweite Dimension wurde bei 20 °C über Nacht durchgeführt (s. Tab. 4). Bei Verwendung von 2D-DIGE-Proben erfolgte die zweite Dimension im Dunkeln. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald sich die Bromphenolblau-Lauffront ca. 0,5 cm vom unteren Gelende befand.

Tab. 4: Laufbedingungen der zweiten Dimension

Schritt	Stromstärke/Gel (mA)	Zeit (h)	Temperatur (°C)
1	5	2	20
2	15	mind. 16	20

2.2.5.8 Proteindetektion (Färbung, Fluoreszenzmarkierung)

Mit Ausnahme der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mittels 2D-DIGE-Technik ist im Anschluss an die zweite Dimension eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine erforderlich. In dieser Arbeit wurden Silberfärbung und kolloidale Coomassie-Färbung angewandt.

Silberfärbung:

Lösungen:

Alle im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden mit Aqua dest. hergestellt.

<i>Fixierlösung</i>	50 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure
<i>Sensitivierungslösung</i>	0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
<i>Färbelösung</i>	0,1 % (w/v) AgNO_3
<i>Entwicklerlösung</i>	0,04 % (v/v) Formaldehyd (37 %) 2 % (w/v) Na_2CO_3
<i>Stopplösung</i>	5 % (v/v) Essigsäure

Grundlage der Silberfärbung ist eine Anlagerung von Silberionen an die basischen und schwefelhaltigen Aminosäurereste der Proteine. Natriumthiosulfat als starkes Reduktionsmittel bewirkt eine Umwandlung der Silberionen in metallisches Silber.

Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 1 ng Protein. Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Shevchenko *et al.* durchgeführt [Shevchenko *et al.*, 1996].

Tab. 5 gibt einen Überblick über das Färbeprotokoll. Alle Schritte fanden auf dem Schüttler statt. Pro Gel wurden 400 ml Lösung eingesetzt. Nach dem Scannen (s. Kap. 2.2.5.9) wurden die Gele zur weiteren Aufbewahrung bei 4 °C mindestens 2 h in 7 %iger Essigsäure inkubiert und nachfolgend in Schlauchfolie eingeschweißt.

Tab. 5: Protokoll der Silberfärbung nach Shevchenko

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	Dauer
Fixierung	Fixierlösung	ÜN
Waschen	50 % (v/v) Methanol	10 min
Waschen	Aqua dest.	ÜN
Sensitivierung	Sensitivierungslösung	1 min
Waschen	Aqua dest.	2 x 1 min
Silberfärbung	Färbelösung	20 min (bei 4 °C)
Waschen	Aqua dest.	2 x 1 min
Entwicklung	Entwicklerlösung	2 x 3-5 min
Stopp	Stopplösung	3 x 5 min
Lagerung	7 % (v/v) Essigsäure	bis zu mehreren Wochen bei 4 °C

Kolloidale Coomassie-Färbung:**Lösungen:**

Alle im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden mit Aqua dest. hergestellt.

<i>Fixierlösung</i>	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
<i>Färbelösung</i>	0,1 % (w/v) CBB G250 25 % (v/v) Methanol 10 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 % (v/v) Phosphorsäure
<i>Waschlösung</i>	7 % (v/v) Essigsäure

Die Anfärbung präparativer 2D-PAGE-Gele erfolgte mittels kolloidaler CBB-Färbung geringfügig modifiziert nach der Methode von Neuhoff *et al.* [Neuhoff *et al.*, 1988]. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10-30 ng Protein.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die 2D-PAGE-Gele bei RT über Nacht in Fixierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden sie in die Färbelösung gelegt und ebenfalls unter leichtem Schwenken mindestens 24 h angefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch Waschen mit Aqua dest. bis der Gelhintergrund fast vollständig transparent war. Nach dem Scannen (s. Kap. 2.2.5.9) wurden die Gele zur weiteren Aufbewahrung bei 4 °C mindestens 2 h in Waschlösung inkubiert und nachfolgend in Schlauchfolie eingeschweißt.

Fluoreszenzmarkierung von Proteinen:**Lösungen:**

<i>Lysinlösung</i>	10 mM Lysin
<i>2 x Probenpuffer</i>	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % (w/v) CHAPS 2 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 2 % (w/v) DTT

Bei Anwendung der 2D-DIGE-Technik wurden die Proteine vor der IEF mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. In dieser Arbeit wurde das sog. *minimal labelling* durchgeführt, d. h. nur etwa 1-2 % der Lysinreste eines jeden Proteins wurden fluoreszenzmarkiert [Unlu *et al.*, 1997]. Verwendung fanden drei verschiedene Fluorophore, sog. *CyDye DIGE Fluor minimal dyes* (Cy2, Cy3, Cy5).

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden nach Herstellerangaben mit DMF zu 1 mM-Stammlösungen rekonstituiert. Von jeder der drei Stammlösungen wurden 0,8 µl mit 1,5 µl DMF zu einer Gebrauchslösung mit einer *CyDye*-Konzentration von 320 pmol/µl verdünnt. Jeweils 1 µl dieser Gebrauchslösung wurde mit 50 µg Protein des entsprechenden Lysats versetzt. Die Markierung der DMSO-Kontrolle erfolgte mit Cy2, jene der 100 µM FS-Behandlung mit Cy3 und diejenige der 500 µM FS-Behandlung mit Cy5. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis im Dunkeln wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von je 1 µl Lysinlösung und einer erneuten Inkubation für weitere 10 min auf Eis im Dunkeln gestoppt. Anschließend wurden die jeweiligen fluoreszenzmarkierten Proben im Verhältnis 1:1 mit 2 x Probenpuffer verdünnt und für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Alle *Cy*-markierten Proteinlysate wurden vereinigt (150 µg Protein gesamt) und in der nachfolgenden ersten Dimension aufgetrennt (s. Kap. 2.2.5.5).

2.2.5.9 Softwaregestützte Auswertung der Gele

Um eine Aussage über mögliche Veränderungen im Proteom nach FS-Behandlung treffen zu können, mussten die Spotintensität und -lokalisierung der einzelnen Proteinspots zwischen den Gelen unterschiedlicher Behandlung mittels spezieller Software verglichen werden.

In dieser Arbeit erfolgte ein Vergleich des Spotmusters des 2D-Gels der jeweiligen behandelten Gruppe (100 µM FS- bzw. 500 µM FS-Inkubation) mit jenem der DMSO-Kontrollgruppe.

2D-PAGE-Gele:

Für die Auswertung von CBB-gefärbten 2D-PAGE-Gelen wurden diese zunächst mit dem Scanner *PowerLook III* unter Verwendung der Software *Phoretix PowerScan™ 2003.01* im Durchlichtmodus eingescannt (16 bit Graustufen, 300 dpi). Die Spotdetektion, die Quantifizierung der Spotintensitäten, die Überlagerung der 2D-PAGE-Bilddateien von Kontroll- und jeweiliger Behandlungsgruppe (sog. *matching*) sowie die Normalisierung der Spotintensitäten erfolgten automatisch mittels *Proteomweaver*-Software (Version 3.0.9.3). Gegebenenfalls wurde eine manuelle Korrektur durch den Benutzer vorgenommen, sofern Spots von der Software fehlerhaft detektiert oder falsch gematcht wurden. Es wurden letztendlich nur die Spots berücksichtigt, die in allen Replikaten vorhanden waren. Um eine Aussage über eine mögliche Expressionsänderung eines bestimmten Proteins nach FS-Behandlung treffen zu können, wurden diejenigen Spots ausgewählt, deren durchschnittliche Spotintensität aus mehr als drei unabhängigen Experimenten mindestens um den Faktor 0,5 bzw. 2 zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe variierte (per Definition der *Proteomweaver*-Software: $\text{Regulationsfaktor}_{2\text{D-PAGE}} \leq 0,5$ bzw. $\geq 2,0$).

2D-DIGE-Gele:

Im Anschluss an die zweite Dimension wurden 2D-DIGE-Gele mit dem Fluoreszenzscanner *Typhoon Trio+* gescannt. Dazu wurden die Gele aus den Glas-kassetten herausgenommen, luftblasenfrei auf die Scanneroberfläche gelegt und mit einer Auflösung von 100 µm pro Pixel gescannt. Tab. 6 gibt einen Überblick über die Scanparameter:

Tab. 6: Verwendete Parameter für den Fluoreszenzscan (*Typhoon Trio+*)

Fluorophor	Emissionsfilter	Laser	Photomultiplier
Cy2	520 nm BP 40	Blau (488 nm)	460 V
Cy3	580 nm BP 30	Grün (532 nm)	460 V
Cy5	670 nm BP 30	Rot (633 nm)	460 V

Die Auswertung der 2D-DIGE-Bilddateien erfolgte mit der Software *DeCyder*TM 6.5. Zunächst wurde mittels DIA-Modul (DIA = *Differential In-gel Analysis*) eine automatische Spottedetektion innerhalb der drei Bilddateien eines 2D-DIGE-Gels durchgeführt. Die Quantifizierung der Spots wurde durch die Normalisierung der Spotvolumina sowie durch die Berechnung der sog. *Spot Volume Ratios* erreicht. Die *Volume Ratio* beschreibt das Verhältnis der berechneten Volumina eines bestimmten Spots in den verschiedenen Bilddateien eines 2D-DIGE-Gels. Die DIA-generierten Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden anschließend mit Hilfe des BVA-Software-Moduls (BVA = *Biological Variation Analysis*) ausgewertet. Dabei wurden 2D-DIGE-Bilddateien verschiedener Experimente automatisch gematcht. Für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse wurden letztendlich nur diejenigen Spots berücksichtigt, die in allen Replikaten vorhanden waren und deren durchschnittliche *Volume Ratio* aus drei unabhängigen Experimenten mindestens um den Faktor 0,5 bzw. 2 zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe variierte (per Definition der *DeCyder*-Software: Regulationsfaktor_{2D-DIGE} ≤ -2,0 bzw. ≥ 2,0).

2.2.6 Massenspektrometrie

2.2.6.1 Enzymatischer Verdau der Proteine

Lösungen:

<i>Waschlösung</i>	100 mM NH ₄ HCO ₃
<i>Entfärbelösung</i>	50 % (v/v) ACN 50 mM NH ₄ HCO ₃
<i>Dehydrationslösung</i>	50 % (v/v) ACN
<i>Verdaupuffer</i>	50 mM NH ₄ HCO ₃ 5 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O
<i>Trypsinlösung</i>	50 mM NH ₄ HCO ₃ 5 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 25 ng Trypsin (<i>Proteomics Grade</i>) pro µl Puffer
<i>Extraktionspuffer I</i>	20 mM NH ₄ HCO ₃
<i>Extraktionspuffer II</i>	5 % (v/v) Ameisensäure 50 % (v/v) ACN
<i>Aufnahmepuffer</i>	0,01 % (v/v) TFA 15 % (v/v) ACN hergestellt mit Aqua _{MS}

An die softwaregestützte Auswertung der Gele schloss sich der tryptische Verdau der CBB-gefärbten Proteinspots zur nachfolgenden massenspektrometrischen Identifizierung an. Der Trypsinverdau erfolgte geringfügig modifiziert nach der Methode von Macours *et al.* [Macours *et al.*, 2003]. Die Arbeitsschritte der Proteinreduktion mittels DTT gefolgt von einer Alkylierung von Thiolgruppen durch Iodacetamid im Originalprotokoll konnten ausgelassen werden, da diese schon während der Äquilibrierung der Gelstreifen in der zweiten Dimension erfolgt waren (s. Kap. 2.2.5.7).

Zunächst wurden die ermittelten regulierten Spots mit Hilfe eines Biopsiestanzers aus der Gelmatrix ausgestanzt und jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Kleinere Spots wurden aus mehreren Gelen vereinigt. Nach Zerkleinerung der Spots wurden diese in je 50 µl Waschlösung kurz gewaschen. Die Entfärbung der Gelstücke wurde durch die Zugabe von 50 µl Entfärbelösung und einer 20-minütigen Inkubation erreicht. Danach wurden die Spots mit 50 µl Dehydrationslösung geschrumpft (5-minütige Inkubation) und anschließend im Vakuumkonzentrator

SpeedVac SPD 111V für 5 min getrocknet. Nach 10-minütigem Waschen der Gelstücke mit Waschlösung erfolgte ein erneutes Schrumpfen mit Dehydrationslösung für 10 min. Der gesamte Vorgang wurde wiederholt. Daran schloss sich abermals eine Trocknung für 5-10 min im Vakuumkonzentrator an. Die Proben wurden jeweils mit 25 µl Trypsinlösung versehen und für 45 min im Eisbad inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand, sofern vorhanden, verworfen. Zu den Spots wurden je 5 µl Verdaupuffer pipettiert. Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht (mindestens 18 h) bei 37 °C unter Schütteln (350 rpm) im Thermoblock. Zur Peptidextraktion wurden die Proben für 20 min mit 25 µl Extraktionspuffer I versetzt. Der Peptidextrakt wurde nachfolgend abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Extraktion, die noch zweimal wiederholt wurde, erfolgte durch Zugabe von je 25 µl Extraktionspuffer II (20-minütige Inkubation). Alle Extrakte der jeweiligen Probe wurden vereinigt und im Vakuumkonzentrator eingetrocknet. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die eingetrockneten Peptidextrakte in je 50 µl Aufnahme-puffer gelöst, für 10 min bei 2.000 x g über Spinfilter zentrifugiert und die Filtrate in µ-Vials überführt.

2.2.6.2 Analyse der Peptidextrakte mittels LC-ESI-MS/MS

Lösungen:

Eluent A 0,012 % (v/v) TFA
hergestellt mit Aqua_{MS}

Eluent B 0,01 % (v/v) TFA
in 80 % (v/v) ACN
hergestellt mit Aqua_{MS}

Die durch den tryptischen Proteinverdau erhaltenen Peptidextrakte wurden mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Die stationäre Phase in der LC/MS bildete die HPLC-Säule *Jupiter Proteo* unter Verwendung von Vorsäulenkartuschen *MaxRP*. Die Thermostatisierung betrug 40 °C; das Probenvolumen umfasste jeweils 15 µl. Die Elution erfolgte in Form eines linearen Gradienten bei einer Flussrate von 250 µl/min (s. Tab. 7). Die Detektion bei 214 nm und 280 nm wurde im Auto MS/MS-Modus durchgeführt.

Tab. 7: Elutionsgradient für die LC/MS

Zeit (min)	0	5	62	68	75	75,5	95
Eluent A (%)	98	98	60	0	0	98	98
Eluent B (%)	2	2	40	100	100	2	2

Das Eluat der HPLC wurde mittels Elektrospray ionisiert (*Nebulizer* 40 psi, *Dry Gas* 9 l/min, *Dry Temp.* 350 °C). Die Kapillarspannung betrug 3.500 V. Die Aufnahme der MS- und MS/MS-Spektren erfolgte an einer *Ion Trap XCT* im *Standard-Enhanced-Modus* (8.100 m/z) bzw. im *Ultra Scan-Modus* mit 26.000 m/z unter den in der Tab. 8 angegebenen Bedingungen. Als Kollisionsgas wurde Helium verwendet. Die Kollisionsspannung lag zwischen 0,3 und 2,2 V. Die Detektion der Precursor- und Fragmentationen wurde im *Positiv Scan-Modus* durchgeführt. Die Identifizierung der Peptide anhand von Molekülionenmassen $[M+H]^+$ und MS-MS-Fragmentspektren erfolgte mit Hilfe der Datenbank *Spectrum Mill Proteomics Workbench 3.02.060a*. Zur weiteren Auswertung wurde die Datenbank *Swiss-Prot* (www.expasy.ch/sprot/) herangezogen.

Tab. 8: Geräteparameter LC-ESI-MS/MS

Aktives Segment		2	3
Gruppe	Parameter	1.9-10.1 min	10.1-73.5 min
ESI-Source	Nebulizer (N2)	40 psi	40 psi
	Dry Gas	9 l/min	9 l/min
	Dry Temperature	350 °C	350 °C
	Capillary Voltage	-3.500 V	-3.500 V
	End Plate Offset	-500 V	-500 V
Trap/MS-Scan	Scan Speed	8.100 m/z /sec	8.100 m/z /sec
	Smart Parameter Settings (SPS)	on	on
	Target Mass	400 m/z	900 m/z
	Compound Stability	100 %	100 %
	Trap Drive Level	100 %	100 %
	Polarity	positive	positive
	Trap Filling Smart Target	200.000 (cts)	200.000 (cts)
	Max. Accumulation Time	200.00 msec	200.00 msec
	Scan Range	100-1.500 m/z	100-2.200 m/z
	Averages	5 scans	5 scans
MS(n)-Parameter	Auto-MS (n) /SPS	2 / on	2 / on
	Precursor Selection	100-2.200 m/z	100-2.200 m/z
	Exclude Precursor-Masses	-	-
	Nr. of Precursors	4	4
	Threshold	20.000 (cts)	20.000 (cts)
	Exclude Single Charged Ions	off	off
	Prefer Double Charged Ions	off	off
	Preferred Masses	off	off
	MS/MS Fragment. Amplitude	0.30-2.00 V (1.00 V)	0.30-2.00 V (1.00 V)
	MS(2) Averages	5 scans	5 scans
	Isolation width	4 m/z	4 m/z
	Scan Speed MS(2)	26.000 m/z /sec	26.000 m/z /sec

2.2.7 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.2.7.1 Induktion mit Ferulasäure

Um den Einfluss von verschiedenen FS-Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Proteinexpression zu analysieren, wurden pro 6-well 1×10^6 bzw. pro 12-well $0,5 \times 10^6$ vitale HT29 Klon 19A-Zellen in 3 ml bzw. 1,5 ml Kulturmedium ausgesät. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Zelldichte wurden pro Vertiefung einer 12-well-Zellkulturplatte $0,2 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$ bzw. $0,6 \times 10^6$ vitale HT29 Klon 19A-Zellen in 1,5 ml Medium angezüchtet. Wurde eine Zellfraktionierung nach FS-Behandlung vorgenommen, erfolgte die Aussaat von 3×10^6 lebenden HT29 Klon 19A-Zellen in 10 ml Kulturmedium pro 10 cm-Zellkulturschale.

Nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an FS in Kulturmedium inkubiert. Bei den Zelldichteexperimenten erfolgte die Substanzzugabe generell am zweiten Tag nach der Aussaat. Eingesetzt wurde eine 1 M FS-Stammlösung in DMSO, wobei die Endkonzentration an DMSO nicht mehr als 0,2 % betrug. DMSO-behandelte Zellen dienten als Lösungsmittelkontrolle. Die Inkubation fand unter Standardzellkulturbedingungen statt, wobei die Inkubationszeiten variierten.

2.2.7.2 Probenaufarbeitung

Gesamtproteinextrakte:

Lösungen:

<i>1 x Lysispuffer</i>	10 % (v/v) 10 x Lysispuffer 1 mM PMSF (Zugabe in Form einer 500 mM Stammlösung)
<i>PMSF-Stammlösung</i>	500 mM PMSF

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und pro 6-well mit jeweils 400 µl bzw. pro 12-well mit je 200 µl 1 x Lysispuffer versetzt. Die Zellkulturplatte wurde für 20 min bei 300 rpm und 4 °C auf dem Plattenschüttler geschüttelt. Danach wurden die Zelllysate jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei 2.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände, die die Proteine enthielten, wurden abgenommen und in neue

1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Nach erfolgter Proteinbestimmung lagerten die Proben bei -20 °C.

Proteinextrakte nach Zellfraktionierung:

Lösungen:

<i>Hypotoner Puffer</i>	10 mM Tris-Hydrochlorid, pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 10 mM KCl 0,5 mM DTT 1 mM PMSF (s. Gesamtproteinextrakte) 0,05 % (v/v) Proteaseinhibitor-Stammlösung (s. Kap. 2.2.5.3)
-------------------------	--

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte modifiziert nach der Methode von Goncalves *et al.* [Goncalves *et al.*, 1994].

Nach erfolgter Inkubation mit FS wurden die Zellen zunächst zweimal mit je 3 ml eiskaltem PBS⁻ gewaschen und nachfolgend in 3 ml frischem PBS⁻ mittels eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension von drei 10 cm-Zellkulturschalen wurde in ein vorgekühltes 15 ml-PP-Röhrchen pipettiert und für 10 min bei 1.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml frischem PBS⁻ aufgenommen, die Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 10 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 300 µl hypotonem Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen vollständig aufzubrechen, wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer 1 ml-Insulinspritze 15-mal durch eine 22G-Kanüle gezogen. Eine 5-minütige Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C schloss sich an, um die Zellkerne vom Zytoplasma zu separieren. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und zur weiteren Auftrennung in Zytoplasma und Plasmamembran für 30 min bei 50.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet repräsentierte die Membranfraktion, der Überstand die Zytoplasmafraktion. Das Zellkernpellet wurde mit 150 µl hypotonem Puffer versetzt und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (25.000 x g, 20 min, 4 °C) von zytoplasmatischen Überresten aufgereinigt. Der Grad des Zellaufschlusses sowie der Reinheitsgrad der Zellkerne wurden mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie überprüft. Zur Solubilisierung der Proteine wurde die Kernfraktion mit 300 µl, die Membranfraktion mit 30 µl 1 x Lysispuffer (s. Gesamtproteinextrakte) versetzt. Die Zytoplasmafraktion wurde

unmittelbar für die spätere elektrophoretische Auftrennung eingesetzt. Nach erfolgter Proteinbestimmung lagerten die Proben bei -80 °C.

2.2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [Bradford, 1976] mittels *Bradford Protein Assay*.

Zur Herstellung einer Eichgeraden dienten BSA-Konzentrationen von 0,025, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75 und 1 mg/ml als Standards. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. 10 µl BSA-Standard bzw. 5 µl Probe wurden mit 500 µl dieser Gebrauchslösung versetzt. Die spektralphotometrische Messung der Extinktionen und Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels des Spektrophotometers *BioPhotometer*.

2.2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung

Lösungen:

<i>5 x SDS-Probenpuffer</i>	0,3 M Tris-Base 25 % (w/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 50 mM DTT 2,5 mM EDTA einige Körnchen Bromphenolblau	
<i>Sammelgellösung (5 %)</i>	Ansatz für ein Minigel: AA/BisAA-Lösung 30 %/0,8 % 0,5 M Tris-Hydrochlorid, pH 6,8 10 % (w/v) SDS Aqua pur. TEMED 10 % (w/v) APS Bromphenolblau	0,33 ml 0,5 ml 20 µl 1,17 ml 2 µl 15 µl Körnchen
<i>Trenngellösung (10 %)</i>	Ansatz für ein Minigel: AA/BisAA-Lösung 30 %/0,8 % 1,5 M Tris-Hydrochlorid, pH 8,8 10 % (w/v) SDS Aqua pur. TEMED 10 % (w/v) APS	2,7 ml 3,0 ml 80 µl 2,3 ml 7 µl 40 µl
<i>1 x SDS-Laufpuffer</i>	25 mM Tris-Base 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS hergestellt mit Aqua dest.	

Es wurden 1 mm dicke SDS-Gele bestehend aus einem 10 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel in einer Größe von 8 cm x 8 cm gegossen. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C gekocht und danach für 5 min bei 13.400 x g zentrifugiert. Pro Geltasche wurden 10 µg Protein aufgetragen. Als Marker wurde der Molekulargewichtsmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet. Die Elektrophorese in der Gel-elektrophoresekammer *Minigel Twin* erfolgte bei 15 mA pro Gel und einer konstanten Spannung von 120 V für 1,5-2 h je nach Größe des nachzuweisenden Proteins.

2.2.8 Western Blot

Lösungen:

Alle im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden mit Aqua dest. hergestellt.

<i>Anodenpuffer I</i>	0,3 M Tris-Base 20 % (v/v) Methanol
<i>Anodenpuffer II</i>	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol
<i>Kathodenpuffer</i>	25 mM Tris-Base 40 mM ϵ -Aminocapronsäure 20 % (v/v) Methanol
<i>Ponceau-Färbelösung</i>	0,5 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Essigsäure

Die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte durch Halbtrocken-Blotting, sog. *semi dry*-Methode.

Zunächst wurde die Membran zum Benetzen 5 min in Methanol inkubiert, danach kurz in Aqua dest. gespült und in Anodenpuffer II äquilibriert. Zwei Filterpapiere in der Größe der Membran wurden in Anodenpuffer I inkubiert und auf die Anodenseite der Western-Blot-Apparatur *Trans-Blot[®] SD Cell* gelegt. Ein Filterpapier, ebenfalls getränkt in Anodenpuffer II, wurde auf die beiden ersten Filterpapiere aufgebracht. Darauf wurde die Membran gelegt, nachfolgend das SDS-Gel. Den Abschluss bildete ein in Kathodenpuffer inkubiertes Filterpapier. Der Transfer für eine Membran der Größe 8,5 cm x 6 cm wurde bei 230 mA und maximal 25 V für 20 min durchgeführt. Im Anschluss an den Western Blot erfolgte eine reversible Proteinfärbung mit Ponceau-Färbelösung.

2.2.8.2 Strippen von Membranen

Lösungen:

<i>TBST</i>	s. Kap. 2.2.8.1
<i>Stripppuffer</i>	0,8 M Glycin mit HCl auf pH 2,5 einstellen
<i>Stripplösung</i>	30 % (v/v) Stripppuffer hergestellt mit Aqua dest.

Um bereits gebundene Antikörper von der Membran für einen weiteren Protein-nachweis zu entfernen, wurde die Membran dreimal für jeweils 30 min in TBST gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation der Membran in Stripplösung bei RT schlossen sich drei weitere Waschschrte mit TBST à 30 min an. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bereits in Kap. 2.2.8.1 beschrieben.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Real Time-Modus

2.2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus mit FS induzierten Zellen (Vorgehensweise analog zur FS-Induktion bei SDS-PAGE s. Kap. 2.2.7.1) erfolgte mit dem Kit *Perfect RNATM Eukaryotic Mini* gemäß den Herstellerangaben. Zum Schutz vor Proteasen wurde pro 60 µl RNA-Eluat 1 µl Ribonuklease-Inhibitor *Prime RNase InhibitorTM* zugegeben. RNA-Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.9.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Lösungen:

<i>DEPC-Wasser</i>	0,1 % (v/v) DEPC Inkubation ÜN bei RT mit anschließendem Autoklavieren
<i>1 x TE-Puffer</i>	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA mit HCl auf pH 8,0 einstellen

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurden 2 µl Probe mit 68 µl TE-Puffer versetzt. Die Messung erfolgte photometrisch in einer Quarzküvette bei 260 nm mittels des Spektrophotometers *BioPhotometer* (1 Absorptionseinheit entspricht etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA).

2.2.9.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

<i>10 x MOPS-Puffer</i>	0,2 M MOPS 50 mM C ₂ H ₃ NaO ₂ 10 mM EDTA hergestellt mit DEPC-Wasser mit NaOH auf pH 7 einstellen														
<i>1 x MOPS-Laufpuffer</i>	10 % (v/v) 10 x MOPS-Puffer in DEPC-Wasser														
<i>3 x RNA-Probenpuffer</i>	<table> <tbody> <tr> <td>Formamid, deionisiert</td> <td>3,6 ml</td> </tr> <tr> <td>10 x MOPS-Puffer</td> <td>2,3 ml</td> </tr> <tr> <td>37 % Formaldehyd</td> <td>1,3 ml</td> </tr> <tr> <td>80 % Glycerin</td> <td>0,5 ml</td> </tr> <tr> <td>Ethidiumbromid</td> <td>25 µl</td> </tr> <tr> <td>0,5 M EDTA</td> <td>14 µl</td> </tr> <tr> <td>Bromphenolblau</td> <td>Körnchen</td> </tr> </tbody> </table>	Formamid, deionisiert	3,6 ml	10 x MOPS-Puffer	2,3 ml	37 % Formaldehyd	1,3 ml	80 % Glycerin	0,5 ml	Ethidiumbromid	25 µl	0,5 M EDTA	14 µl	Bromphenolblau	Körnchen
Formamid, deionisiert	3,6 ml														
10 x MOPS-Puffer	2,3 ml														
37 % Formaldehyd	1,3 ml														
80 % Glycerin	0,5 ml														
Ethidiumbromid	25 µl														
0,5 M EDTA	14 µl														
Bromphenolblau	Körnchen														
<i>Agarosegellösung</i>	Ansatz für ein RNA-Kleingel: Agarose 0,5 g DEPC-Wasser 37 ml 10 x MOPS-Puffer 5 ml kochen und im Wasserbad auf 50 °C abkühlen 37 % Formaldehyd 7,8 ml														

Zur Kontrolle der Integrität der isolierten RNA wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1 µg RNA der jeweiligen Probe mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt. Nach Zugabe von 5 µl 3 x RNA-Probenpuffer wurde dieser Ansatz für 5 min bei 95 °C gekocht und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der Gelelektrophoresekammer *EasyCastTM Horizontal System B1A* mit 1 x MOPS-Laufpuffer für etwa 30 min bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die Banden wurden nachfolgend mit Hilfe des Geldokumentationsgeräts *GeneFlash* sichtbar gemacht. Die Auftrennung der RNA in ihren 28S- und 18S-Anteil deutet darauf hin, dass die RNA intakt und nicht degradiert ist.

2.2.9.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die isolierte RNA wurde mittels der RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Alle Schritte erfolgten im PCR-Cycler *Px2 Thermal Cycler*. Zunächst wurde 1 µg RNA mit 1 µl Random Hexamer-Primer (100 pmol/µl) sowie 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und mit Aqua_{PCR} auf ein Volumen von 12 µl verdünnt. Diese Mischung wurde für 5 min bei 65 °C im PCR-Block inkubiert. Danach wurden 4 µl 5 x Erst Strang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl Ribonuklease-Inhibitor *RNaseOut* (40 U/µl) zugegeben und alles für 2 min bei 37 °C erwärmt. Nach Zugabe von 1 µl M-MLV Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde die RT-PCR gestartet (s. Tab. 10). Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

Tab. 10: Protokoll der RT-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	25	10
2	37	50
3	70	15

2.2.9.5 Real Time-PCR

Die Real Time-PCR erfolgte unter Verwendung des PCR-Cyclers *Mastercycler® ep realplex*. Von jeder cDNA-Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Normalisierung des jeweiligen Zielgens diente das *Housekeeping-Gen* Aldolase A als Referenzgen. Pro Zielgen wurde eine Negativkontrolle (*non template control*) mitgeführt. Zunächst wurde 1 ml Mastermix *RealMasterMix* (2,5 x) mit 125 µl 20 x *SYBR Green* versetzt. Für jede cDNA-Probe wurden 15 µl Mastermix-Ansatz bestehend aus 9 µl *RealMasterMix/SYBR Green*, je 0,4 µl des *antisense*- bzw. *sense*-Primers (10 pmol/µl) des jeweiligen Zielgens sowie 5,2 µl Aqua_{PCR} in eine Vertiefung der PCR-Platte pipettiert. Nachfolgend wurden pro Vertiefung je 5 µl cDNA-Probe in einer Verdünnung von 1:400 bzw. Aqua_{PCR} für die Negativkontrolle zugegeben. Das Protokoll der Real Time-PCR ist in Tab. 11 veranschaulicht.

Den Abschluss der Real Time-PCR bildete eine Schmelzkurve (20 min bei 95 °C). Die Quantifizierung erfolgte anhand der $\Delta\Delta CT$ -Methode [Livak & Schmittgen, 2001].

Dabei wurde der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des jeweiligen Zielgens subtrahiert (Δ CT). Die beiden Δ CT-Werte der einzelnen Gruppen (FS-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle) wurden anschließend voneinander abgezogen ($\Delta\Delta$ CT).

Tab. 11: Protokoll der Real Time-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initialisierung	95	120	1
Denaturierung	95	20	45
Annealing/Elongation	60	40	

2.2.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Lösung:

Blockierungslösung

Ansatz pro Deckglas:	
1 % (w/v) BSA in PBS ⁺⁺	45 μ l
Normalserum (Ziege)	5 μ l

Durch indirekte Immunfluoreszenz lassen sich markierte Antigene in der Zelle sichtbar machen. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers an einen Primärantikörper, der gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist.

Zunächst wurden je 1×10^5 vitale HT29 Klon 19A-Zellen auf einem sterilen Deckglas in 6-well-Zellkulturplatten in jeweils 2 ml Kulturmedium angezchtet. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit FS in unterschiedlichen Konzentrationen induziert, wobei die Endkonzentration an DMSO 0,5 % betrug. Um mögliche Lösungsmittel-effekte ausschließen zu können, wurde pro Versuchsansatz zusätzlich eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Nach 4- bzw. 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und nachfolgend mit je 2 ml eiskaltem Methanol für 5 min bei RT fixiert und permeabilisiert. Daran schloss sich ein dreimaliges Waschen der Zellen mit jeweils 2 ml PBS⁺⁺ an. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation der Zellen in Blockierungslösung bei RT abgesättigt. Dazu wurden 50 μ l Blockierungslösung auf die auf dem Deckglas angewachsenen Zellen pipettiert und ein Stück Parafilm entsprechend

der Größe des Deckglases aufgelegt, um eine bestmögliche Verteilung zu gewährleisten. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit jeweils 2 ml PBS⁺⁺ schloss sich eine zweistündige Inkubation mit 50 µl Primärantikörperlösung bei RT an. Wiederum wurden die Zellen dreimal gewaschen und für 1 h mit 50 µl Sekundärantikörperlösung bei RT im Dunkeln behandelt. Es folgte eine 20-minütige DAPI-Färbung bei RT im Dunkeln, nachdem die Zellen erneut dreimal gewaschen worden waren. Nach einem Waschschrift mit PBS⁺⁺, gefolgt von einem kurzen Spülen der Zellen mit Aqua dest., wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger gelegt, der mit einem Tropfen Antifade versehen wurde.

Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper/Fluorochrome und ihre jeweilige Verdünnung gibt Tab. 12.

Tab. 12: Verwendete Antikörper/Fluorochrome in der indirekten Immunfluoreszenz

Antikörper/Fluorochrom	Verdünnung
Primärantikörper: Anti-Annexin II in Blockierungslösung	1 : 250
Sekundärantikörper: Anti-mouse IgG FITC in Blockierungslösung	1 : 200
DAPI in PBS ⁺⁺	1 : 10.000

Die mikroskopische Betrachtung der markierten Zellen wurde mit dem *Axioskop 40 FL* unter Verwendung entsprechender Filter durchgeführt (Tab. 13). Die mehrdimensionale Bildaufnahme erfolgte mittels der Digitalkamera *AxioCam MRc* sowie der Software *AxioVision 4.6.1.0*.

Tab. 13: Verwendete Filter für die Fluorochromdetektion (*Axioskop 40 FL*)

Fluorochrom	Anregung	Strahlteiler	Emission
FITC/Alexa 488	450-490 nm BP	510 nm FT	515 nm LP
DAPI	365 nm G	395 nm FT	420 nm LP

3 Ergebnisse

Die Erkenntnisse aus verschiedenen epidemiologischen Studien geben Anlass zur Vermutung, dass ein hoher Obst- und Gemüseverzehr das Kolonkrebsrisiko nachhaltig senken kann. Neben Ballaststoffen und Vitaminen wird sekundären Pflanzenstoffen ein präventiver Einfluss auf die Darmkrebsentstehung zugeschrieben. Bereits mehrfach konnten risikosenkende Effekte der Phenolsäure Ferulasäure nachgewiesen werden. Um mögliche Wirkmechanismen von Ferulasäure aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche *in vitro*-Experimente mit HT29 Klon 19A-Zellen durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden.

3.1 Stabilität von Ferulasäure unter Zellkulturbedingungen

Um die Stabilität von Ferulasäure unter Standardzellkulturbedingungen zu untersuchen, wurden fünf verschiedene Ferulasäurekonzentrationen (5, 10, 50, 100 und 500 μM) in einer Endkonzentration von 0,5 % DMSO verwendet und für maximal 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Stabilitätsmessung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels HPLC. Die Ferulasäurestabilität errechnete sich im Vergleich zum jeweiligen 0 h-Wert.

500 μM Ferulasäure war über einen Zeitraum von 48 h nahezu 100 % stabil (s. Abb. 4). Bei einer verwendeten Konzentration von 100 μM war nach etwa 4 h ein leichter Stabilitätsverlust zu verzeichnen; nach einem Inkubationszeitraum von 48 h betrug die Stabilität noch 95 %. Eine über zehnprozentige Abnahme der Ferulasäurestabilität nach 48 h war bei einer Konzentration von 50 μM erreicht.

Ebenso wurde neben der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel der Einfluss von Ethanol (Endkonzentration 2 %) auf die Ferulasäurestabilität untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog dem Ansatz Ferulasäure in DMSO. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant von denjenigen bei Gebrauch des Lösungsmittels DMSO (Ergebnisse nicht gezeigt).

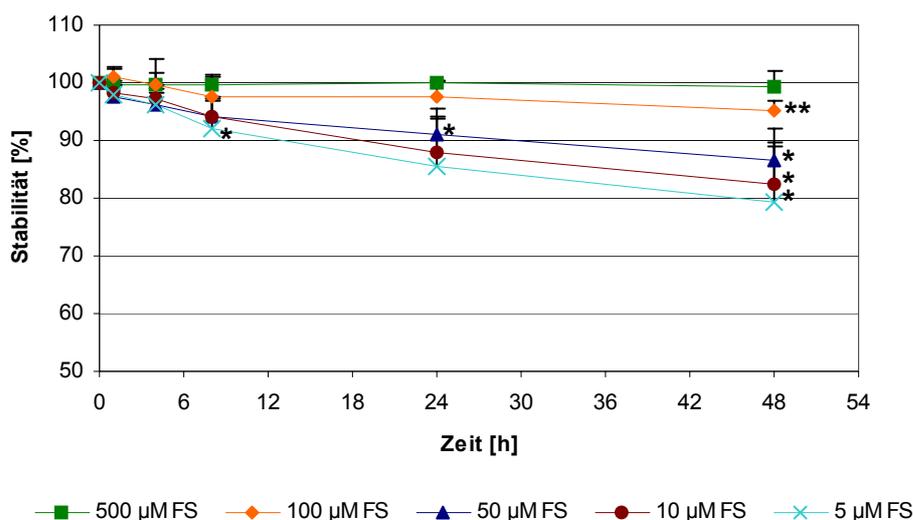


Abb. 4: Stabilität von Ferulasäure unter Standardzellkulturbedingungen

Verschiedene FS-Konzentrationen (5, 10, 50, 100 und 500 µM; Endkonzentration an DMSO 0,5 %) wurden in DMEM als Kulturmedium gelöst und unter Standardkulturbedingungen (wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 5 % CO₂, 37 °C) für maximal 48 h inkubiert. Nach 0, 1, 4, 8, 24 und 48 h wurde jeweils ein Aliquot der inkubierten Lösung entnommen und im Verhältnis 1:5 mit 1 %iger Ameisensäure (30 % ACN, 70 % Aqua_{MS}) versetzt. Die nachfolgende FS-Analyse erfolgte mittels HPLC. Dargestellt sind die ermittelten Stabilitätsraten (in %) im Vergleich zum jeweiligen 0 h-Wert aus drei unabhängigen Experimenten (MW+SD). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3.2 Zytotoxizität von Ferulasäure

Ob Ferulasäure möglicherweise zytotoxische bzw. antiproliferative Effekte auf HT29 Klon 19A-Zellen ausübt, wurde mittels MTT-Test untersucht. Fünf verschiedene Ferulasäurekonzentrationen (100 µM, 500 µM, 1 mM, 3 mM und 5 mM) wurden auf ihre zytotoxische Wirkung bei einer 24-stündigen Inkubation der Zellen getestet. Eventuelle Lösungsmittelleffekte sollten am Beispiel von DMSO und Ethanol bestimmt werden (DMSO- bzw. EtOH-Endkonzentration: 0,5 % bzw. 2 %). Die Vitalitätsrate der Zellen wurde photometrisch über die Umsetzung an MTT im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle ermittelt.

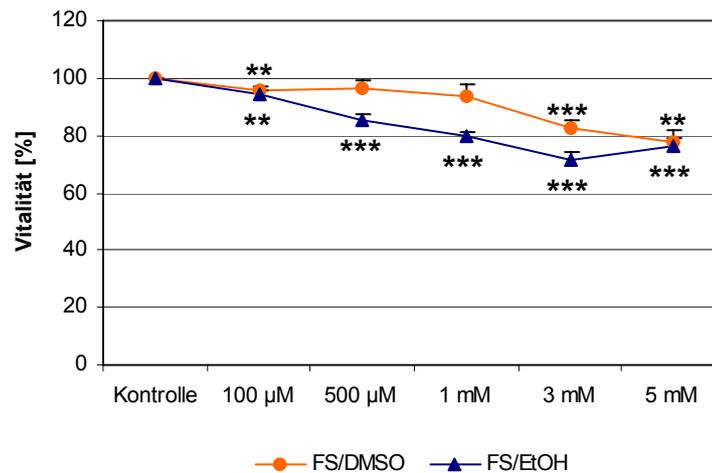


Abb. 5: Einfluss von Ferulasäure auf die Vitalität von HT29 Klon 19A-Zellen

30.000 HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit verschiedenen FS-Konzentrationen (100, 500 µM; 1, 3, 5 mM) in DMSO bzw. EtOH (Endkonzentration 0,5 % bzw. 2 %) für 24 h inkubiert. Zusätzlich wurde eine DMSO- bzw. eine EtOH-Kontrolle eingesetzt. Nach der Behandlung wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Test photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die ermittelten Vitalitätsraten (in %) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle aus vier unabhängigen Experimenten (MW+SD). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Ein hoch signifikanter wachstumshemmender Effekt nach 24 h-Inkubation mit Ferulasäure zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 100 µM Ferulasäure in DMSO bzw. Ethanol, wobei die Vitalität der HT29 Klon 19A-Zellen jeweils um lediglich 5 % abnahm (s. Abb. 5). Eine mindestens zehnpromtente Verminderung der Zellviabilität wurde bei der Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel durchschnittlich ab einer 500 µM Ferulasäurekonzentration erreicht, bei Ferulasäure in DMSO erst ab einer Konzentration von 3 mM. Bei 24-stündiger Inkubation mit 5 mM Ferulasäure in DMSO bzw. Ethanol kam es jeweils zu einem etwa zwanzigprozentigen Vitalitätsverlust.

3.3 Apoptoseinduktion durch Ferulasäure

Eine mögliche Apoptoseinduktion durch Ferulasäure wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V-Methode untersucht. Insgesamt wurden vier verschiedene Ferulasäurekonzentrationen analysiert (500 μM , 1 mM, 3 mM und 5 mM), wobei potenzielle Lösungsmittelleffekte am Beispiel von DMSO und Ethanol bestimmt werden sollten. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 0,5 μM Staurosporin in Kombination mit 0,5 μM Brefeldin A behandelt wurden. Die Endkonzentration an DMSO im Kulturmedium betrug 0,5 %, diejenige von Ethanol 2 %. HT29 Klon 19A-Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen Annexin V-FITC/PI-gefärbt und die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch bestimmt. Die Apoptoserate errechnete sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

Abb. 6 zeigt beispielhaft Dot-Plot-Abbildungen der durchflusszytometrischen Messung nach Annexin V-FITC/PI-Färbung der entsprechend behandelten HT29 Klon 19A-Zellen.

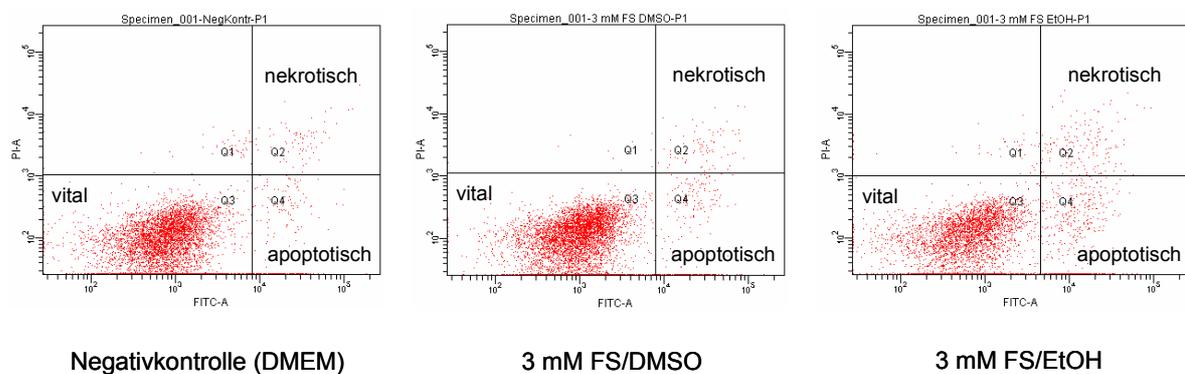


Abb. 6: Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse von Annexin V-FITC/PI-gefärbten HT29 Klon 19A-Zellen

Der linke Dot-Plot zeigt die unbehandelte Negativkontrolle (DMEM); der mittlere Dot-Plot veranschaulicht die Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 3 mM FS/DMSO, während der rechte Dot-Plot die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 3 mM FS/EtOH zeigt. Der linke untere Quadrant verdeutlicht vitale (FITC⁻/PI⁻), der rechte untere Quadrant apoptotische (FITC⁺/PI⁻) und der rechte obere Quadrant nekrotische Zellen (FITC⁺/PI⁺).

Abb. 7 zeigt, dass Ferulasäure in steigender Konzentration eine verstärkte Apoptoseinduktion in behandelten HT29 Klon 19A-Zellen im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle bewirkte. Allerdings erfolgte erst ab einer Konzentration von 3 mM eine signifikante Steigerung der Apoptoserate unabhängig von der Wahl des Lösungsmittels. Ethanolische Ferulasäure führte zu einer allgemein höheren Zunahme apoptotischer Zellen relativ zur EtOH-Kontrolle als Ferulasäure in DMSO relativ zur DMSO-Kontrolle.

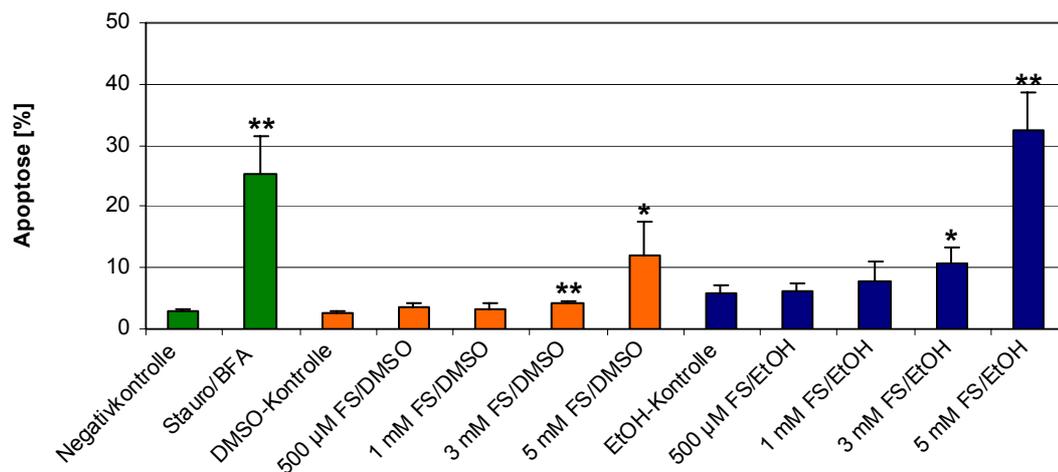


Abb. 7: Einfluss von Ferulasäure auf die Apoptoseinduktion in HT29 Klon 19A-Zellen

1×10^6 HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und bei etwa 80-85 % Konfluenz mit verschiedenen FS-Konzentrationen (500 µM; 1, 3, 5 mM) in DMSO bzw. EtOH (Endkonzentration 0,5 % bzw. 2 %) für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium (DMEM) verwendet; als Positivkontrolle wurden je 0,5 µM Staurosporin und Brefeldin A eingesetzt. Zusätzlich wurde eine DMSO- bzw. eine EtOH-Kontrolle verwendet. Nach der Behandlung wurden die Zellen Annexin V-FITC/PI-gefärbt und die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die ermittelten Apoptoseraten (in %) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten (MW+SD). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3.4 Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen

Inwieweit Ferulasäure das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen beeinflusst, wurde mittels Proteomanalyse untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden der zweidimensionalen Gelelektrophorese durchgeführt, die 2D-PAGE- sowie die 2D-DIGE-Technik. Prinzip beider Varianten ist die isoelektrische Fokussierung der Proteine in einer ersten Dimension und deren nachfolgende Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE in einer zweiten Dimension. Die 2D-DIGE unterscheidet sich von der herkömmlichen 2D-PAGE-Methode dahingehend, dass die Proteine vor der IEF mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

Der Einfluss von Ferulasäure auf das HT29 Klon 19A-Proteom wurde anhand von zwei verschiedenen Ferulasäurekonzentrationen in Kombination mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten analysiert. Auf der Grundlage der Stabilitäts- und Zytotoxizitätsversuche (vgl. 3.1 und 3.2) wurden Endkonzentrationen von 100 μM und 500 μM Ferulasäure in DMSO verwendet (0,05 % DMSO-Endkonzentration). Beide Konzentrationen gewähren ausreichende Stabilität unter Standardzellkulturbedingungen und zeigen kaum zytotoxische Effekte. Um mögliche Lösungsmittelfeffekte ausschließen zu können, wurde bei allen Versuchen zusätzlich eine DMSO-Kontrolle eingesetzt. Die Auswirkung der Behandlungsdauer wurde anhand 4- und 24-stündiger Inkubationsexperimente untersucht.

3.4.1 Etablierung einer geeigneten proteomanalytischen Durchführung

Zunächst musste die Methode der Proteomanalyse etabliert und an die Fragestellung angepasst werden. Dadurch sollte eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der 2D-Gele erreicht werden, um somit differenziell exprimierte Proteine nach FS-Behandlung erkennen zu können. Die Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde im Verlauf dieser Arbeit fortlaufend optimiert. Generell wurden 2D-PAGE und 2D-DIGE in Anlehnung an die Protokolle von Görg *et al.* durchgeführt [Gorg *et al.*, 2004a; Gorg *et al.*, 2004b]. Im Folgenden soll auf Modifizierungen in der Durchführung eingegangen werden.

Ein Schwerpunkt in der Optimierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese bildete die Probenaufarbeitung. Diese spielt eine wesentliche Rolle für die Solubilisierung der Proteine und die Qualität der 2D-Gele. Es wurde angestrebt nach Möglichkeit sämtliche Proteine einer Zelle zu erfassen. Eine bessere Löslichkeit der Proteine, insbesondere von Membranproteinen, wurde durch die Verwendung einer Mischung aus 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff in Kombination mit CHAPS erreicht [Rabilloud *et al.*, 1997]. Der Gebrauch von 9 M Harnstoff im Lysispuffer resultierte in einer etwas geringeren Anzahl detektierter Spots (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch Zusatz der Nuklease Benzonase zum 2D-PAGE-Lysispuffer wurden freigesetzte Nukleinsäuren abgebaut und somit störende Verunreinigungen entfernt, die die Qualität der 2D-Ergebnisse beeinträchtigen. Zum vollständigen Zellaufschluss wurden sowohl für 2D-PAGE als auch für 2D-DIGE die Lyse mittels Lysispuffer und die Sonifizierung der Zellen kombiniert.

Die Probenapplikation für die IEF erfolgte mittels *Cup Loading*. Dieses Verfahren wird v. a. für quantitative Analysen empfohlen und wird daher dem *In-gel Rehydration>Loading* vorgezogen [Gorg *et al.*, 2004a]. Problem bei der ersten Dimension war häufig eine Salzkontamination der 2D-Proben, die sich in Spotmustern mit ungenügend fokussierten Proteinspots äußerte. Daher wurde das Protokoll der IEF dahingehend angepasst störende Ionen während der ersten Dimension zu entfernen. Gute Resultate wurden erzielt, indem der eigentlichen Fokussierung eine zweistündige Vorlaufzeit mit geringer Spannung (100-150 V) vorangestellt wurde.

Für die quantitative Auswertung der 2D-PAGE-Gele wurden zwei verschiedene Färbemethoden miteinander verglichen, die kolloidale CBB-Färbung nach Neuhoff [Neuhoff *et al.*, 1988] und die Silberfärbung nach Shevchenko [Shevchenko *et al.*, 1996]. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn bei anschließender Silberfärbung 70 µg Protein und bei CBB-Färbung 550 µg Protein aufgetrennt wurden. Beispiele zweier 2D-PAGE-Gele des HT29 Klon 19A-Proteoms nach Silber- bzw. CBB-Färbung sind in Abb. 8 dargestellt.

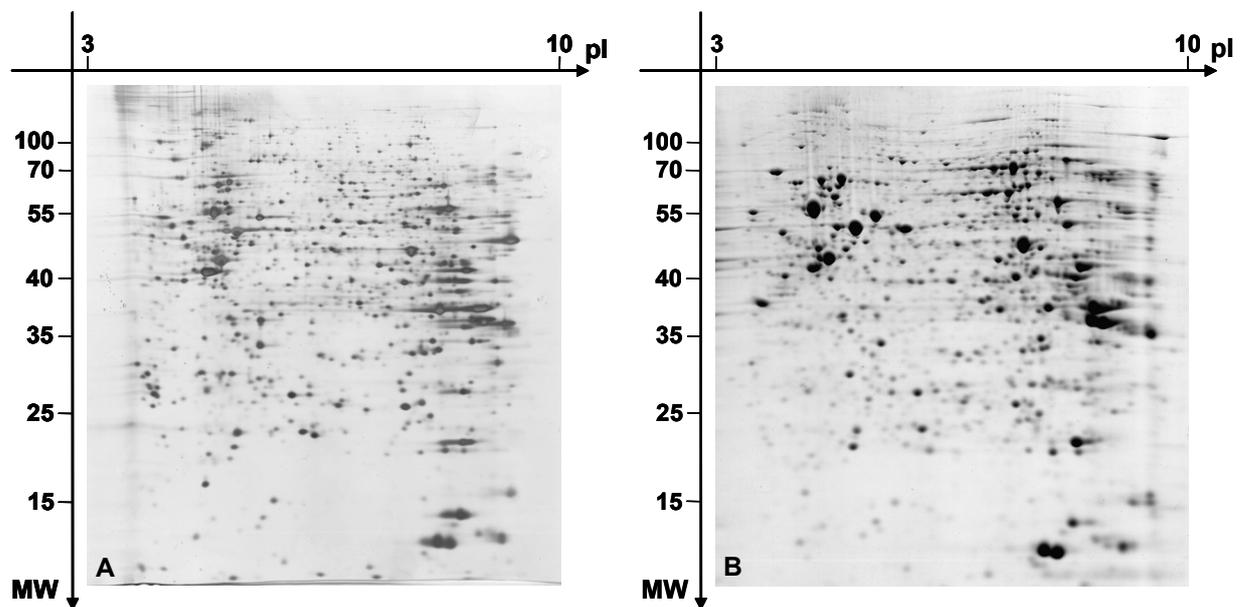


Abb. 8: HT29 Klon 19A-Proteom nach Silberfärbung und nach kolloidaler CBB-Färbung von 2D-PAGE-Gele

Repräsentative 2D-PAGE-Gele nach Silberfärbung (A) bzw. kolloidaler CBB-Färbung (B) (unbehandelte HT29 Klon 19A-Zellen). Annähernd konfluente HT29 Klon 19A-Zellen wurden geerntet und für die 2D-PAGE entsprechend aufgearbeitet. Für eine Silberfärbung wurden 70 µg Proteinlysate, für eine CBB-Färbung 550 µg Proteinlysate mittels IEF (Gelstreifen pH 3-10 NL) und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen SDS-Gele aufgetrennt. Die Gele wurden entsprechend gefärbt und gescannt. pI = isoelektrischer Punkt; MW = Molekulargewicht.

Die Anzahl der detektierten Spots des HT29 Klon 19A-Proteoms war trotz der höheren Sensitivität der Silberfärbung annähernd identisch (ca. 1.300 Spots). Bei der Silberfärbung handelt es sich im Gegensatz zur CBB-Färbung um eine Färbemethode mit subjektivem Endpunkt. Da die Silberfärbung daher schlechter reproduzierbar ist, wurde die quantitative softwaregestützte Auswertung in dieser Arbeit mit CBB-gefärbten 2D-PAGE-Gelen durchgeführt.

3.4.2 Proteomanalyse mittels 2D-PAGE

Nach erfolgter Inkubation mit Ferulasäure wurden die HT29 Klon 19A-Zellen lysiert und die Proteine in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Die 2D-PAGE-Gele wurden CBB-gefärbt, gescannt und die Bilddateien nachfolgend softwaregestützt ausgewertet (s. Kap. 2.2.5.9). Dabei wurden die Spotmuster der Gele der entsprechenden Ferulasäurebehandlung (100 μ M bzw. 500 μ M Ferulasäure für 4 h bzw. 24 h) mit jenem der DMSO-Kontrolle verglichen. Ein Proteinspot galt als reguliert, wenn dessen durchschnittliche Spotintensität aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wenigstens um den Faktor 0,5 bzw. 2 zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe variierte ($\text{Regulationsfaktor}_{2\text{D-PAGE}} \leq 0,5$ bzw. $\geq 2,0$). Regulierte Proteine wurden nachfolgend massenspektrometrisch analysiert.

Insgesamt konnten 17 regulierte Spots nach Ferulasäurebehandlung ermittelt werden (s. Abb. 9).

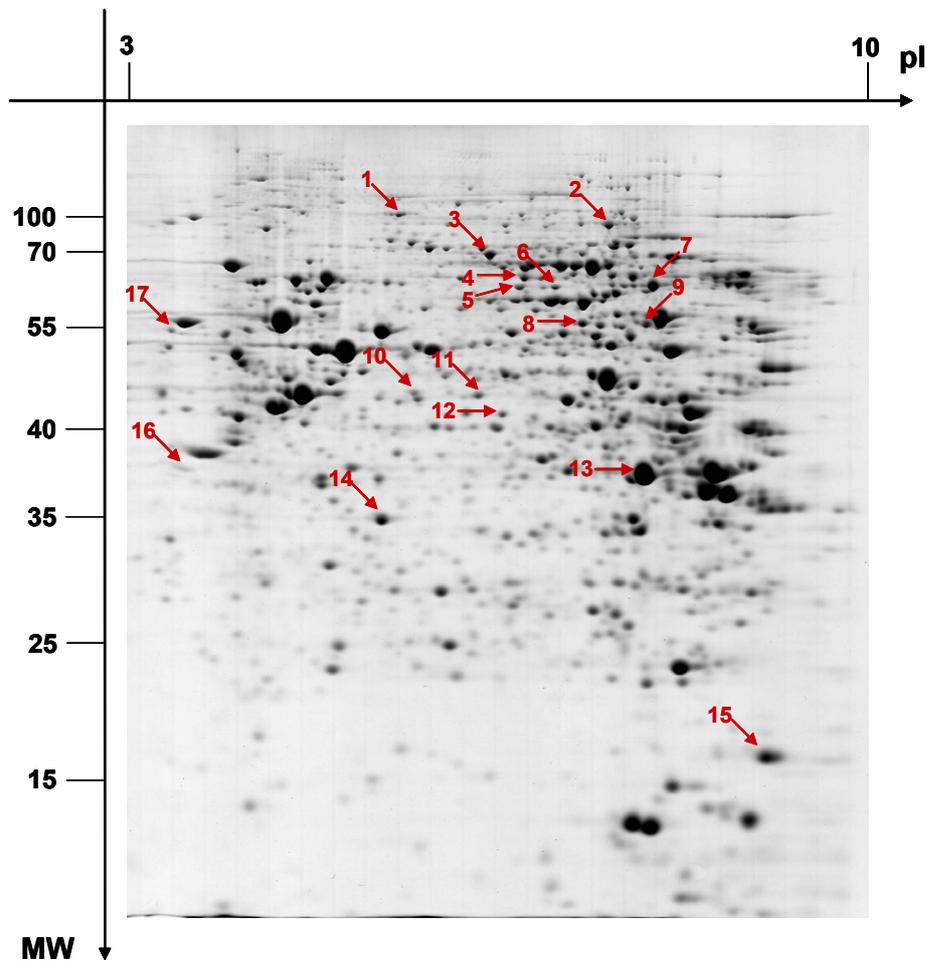


Abb. 9: FS-regulierte Proteine im HT29 Klon 19A-Proteom nach 2D-PAGE

Repräsentatives 2D-PAGE-Gel nach kolloidaler CBB-Färbung (nach 4-stündiger Behandlung mit 100 μM FS). 4×10^6 HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro T75-Zellkulturflasche ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit 100 μM bzw. 500 μM FS in DMSO bzw. mit reinem DMSO als Kontrolle (Endkonzentration 0,05 %) für 4 h bzw. 24 h inkubiert. Je 550 μg Proteinlysate wurden mittels IEF (Gelstreifen pH 3-10 NL) und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Für jede Probe wurden zwei Replikate angefertigt. Die Gele wurden CBB-gefärbt, gescannt und die Bilddateien mittels *Proteomweaver*-Software ausgewertet. Durchschnittlich mind. 0,5- bzw. 2-fach regulierte Proteinspots im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle aus mehr als drei unabhängigen Experimenten sind mit Pfeilen markiert. pI = isoelektrischer Punkt; MW = Molekulargewicht.

Tab. 14 gibt einen Überblick über die identifizierten ferulasäureregulierten Proteine und deren Verteilung auf die einzelnen Behandlungsgruppen. 15 mindestens zweifach hochregulierte Proteine entfallen auf die Gruppe nach vierstündiger Inkubation mit 100 μM Ferulasäure (Spot 1 bis 15). Nach Behandlung mit 500 μM Ferulasäure für 4 h konnte nur ein hochregulierter Proteinspot ermittelt werden (Spot 16). Wurden HT29 Klon 19A-Zellen für 24 h mit 100 μM Ferulasäure inkubiert, war ein Protein um den Faktor 0,5 herunterreguliert (Spot 17). Alle regulierten Proteine konnten mittels MS identifiziert werden.

Tab. 14: Übersicht über die FS-regulierten Proteine von HT29 Klon 19A-Zellen nach 2D-PAGE

Av. Ratio = durchschnittlicher Regulationsfaktor; sc = Sequenzabdeckung in %

Spot 1 bis 15: reguliert nach Inkubation mit 100 µM FS für 4 h

Spot 16: reguliert nach Inkubation mit 500 µM FS für 4 h

Spot 17: reguliert nach Inkubation mit 100 µM FS für 24 h

Spot-Nr.	Av. Ratio/SD	Swiss Prot Accession-Nr.	Proteinname	Theoret. M _r (kDa)/pI	Anzahl gefund. Peptide	sc (%)
1	3,20/1,1	Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB precursor	106,9/5,7	4	5
2	3,65/1,5	P13639	Elongation factor 2	95,2/6,4	12	17
3	2,26/0,4	P15311	Ezrin	69,3/6,0	4	5
4	3,30/1,1	Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor	80,0/8,1	5	12
5	2,20/0,3	P31040	Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit, mitochondrial precursor	72,7/7,1	24	52
6	2,26/0,4	O75083	WD-repeat protein 1	66,2/6,2	6	14
7	2,35/1,0	P29401	Transketolase	67,9/7,6	8	22
8	2,13/0,6	Q9HCC0	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial precursor	61,3/7,6	3	7
9	3,50/2,4	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	59,4/7,6	3	8
10	2,59/0,4	Q6PJJ9	Solute carrier family 25, member 24	53,4/6,0	5	16
11	3,95/1,7	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor	48,5/6,6	8	25
12	2,72/1,1	Q15019	Septin-2	41,5/6,2	5	23
13	4,54/3,8	P07355	Annexin II	38,5/7,6	20	61
14	3,39/1,9	P09525	Annexin IV	35,8/5,9	13	44
15	2,27/0,3	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	22,7/9,3	5	25
16	2,59/0,8	P06748	Nucleophosmin	32,6/4,6	6	25
17	0,50/0,2	P14625	Endoplasmin precursor (HSP 90)	92,5/4,8	14	21

3.4.3 Proteomanalyse mittels 2D-DIGE

HT29 Klon 19A-Zellen wurden wie unter 3.4 beschrieben behandelt. Die Durchführung der 2D-DIGE-Technik beschränkte sich auf die vierstündige Inkubation der Zellen mit 100 μM bzw. 500 μM Ferulasäure, da anhand der 2D-PAGE-Daten nahezu kein Effekt auf das Proteom nach einer Behandlungszeit von 24 h festzustellen war. Nach der Zellyse wurde eine Fluoreszenzmarkierung der Proteine durchgeführt (s. Kap. 2.2.5.8). Proteine der DMSO-Kontrolle wurden mit Cy2 markiert, Proteine nach 100 μM Ferulasäurebehandlung mit Cy3 und Proteine nach Inkubation mit 500 μM Ferulasäure mit Cy5. Alle drei fluoreszenzmarkierten Proben wurden gemischt und die Proteine in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Die 2D-DIGE-Gele wurden fluoreszenzgescannt und die resultierenden Bilddateien nachfolgend softwaregestützt ausgewertet (s. Kap. 2.2.5.9). Dabei wurden die Spotmuster der Gele der entsprechenden Behandlung (100 μM bzw. 500 μM Ferulasäure) mit jenem der DMSO-Kontrolle verglichen. Ein Proteinspot galt als reguliert, wenn dessen durchschnittliche *Volume Ratio* aus drei unabhängigen Experimenten mindestens um den Faktor 0,5 bzw. 2 zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe variierte ($\text{Regulationsfaktor}_{2\text{D-DIGE}} \leq -2,0$ bzw. $\geq 2,0$). Für die massenspektrometrische Analyse wurden die regulierten Proteine in CBB-gefärbten 2D-PAGE-Gelen derselben Behandlungsgruppe lokalisiert und diese zur Identifizierung verwendet.

Insgesamt konnten sieben regulierte Spots nach Ferulasäurebehandlung ermittelt werden (s. Abb. 10). Alle detektierten Proteine waren in ihrer Expression vermindert und unterschieden sich von denjenigen nach 2D-PAGE.

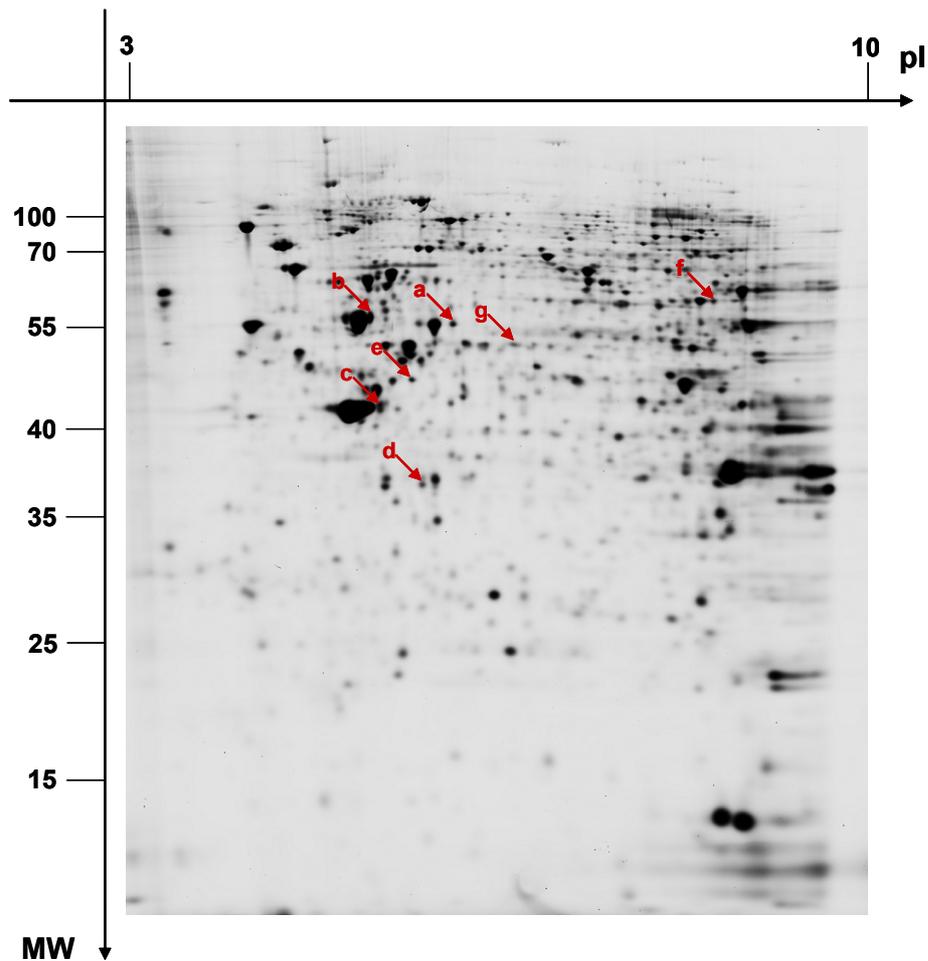


Abb. 10: FS-regulierte Proteine im HT29 Klon 19A-Proteom nach 2D-DIGE

Repräsentatives 2D-DIGE-Gel nach Fluoreszenzscan (Cy2-Kanal; DMSO-Kontrolle). $3,4 \times 10^6$ HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit 100 μM bzw. 500 μM FS in DMSO bzw. mit reinem DMSO als Kontrolle (Endkonzentration 0,05 %) für 4 h inkubiert. Je 50 μg Proteinlysate wurden fluoreszenzmarkiert und 150 μg Protein (Summe aus drei verschiedenen Proben) wurden mittels IEF (Gelstreifen pH 3-10 NL) und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Für jede Probe wurden zwei Replikate angefertigt. Nach dem Fluoreszenzscan wurden die Bilddateien mittels *DeCyder*-Software ausgewertet. Durchschnittlich mind. 0,5- bzw. 2-fach regulierte Proteinspots im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten sind mit Pfeilen markiert. pI = isoelektrischer Punkt; MW = Molekulargewicht.

Tab. 15 gibt einen Überblick über die identifizierten ferulasäureregulierten Proteine und deren Verteilung auf die einzelnen Behandlungsgruppen. Nach Inkubation mit 100 μM Ferulasäure für 4 h wurden sechs mindestens zweifach herunterregulierte Proteine gefunden (a, c bis g). Bei einer Behandlung mit 500 μM Ferulasäure war die Expression von drei Spots reduziert (a, b, c). Damit waren Spot a und c nach der Inkubation mit beiden verwendeten Ferulasäurekonzentrationen reguliert.

Spot d und e konnten massenspektrometrisch nicht identifiziert werden, da sie in den CBB-gefärbten 2D-PAGE-Gelen auf Grund der geringeren Sensitivität von CBB im Vergleich zu den 2D-DIGE-Fluoreszenzfarbstoffen nicht angefärbt waren.

Tab. 15: Übersicht über die FS-regulierten Proteine von HT29 Klon 19A-Zellen nach 2D-DIGE

Av. Ratio = durchschnittlicher Regulationsfaktor; sc = Sequenzabdeckung in %

*: reguliert nach Inkubation mit 100 µM FS für 4 h

#: reguliert nach Inkubation mit 500 µM FS für 4 h

Spot-Name	Av. Ratio/ SD	Swiss Prot Accession- Nr.	Proteinname	Theoret. M _r (kDa)/ pI	Anzahl gefund. Peptide	sc (%)
a	-2,34/0,5* -1,96/0,4#	P30101	Protein disulfide-isomerase A3, precursor	56,8/6,0	6	14
b	-1,96/0,4#	P10809	Heat shock protein 60 kDa, mitochondrial precursor	61,1/5,7	15	41
c	-2,37/1,1* -2,44/1,2#	P12277	Creatine kinase B-type	42,6/5,3	10	34
d	-3,34/1,6*	-	unbekannt	-	-	-
e	-2,65/1,1*	-	unbekannt	-	-	-
f	-2,06/0,5*	Q13283	Ras GTPase-activating protein- binding protein 1	52,2/5,4	2	7
g	-2,02/0,5*	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,2/5,9	3	12

3.5 Untersuchung der ferulasäurevermittelten Proteinregulation am Beispiel von Annexin II, Annexin IV und Ezrin

Die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese identifizierte Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen sollten mit anderen Methoden genauer untersucht werden.

Drei ferulasäureregulierte Proteine wurden zu diesem Zweck ausgewählt: Annexin II (Spot 13), Annexin IV (Spot 14) sowie Ezrin (Spot 3) (s. Tab. 14). Auswahlkriterien für die beiden Annexine waren die vergleichsweise hohen Regulationsfaktoren. Ezrin schien für die weitere Analyse interessant, da für dieses Protein ein Zusammenhang mit Vorgängen der Tumorprogression diskutiert wird [Gautreau *et al.*, 2002].

Die Lokalisation der ausgewählten Proteine Annexin II, Annexin IV und Ezrin im 2D-PAGE-Gel sowie deren Regulation nach vierstündiger Inkubation mit 100 μ M Ferulasäure sind in Abb. 11 anhand beispielhafter Gelausschnitte von Kontroll- und Behandlungsgruppe dargestellt.

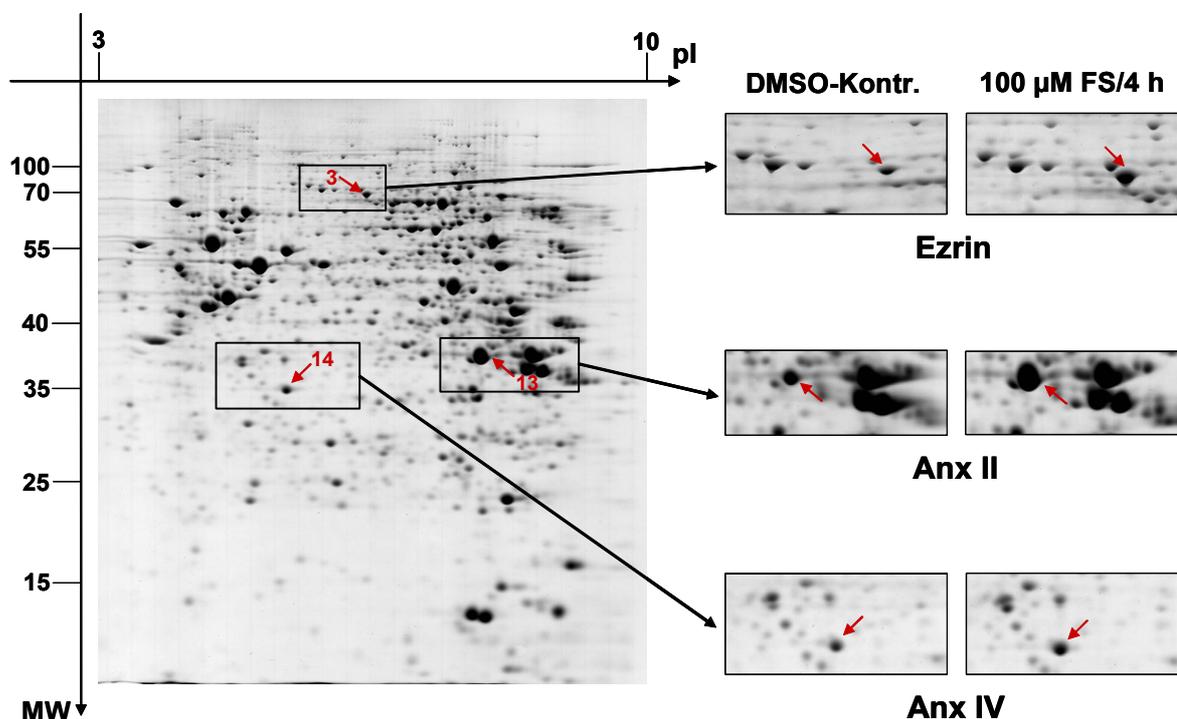


Abb. 11: Lokalisation ausgewählter FS-regulierter Proteine im 2D-PAGE-Gel

Repräsentative CBB-gefärbte 2D-PAGE-Ausschnitte des HT29 Klon 19A-Proteoms der DMSO-Kontrolle bzw. nach Behandlung mit 100 μ M FS für 4 h. Gezeigt ist die Lokalisation der Proteine Ezrin, Anx II und Anx IV im Gel sowie deren Hochregulation nach 4-stündiger Inkubation mit 100 μ M FS.

3.5.1 Ferulasäurevermittelte Effekte auf die Proteinexpression ausgewählter Proteine mittels Western Blot-Analyse

Die ferulasäurevermittelte Regulation von Annexin II, Annexin IV und Ezrin auf Proteomebene sollte erneut auf Translationsebene mittels eindimensionaler Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot untersucht werden. Analysiert wurde sowohl der Effekt unterschiedlicher Ferulasäurekonzentrationen (20 μ M, 100 μ M, 500 μ M bzw. 2 mM) als auch verschiedener Inkubationszeiten auf die Expression der ausgewählten Proteine. Ebenfalls wurde überprüft, inwieweit die Zelldichte die Proteinexpression nach Ferulasäurebehandlung beeinflusst. Um mögliche Lösungsmittelleffekte ausschließen zu können, wurde bei jedem Experiment zusätzlich eine DMSO-Kontrolle mitgeführt (Endkonzentration < 0,2 %). Proteinlysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Proteinnachweis auf der Membran erfolgte durch Immunodetektion des jeweiligen Proteins.

Abb. 12 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von Ferulasäure auf die Proteinexpression von Annexin II, Annexin IV sowie Ezrin. Für kein Protein konnte ein signifikanter Effekt auf die Expression nach entsprechender Ferulasäurebehandlung nachgewiesen werden.

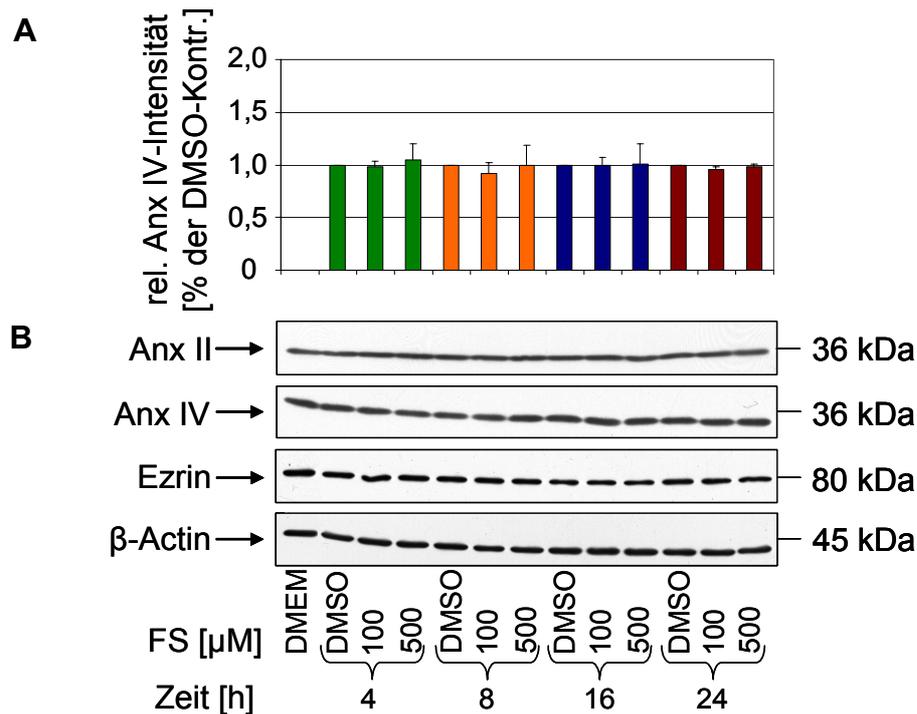


Abb. 12: Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten von FS auf die Proteinexpression von Anx II, Anx IV und Ezrin (Western Blot)

B: Repräsentative Western Blots ausgewählter Proteine nach unterschiedlich langer Behandlung mit FS. $0,5 \times 10^6$ HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro Vertiefung einer 12-well-Zellkulturplatte ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit 100 μM bzw. 500 μM FS in DMSO bzw. mit reinem DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Endkonzentration 0,2 %) für 4, 8, 16 bzw. 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium (DMEM) verwendet. Je 10 μg Proteinlysate wurden pro Spur aufgetragen und durch SDS-PAGE aufgetrennt (5 %iges Sammelgel, 10 %iges Trenngel). Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran durch Halbtrocken-Blotting erfolgte die Immunodetektion von Anx II, Anx IV, Ezrin und β-Actin als Kontrolle mit entsprechenden Primär- und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern. Nach densitometrischer Auswertung der Banden wurden die relativen Intensitäten im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle ermittelt.

A: Relative Intensitäten am Beispiel von Anx IV nach unterschiedlich langer Behandlung mit FS. Dargestellt sind die ermittelten relativen Intensitäten von Anx IV im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten (MW+SD).

Ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf die Proteinexpression von Annexin II, Annexin IV und Ezrin hatte eine vierstündige Inkubation von HT29 Klon 19A-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ferulasäure (s. Abb. 13). Damit konnten die mittels 2D-PAGE erkennbaren Unterschiede in der Spotintensität von Annexin II, Annexin IV sowie Ezrin nach Ferulasäurebehandlung nicht auf eine veränderte Proteinexpression zurückzuführen sein.

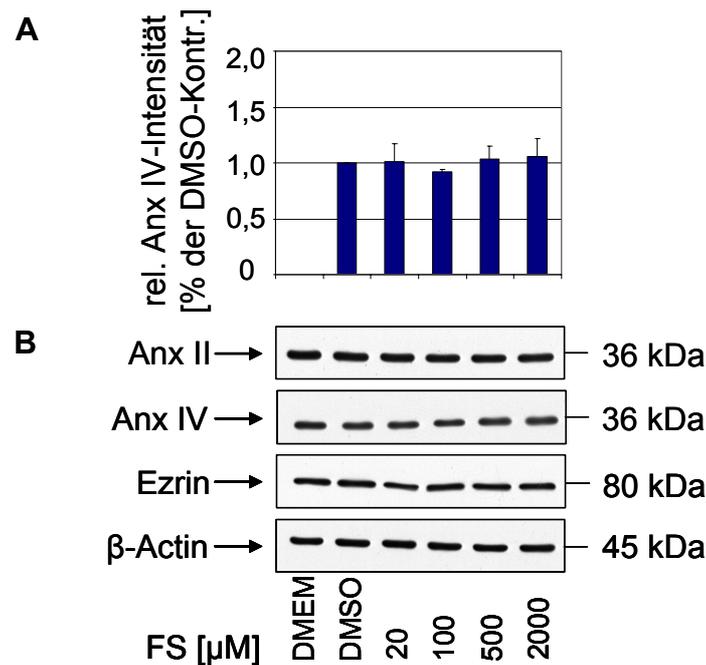


Abb. 13: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von FS auf die Proteinexpression von Anx II, Anx IV und Ezrin (Western Blot)

B: Repräsentative Western Blots ausgewählter Proteine nach Inkubation mit unterschiedlichen FS-Konzentrationen. 1×10^6 HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit 20, 100, 500 μ M bzw. 2 mM FS in DMSO bzw. mit reinem DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Endkonzentration 0,2 %) für 4 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium (DMEM) verwendet. Je 10 μ g Proteinlysate wurden pro Spur aufgetragen und durch SDS-PAGE aufgetrennt (5 %iges Sammelgel, 10 %iges Trenngel). Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran durch Halbtrocken-Blotting erfolgte die Immunodetektion von Anx II, Anx IV und β -Actin als Kontrolle mit entsprechenden Primär- und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern. Nach densitometrischer Auswertung der Banden wurden die relativen Intensitäten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt.

A: Relative Intensitäten am Beispiel von Anx IV nach Inkubation mit unterschiedlichen FS-Konzentrationen. Dargestellt sind die ermittelten relativen Intensitäten von Anx IV im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten (MW+SD).

Western Blot-Experimente mit 2D-PAGE-Proteinlysaten der jeweiligen Behandlungsgruppe ließen keine Regulation der ausgewählten Proteine nach Ferulasäureinkubation erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Auch konnte kein Effekt der Zelldichte von HT29 Klon 19A-Zellen auf die Proteinexpression von Annexin II, Annexin V sowie Ezrin nach einer Behandlung mit Ferulasäure festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.5.2 Ferulasäurevermittelte Effekte auf die Genexpression ausgewählter Zielgene mittels Real Time-PCR-Analyse

Zusätzlich sollte der Einfluss von Ferulasäure auf die Regulation von Annexin II und Annexin IV sowie von Ezrin auf Transkriptionsebene untersucht werden.

Dazu wurde die mRNA-Expression jener Zielgene analysiert, die für die Proteine Annexin II, Annexin IV und Ezrin kodieren. Die verwendeten Ferulasäurekonzentrationen (100 μM und 500 μM) sowie die Inkubationszeiten (4 h und 24 h) entsprachen denjenigen der 2D-PAGE-Experimente. Ebenfalls wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt (DMSO-Endkonzentration 0,5 %).

Isolierte mRNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und die Zielgene sowie das *Housekeeping*-Gen Aldolase A unter der Verwendung entsprechender Primer durch Real Time-PCR amplifiziert. Die Menge der Amplifikationsprodukte wurde über die Menge des gebundenen *SYBR Green* erfasst. Die Ermittlung der jeweiligen mRNA-Expression erfolgte über die Berechnung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte.

Abb. 14 zeigt die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte für Annexin II, Annexin IV und Ezrin nach entsprechender Ferulasäureinkubation im Vergleich mit der zugehörigen Kontrolle. Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der untersuchten Zielgene nach Ferulasäurebehandlung unterschieden sich kaum von jenen der DMSO-Kontrollen. Ein signifikanter Effekt von Ferulasäure auf die Transkription ließ sich damit für kein Zielgen nachweisen.

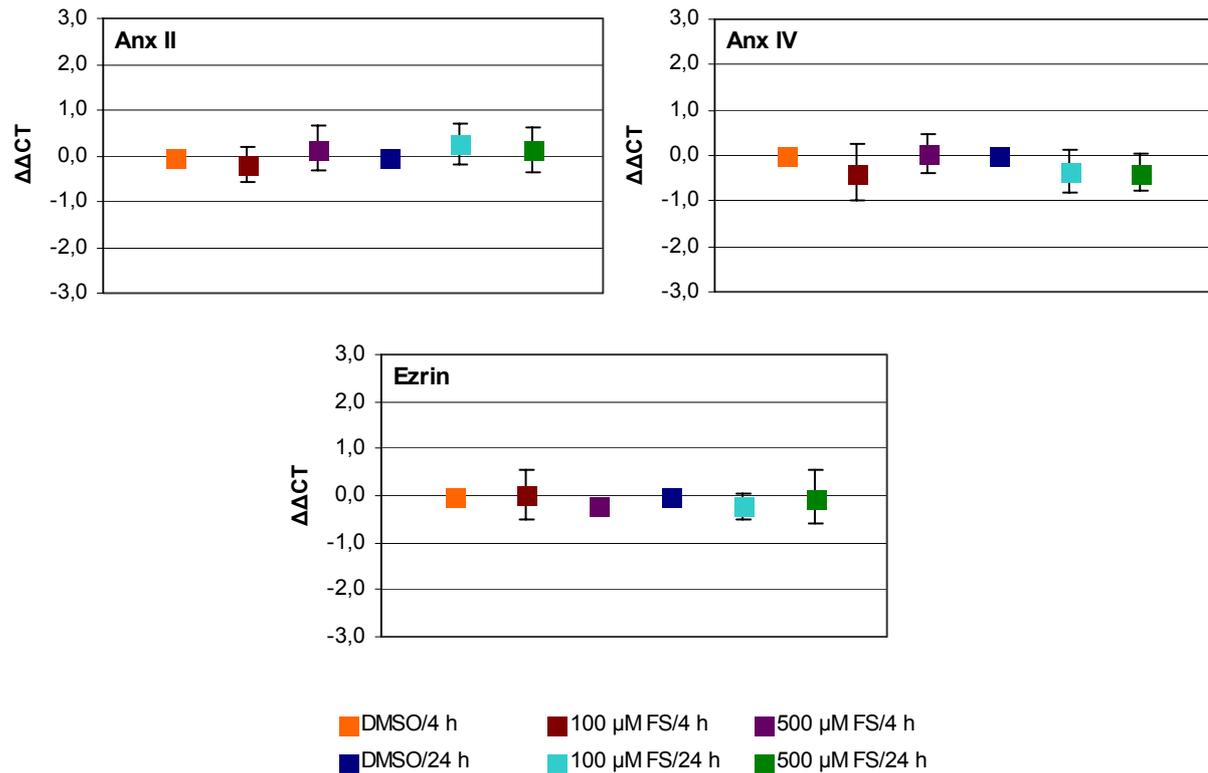


Abb. 14: Einfluss von FS auf die mRNA-Spiegel von Anx II, Anx IV und Ezrin

1×10^6 HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und bei Erreichen von etwa 80 % Konfluenz mit 100 μM bzw. 500 μM FS in DMSO bzw. als Kontrolle mit reinem DMSO (DMSO-Endkonzentration 0,5 %) für 4 h bzw. 24 h inkubiert. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA durch PCR im Real Time-Modus mit den entsprechenden Primern für Anx II, Anx IV, Ezrin sowie für das *Housekeeping*-Gen Aldolase A amplifiziert. Dargestellt sind die ermittelten $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte (jeweilige Behandlung im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle) aus drei unabhängigen Experimenten (MW+SD).

3.5.3 Ferulasäurevermittelte Wirkung am Beispiel von Annexin II

Wie die Ergebnisse von Western Blot und Real Time-PCR verdeutlichen, konnte die mittels 2D-PAGE identifizierte Regulation von Annexin II, Annexin IV und Ezrin nach Ferulasäurebehandlung nicht auf einer veränderten Proteinexpression beruhen. Sofern die Gesamtmenge des jeweiligen Proteins nicht variierte, mussten die im 2D-PAGE-Gel erkennbaren Unterschiede in der Spotintensität nach Ferulasäurebehandlung auf andere Gründe zurückzuführen sein. Dies wurde exemplarisch für das Protein Annexin II untersucht.

3.5.3.1 Einfluss von Ferulasäure auf die Solubilisierung von Annexin II

Zunächst sollte geklärt werden, ob Annexin II durch das Vorhandensein eventueller Isoformen auf Grund posttranslationaler Modifikationen bei verschiedenen isoelektrischen Punkten im Gelstreifen während der ersten Dimension fokussiert und daher in unterschiedlichen Bereichen des 2D-PAGE-Gels zu finden ist.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit isoelektrisch fokussierte Proteine durch Blotten des Gelstreifens nachzuweisen [Towbin *et al.*, 2001]. Um jedoch einen direkten Vergleich mit den 2D-PAGE-Ergebnissen zu ermöglichen, sollte nach durchgeführter zweiter Dimension eine Immunodetektion von Annexin II im kompletten 2D-PAGE-Gel erfolgen. Proteinlysate von DMSO-Kontrollzellen und HT29 Klon 19A-Zellen nach vierstündiger Behandlung mit 100 μM Ferulasäure wurden jeweils mittels IEF aufgetrennt. Aus Kostengründen wurde die zweite Dimension nicht mit SDS-Großgelen (25 x 20,5 x 0,1 cm^3), sondern mit 12,5 %igen SDS-Minigelen durchgeführt. Dazu wurden die 18 cm langen äquilibrierten Gelstreifen von Kontrolle und Behandlung in jeweils drei 6 cm lange Stücke geschnitten, auf drei Minigele verteilt und mit Agarose überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte nach den Bedingungen einer SDS-PAGE (s. Kap. 2.2.7.4). Nach Übertragung der Proteine auf PVDF-Membranen schloss sich die Immunodetektion von Annexin II an. Um eine hohe Vergleichbarkeit zwischen Kontrolle und Behandlung zu gewährleisten, wurden Membranen zugehöriger pH-Bereiche parallel entwickelt.

Abb. 15 zeigt repräsentative Ausschnitte der Annexin II-Blots von DMSO-Kontrolle und nach 100 μM Ferulasäureinkubation für 4 h. In allen Blots konnte Annexin II detektiert werden. Die stärksten Annexin II-Signale wurden in den Blots nachgewiesen, die Proteine im pH-Bereich 7-10 des Gelstreifens abbilden. Dies war zu erwarten, da der theoretische pI von Annexin II bei 7,6 liegt. Der Vergleich der Blots zwischen Kontrolle und Behandlung im Bereich pH 5-7 und pH 7-10 macht deutlich, dass die Annexin II-Intensität nach Ferulasäureinkubation zunahm. Dies bestätigt die Ergebnisse der 2D-PAGE. Jedoch scheint Annexin II bei pH 7 in verschiedenen Isoformen aufzutreten, was durch CBB-Färbung allein nicht zu erkennen war. Auffällig waren die vergleichsweise starken Annexin II-Signale im pH-Bereich 3-5, die keinen klar definierten Spots ähnelten. Dabei war die Annexin II-Detektion in der DMSO-Kontrolle im Vergleich zur behandelten Probe um etwa ein Vierfaches stärker.

Um die genaue Lokalisation von Annexin II im 2D-PAGE-Gel im Bereich pH 3-5 zu bestimmen, wurden die PVDF-Membranen nach erfolgter Immunodetektion mit kolloidalem CBB angefärbt (s. Kap. 2.2.5.8). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Annexin II-Detektion bei pH 3-5 mit der Probenapplikationsstelle für die erste Dimension (*Cup Loading*) zusammenfiel (Ergebnisse nicht gezeigt). Damit handelt es sich bei diesem Signal um präzipitiertes, d. h. nicht fokussiertes Annexin II.

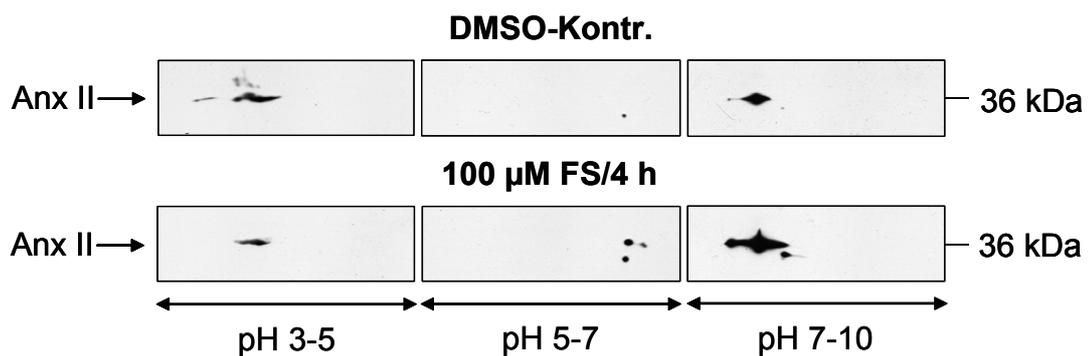


Abb. 15: Immunodetektion von Anx II im gesamten 2D-PAGE-Gel

Je 550 µg Proteinlysate von DMSO-Kontrollzellen sowie von HT29 Klon 19A-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 100 µM FS wurden mittels IEF (Gelstreifen pH 3-10 NL) aufgetrennt. Die Gelstreifen wurden nachfolgend in drei 6 cm lange Stücke geschnitten und die Proteine pro Stück im 12,5 %igen Minigel durch SDS-PAGE getrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran durch Halbtrocken-Blotting erfolgte die Immunodetektion von Anx II mittels Primärantikörper gegen humanes Anx II und HRP-konjugiertem Sekundärantikörper.

Die Ursachen für die schwächere Annexin II-Präzipitation und die möglicherweise verbesserte Solubilisierung nach vierstündiger Behandlung mit Ferulasäure sollten nachfolgend untersucht werden.

3.5.3.2 Einfluss von Ferulasäure auf die Lokalisation von Annexin II in HT29 Klon 19A-Zellen

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die verminderte Präzipitation bzw. die geringere Aggregation von Annexin II nach vierstündiger Inkubation mit 100 μM Ferulasäure mit einer besseren Löslichkeit dieses Proteins durch die Ferulasäurebehandlung erklärt werden kann.

In diesem Zusammenhang wurde der potenzielle Einfluss von Ferulasäure auf die subzelluläre Lokalisation von Annexin II untersucht. Dies hat möglicherweise Auswirkung auf die Proteinlöslichkeit.

Die Detektion von Annexin II in der Zelle erfolgte zunächst mittels indirekter Immunfluoreszenz. Dazu wurden HT29 Klon 19A-Zellen für 4 h bzw. 24 h mit 100 μM bzw. 500 μM Ferulasäure in DMSO oder mit reinem DMSO als Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Endkonzentration 0,5 %) inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Immunodetektion von FITC-markiertem Annexin II.

In Abb. 16 sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen von unbehandelten und ferulasäurebehandelten HT29 Klon 19A-Zellen dargestellt. Die Immunfluoreszenzfärbung von Annexin II in DMSO-Kontrollzellen (4 h bzw. 24 h Inkubation) zeigte eine deutliche Lokalisation von Annexin II im Bereich der Plasmamembran. Teilweise waren auch zytosolische Strukturen und die Zellkerne schwach gefärbt, was auf ein geringes Vorkommen an Annexin II schließen lässt. Deutliche Unterschiede in der Anfärbung von Annexin II im Vergleich zur Kontrolle waren vorwiegend nach Behandlung der Zellen mit 500 μM Ferulasäure für 4 h bzw. 24 h sichtbar. Die behandelten Zellen wiesen eine gleichmäßige FITC-Markierung auf; eine überwiegende Verteilung von Annexin II war im Membranbereich nicht mehr vorhanden. Vielmehr schien Annexin II v. a. im Zytosol und im Zellkern lokalisiert. Bei Behandlung der Zellen mit 100 μM Ferulasäure war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt (Ergebnisse nicht gezeigt).

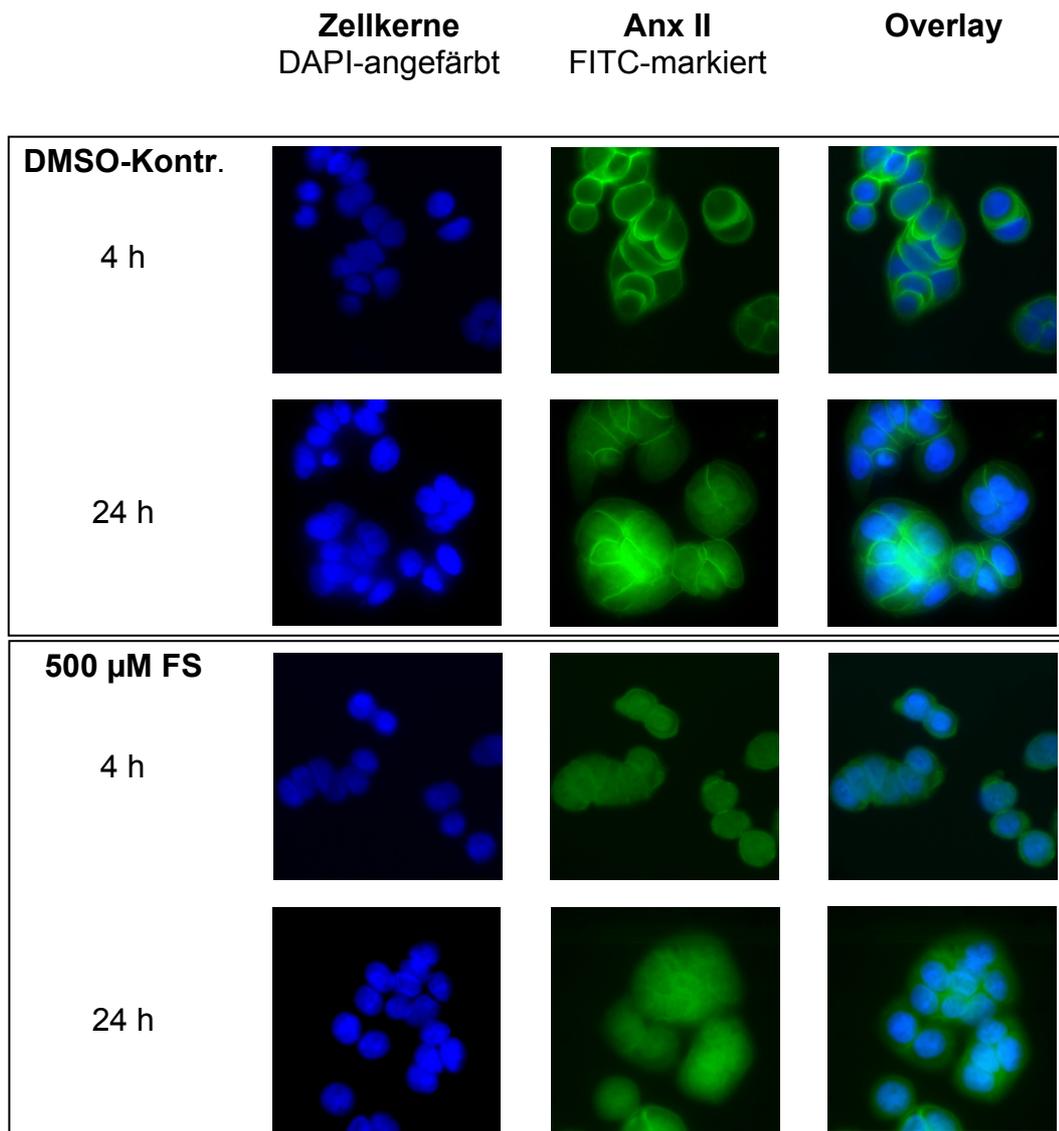


Abb. 16: Immunfluoreszenz von Anx II in unbehandelten und FS-inkubierten HT29 Klon 19A-Zellen

Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Anx II in DMSO-Kontrollzellen und in Zellen nach Behandlung mit 500 µM FS für 4 h bzw. 24 h. 1×10^5 vitale HT29 Klon 19A-Zellen wurden auf einem sterilen Deckglas pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und nach zwei Tagen mit FS in unterschiedlichen Konzentrationen induziert (DMSO-Endkonzentration 0,5 %). Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Immunodetektion von Anx II mittels Primärantikörper gegen humanes Anx II und FITC-konjugiertem Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Zellkerne DAPI-gefärbt und die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Pro Behandlung wurden mind. drei Gesichtsfelder auf dem Objektträger ausgewertet und fotografiert.

Da eine Quantifizierung von Annexin II anhand der Immunfluoreszenzergebnisse nicht möglich war, wurde eine Zellfraktionierung mit nachfolgender Immunodetektion von Annexin II in Kern-, Zytosol- und Membranfraktion durchgeführt. Dies sollte genaueren Aufschluss über eine mögliche veränderte Lokalisation von Annexin II nach Ferulasäurebehandlung geben.

Dazu wurden die Zellen mit 100 μM oder 500 μM Ferulasäure in DMSO behandelt bzw. mit reinem DMSO als Kontrolle (DMSO-Endkonzentration 0,05 %). Die Inkubationsdauer beschränkte sich auf 4 h, da nach dieser Zeit die größten Annexin II-Effekte auf 2D-PAGE-Ebene zu sehen waren. Nach Fraktionierung und Lyse der Zellen wurde Annexin II mittels Western Blot in den Zellfraktionen detektiert. Um die Qualität der Fraktionierung zu überprüfen, erfolgte gleichzeitig die Immunodetektion von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ als zytosolisches Markerprotein sowie von IL-1R1 als Markerprotein für die Membranfraktion.

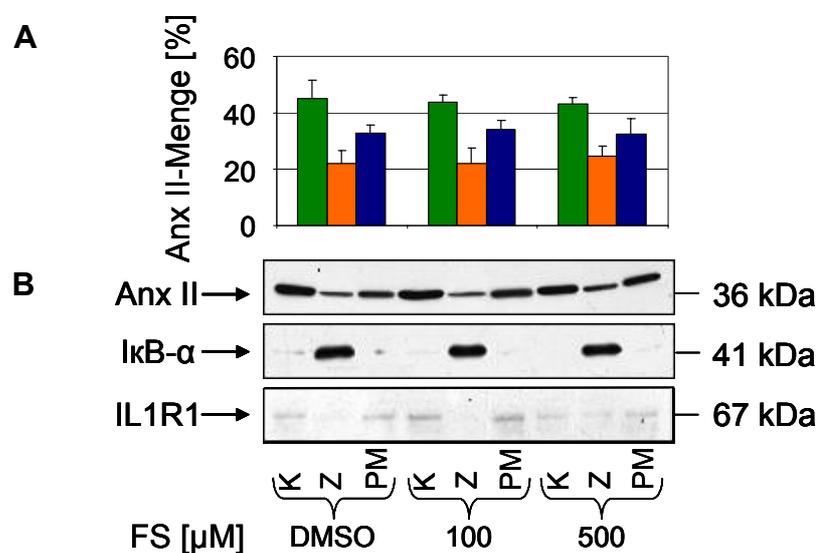


Abb. 17: Immunodetektion von Anx II nach Zellfraktionierung von unbehandelten und FS-inkubierten HT29 Klon 19A-Zellen

Repräsentativer Western Blot von Anx II in den unterschiedlichen Zellfraktionen nach 4-stündiger Inkubation mit 100 bzw. 500 μM FS sowie Immunodetektion von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ als zytosolisches Markerprotein und IL-1R1 als Markerprotein für die Membranfraktion (B). 3×10^6 HT29 Klon 19A-Zellen wurden pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit 100 bzw. 500 μM FS in DMSO bzw. mit reinem DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Endkonzentration 0,05 %) für 4 h inkubiert. Nach subzellulärer Fraktionierung und Zellyse wurden je 10 μg Proteinlysate pro Spur aufgetragen und durch SDS-PAGE aufgetrennt (5 %iges Sammelgel, 10 %iges Trenngel). Im Anschluss an die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran durch Halbtrocken-Blotting erfolgte die Immunodetektion von Anx II, $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ und IL-1R1 mit entsprechenden Primär- und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern. Nach densitometrischer Auswertung der Banden wurden die relativen Anx II-Intensitäten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt (A). Dargestellt sind die ermittelten relativen Intensitäten von Anx II im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten (MW+SD). K = Kernfraktion; Z = Zytosolfraktion; PM = Plasmamembranfraktion.

Aus Abb. 17 wird ersichtlich, dass mittels Zellfraktionierung keine veränderte Verteilung von Annexin II nach Ferulasäurebehandlung erkennbar war. Anders als erwartet, war Annexin II überwiegend (ca. 45 %) in der Kernfraktion lokalisiert; etwa 35 % wurden in der Membranfraktion detektiert. Nur ein kleiner Teil an Annexin II (ca. 20 %) befand sich in der zytosolischen Fraktion. Bis auf sehr geringe Kontaminationen in Kern- und Membranfraktion war I κ B- α vorwiegend in der Zytosolfraktion nachweisbar. IL-1R1 wurde nicht nur in der Membranfraktion detektiert; vergleichsweise starke Banden konnten ebenfalls in der nukleären Fraktion ausgemacht werden. Dies deutet auf eine Kontamination von Membranstrukturen in der Kernfraktion hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung nicht durch die Ergebnisse der Immunodetektion von Annexin II nach Zellfraktionierung bestätigt werden konnten.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Wirkungsweise von Ferulasäure auf zelluläre Mechanismen von Kolonkarzinogenese und Tumorprogression mit einem Zellkulturmodell zu untersuchen. Dabei sollte überprüft werden, ob Ferulasäure zytotoxisch wirkt und Einfluss auf Proliferation bzw. Apoptose nimmt. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die proteomanalytische Untersuchung möglicher Effekte von Ferulasäure auf Translationsebene.

Als *in vitro*-Modell wurde auf die Kolonkarzinomzelllinie HT29 Klon 19A zurückgegriffen. HT29 Klon 19A-Zellen sind permanent differenzierte Zellen, die durch Behandlung von HT29-Zellen mit Natriumbutyrat entstanden sind und nach Konfluenz polarisierte Monolayer ausbilden [Augeron & Laboisie, 1984]. Sie können als ein rückdifferenziertes Zellkulturmodell für das intestinale Epithel angesehen werden [Busche *et al.*, 1993].

4.1 Stabilität von Ferulasäure unter Zellkulturbedingungen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Ferulasäurestabilität unter Standardzellkulturbedingungen mit der eingesetzten Konzentration korreliert, d. h. je höher die Ferulasäurekonzentration im Medium ist, desto höher ist auch deren Stabilität (s. Abb. 4). Wurde Ferulasäure in Konzentrationen ab 100 μM eingesetzt, war sie über einen Zeitraum von 48 h unter Standardkulturbedingungen nahezu vollständig stabil. Bei einer Konzentration von 50 μM konnte nach 48 h eine zehnpromtente Abnahme der Stabilität verzeichnet werden. Noch ca. 80 % der eingesetzten Ferulasäuremenge wurden nach zwei Tagen bei der am niedrigsten gewählten Konzentration (5 μM) im Zellkulturmedium gemessen. Die Chromatogramme bei der Messwellenlänge von 323 nm deuteten auf kein Nebenprodukt hin, das im Zuge der Inkubation aus Ferulasäure entstanden sein könnte (Ergebnisse nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang könnte eine Stabilitätsmessung im Zellkulturmedium unter Verwendung von HT29 Klon 19A-Zellen näheren Aufschluss über mögliche Metabolite von Ferulasäure geben.

Was die Wahl des Lösungsmittels betrifft (DMSO bzw. Ethanol), unterschieden sich die Ergebnisse nicht signifikant. Damit scheint der Gebrauch des Lösungsmittels keinen Einfluss auf die Stabilität von Ferulasäure zu nehmen.

Soweit uns bekannt ist, liegen in der Literatur keine Daten zur Ferulasäurestabilität unter Zellkulturbedingungen vor. Für Kurkumin konnte gezeigt werden, dass die Stabilität in Zellkulturmedium mit 10 % FCS oder in Blut höher ist als in serumfreiem Medium [Wang *et al.*, 1997]. Auch der pH-Wert hat Einfluss auf die Stabilität einer phenolischen Verbindung. Friedman und Jürgens konnten nachweisen, dass Ferulasäure selbst bei einem hohen pH-Wert (pH 11) bis zu 24 h stabil war. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass Ferulasäure keine Chinon-Oxidationsprodukte bilden kann. Dagegen nahm die Stabilität von Kaffeesäure bei hohem pH-Wert stark ab [Friedman & Jurgens, 2000].

Anhand unserer Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass Ferulasäure in den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (100 μ M bis 5 mM) und Inkubationszeiten (maximal 24 h) stabil war.

4.2 Zytotoxische, antiproliferative, proapoptotische Effekte von Ferulasäure

Die Untersuchung möglicher zytotoxischer bzw. antiproliferativer Effekte von Ferulasäure auf HT29 Klon 19A-Zellen ergab, dass die Zellvitalität mit steigender Ferulasäurekonzentration abnahm und durch die Wahl des Lösungsmittels beeinflusst wurde (s. Abb. 5).

Parallel dazu wurde der Einfluss von Ferulasäure auf den programmierten Zelltod in HT29 Klon 19A-Zellen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Ferulasäure erst in Konzentrationen ab 3 mM signifikant Apoptose induzierte (s. Abb. 7). Auch hier war ein Effekt des Lösungsmittels auf die Stärke der Apoptoserate zu erkennen.

In sehr hohen Ferulasäurekonzentrationen von 5 mM in DMSO bzw. ab 3 mM in Ethanol wurde nach 24-stündiger Inkubation eine Apoptoserate von mehr als 10 % gemessen. Gleichzeitig waren die Nekroseraten im Vergleich zur Kontrolle geringfügig erhöht (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Zellvitalität betrug im Zytotoxizitätstest für die beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen (3 mM und 5 mM) zwischen

70 und 80 %. Damit scheint Ferulasäure erst ab 3 mM zytotoxisch zu wirken und signifikant Apoptose zu induzieren.

Wurde Ferulasäure in niedrigeren Konzentrationen als 3 mM eingesetzt, war der Einfluss auf die Zellvitalität bei Gebrauch von DMSO als Lösungsmittel sehr gering (Vitalitätsverlust < 10 %). Wurden ethanolische Ferulasäurelösungen verwendet, traten stärkere Effekte auf die Zellviabilität auf (Vitalitätsverlust maximal 20 %). Die Wachstumshemmung lässt sich vermutlich durch eine schwache jedoch nicht signifikante Apoptoseinduktion durch Ferulasäurekonzentrationen kleiner 3 mM erklären. Allenfalls geringfügige antiproliferative Effekte könnten zum Vitalitätsverlust beitragen.

Bereits an HT29-Kolonkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass in DMSO gelöste Ferulasäure erst in höheren Konzentrationen (mM-Bereich) eine stärkere wachstumshemmende Wirkung ausübt. Der IC₅₀-Wert für Ferulasäure lag bei etwa 1,2 mM. Allerdings betrug die Inkubationszeit mit Ferulasäure in diesem Fall 72 h [Ferguson *et al.*, 2005].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss des Lösungsmittels bzw. dessen Konzentration entscheidend für das Ausmaß der Effekte von Ferulasäure auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion ist. Bei Gebrauch von ethanolischen Ferulasäurelösungen nahm die Zellviabilität im Vergleich zur Verwendung von DMSO als Lösungsmittel bei der entsprechenden Ferulasäurekonzentration i. d. R. stärker ab. Gleichzeitig war eine höhere Apoptoseinduktion zu beobachten, wenn Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Dabei fiel auf, dass die Apoptoserate durch Verwendung hoher Ferulasäurekonzentrationen in Ethanol (3 mM und 5 mM) fast dreifach so hoch war wie bei Gebrauch von Ferulasäure in DMSO. Im Vergleich dazu hatten Ethanol allein bzw. ethanolische Ferulasäurelösungen bis 1 mM weniger starke Wirkung auf die Apoptoseinduktion. Dies lässt einen synergistischen Effekt von Ferulasäure und Ethanol vermuten, wenn die Ferulasäurekonzentration über 1 mM beträgt.

Stärkere Effekte auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion durch ethanolische Ferulasäurelösungen waren prinzipiell zu erwarten, da die Ethanolkonzentration im Medium bei beiden Tests 2 % betrug, was einer Konzentration von 430 mM entspricht. Die DMSO-Endkonzentration dagegen war mit 0,5 % (64 mM) bedeutend geringer und wirkte in dieser Konzentration nicht zytotoxisch. Grund für die hohe

EtOH-Endkonzentration ist die schlechtere Löslichkeit von Ferulasäure in Ethanol im Vergleich zu DMSO.

Am Beispiel von Caco2-Zellen wurde nachgewiesen, dass Ethanol ab einer Konzentration von 2,5 % die Barrierefunktion der Zellen und Teile des Zytoskeletts wie Mikrotubuli zerstört. Diese sind für die strukturelle und funktionelle Integrität der Enterozyten unabdingbar [Banan *et al.*, 1999].

Zudem kann Ethanol Apoptose und Nekrose in Zellen induzieren [Koch *et al.*, 2004]. Chan und Chang konnten zeigen, dass Ethanol in Konzentrationen von 100-400 mM die Zellviabilität von myeloischen K562-Leukämiezellen dosisabhängig signifikant reduziert. Bei einer verwendeten Konzentration von 400 mM war das Zellwachstum um mehr als 60 % vermindert. Gleichzeitig stieg die Apoptoserate bis 250 mM auf über 40 %; bei höher eingesetzten Konzentrationen kam es verstärkt zur Zellnekrose [Chan & Chang, 2006].

Außerdem untersuchten Chan und Chang den Einfluss von Resveratrol, einem Stilben, auf den ethanolinduzierten Zelltod. Sie konnten nachweisen, dass Resveratrol in niedrigen Konzentrationen (10-25 μM) die ethanolinduzierte Apoptose und Nekrose inhibierte, während es in höheren Dosen (100-200 μM) über die Bildung von ROS die Wirkung von Ethanol bzgl. der Apoptoseinduktion noch verstärkte [Chan & Chang, 2006].

Weitere Untersuchungen könnten darüber Aufschluss geben, ob ethanolische Ferulasäurelösungen ähnliche biphasische Effekte ausüben.

Über den Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Phenolsäuren ist generell noch wenig bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass verschiedene Phenolsäuren, auch Ferulasäure, nicht nur antioxidativ, sondern auch prooxidativ wirken können und Apoptoseprozesse *in vitro* vermutlich über die Bildung von ROS induziert werden [Sergediene *et al.*, 1999; Lee, 2005; Stagos *et al.*, 2005]. Prooxidative Effekte sind jedoch abhängig von der eingesetzten Dosis sowie der verwendeten Zelllinie [Lee, 2005; Stagos *et al.*, 2005]. Die prooxidative Wirkung einer Substanz ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Hydroxylgruppen [Cao *et al.*, 1997].

Generell ist nicht auszuschließen, dass prooxidative Effekte auf Grund von ROS-Bildung auch durch chemische Reaktionen im Zellkulturmedium stattfinden können. Dieser Aspekt darf bei der Interpretation von Proliferations- und Apoptoseprozessen

durch antioxidativ wirkende Substanzen nicht außer Acht gelassen werden [Halliwell, 2003].

4.3 Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen

Mit Hilfe der Proteomanalyse sollte untersucht werden, inwieweit die Behandlung mit Ferulasäure die Proteinexpression in HT29 Klon 19A-Zellen verändern kann. Bislang liegen in der Literatur noch keine Daten über mögliche Effekte von Phenolsäuren auf das Proteom von Kolonkarzinomzellen vor.

Zwei unterschiedliche Methoden der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE und 2D-DIGE) wurden angewandt, die verschiedene Vorteile und Nachteile in sich birgen.

4.3.1 Verwendete Ferulasäurekonzentrationen und Inkubationszeiten

Um den Einfluss von Ferulasäure auf das HT29 Klon 19A-Proteom zu analysieren, wurde Ferulasäure in einer Konzentration von 100 μM und 500 μM in DMSO eingesetzt. In epidemiologischen Studien wurden für Ferulasäure häufig Plasmakonzentrationen im nanomolaren Bereich gemessen, die nicht über 200 nM hinausgingen [Kern *et al.*, 2003a]. Allerdings konnte Ferulasäure beim Menschen inzwischen im Fäzeswasser nachgewiesen werden. In dieser Matrix wurden bei Probanden ohne diätetische Einschränkung Konzentrationen im mikromolaren Bereich ($< 20 \mu\text{M}$) detektiert [Jenner *et al.*, 2005; Halliwell *et al.*, 2005]. Durch einen hohen Verzehr an ferulasäurehaltigen Lebensmitteln wie Vollkornprodukten bzw. durch Supplementierung mit Ferulasäure sind höhere Konzentrationen im Fäzeswasser wahrscheinlich. Damit liegt die in dieser Arbeit verwendete Ferulasäurekonzentration von 100 μM vermutlich nahezu im physiologischen Bereich. Um stärkere Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen erkennen zu können, wurde mit 500 μM eine vergleichsweise hohe Konzentration eingesetzt.

Die Inkubationsdauer betrug 4 h bzw. 24 h. Die Ergebnisse der Stabilitäts- und Zytotoxizitätsversuche in dieser Arbeit zeigen, dass beide verwendeten Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 h unter Standardzellkulturbedingungen stabil waren und nicht zytotoxisch wirkten.

4.3.2 Proteomanalytische Durchführung

In dieser Arbeit wurden zwei Techniken der zweidimensionalen Gelelektrophorese, 2D-PAGE und 2D-DIGE, angewandt, die für unsere Fragestellung zunächst etabliert und optimiert wurden (s. Kap. 3.4.1).

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist derzeit die einzig verfügbare Methode tausende von Proteinen simultan aufzutrennen [Marouga *et al.*, 2005]. Die Durchführung der Proteomanalyse bedeutet jedoch einen arbeits- und zeitintensiven Prozess, der eine Vielzahl von Fehlermöglichkeiten in sich birgt [Beranova-Giorgianni, 2003; Lopez, 2007]. Zudem ist das Proteom einer Zelle bzw. eines Organismus ein außerordentlich dynamisches System, das durch zahlreiche Parameter wie z. B. Kulturbedingungen, Differenzierungsgrad und zelluläre Interaktionen beeinflusst wird [Beranova-Giorgianni, 2003]. Zur reproduzierbaren Darstellung sowie zur nachfolgenden Auswertung und quantitativen Beurteilung eines Proteoms müssen daher alle Randbedingungen (Zellkulturbedingungen, Probenaufarbeitung, Proteintrennungsschritte etc.) möglichst genau definiert werden. Aus diesem Grund wurden die für die Proteomanalyse nötigen Arbeitsschritte weitestgehend standardisiert. Die Durchführung von 2D-PAGE und 2D-DIGE erfolgte durch eine exakte Einhaltung der erarbeiteten Protokolle (s. Kap. 2.2.5).

Die Methode der 2D-DIGE bietet wesentliche Vorteile gegenüber der 2D-PAGE, der klassischen Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Die 2D-DIGE ermöglicht die Auftrennung und Analyse von bis zu drei unterschiedlichen Proben innerhalb eines Gels durch Fluoreszenzmarkierung der Proteinproben mit verschiedenen Fluorochromen. Gel-zu-Gel-Variationen werden dadurch eliminiert, was die Reproduzierbarkeit erheblich verbessert [Alban *et al.*, 2003; Tannu & Hemby, 2006; Hrebicek *et al.*, 2007]. Bei der Durchführung einer 2D-PAGE beträgt der Variationskoeffizient bzgl. der technischen Variabilität im Schnitt 20-30 % [Molloy *et al.*, 2003]. Weiterhin

besteht bei der 2D-DIGE-Methode die Option einen internen Standard zu verwenden, der sich zu gleichen Teilen aus den im Experiment vorhandenen Proteinproben zusammensetzt. Dadurch kann jede Probe innerhalb eines Gels auf den internen Standard normalisiert werden, was die Quantifizierung verbessert und die technische Variabilität reduziert. Dies ist v. a. bei Proben wichtig, die sich in hohem Maße voneinander unterscheiden [Marouga *et al.*, 2005].

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten 2D-DIGE-Experimenten wurde auf das Mitführen eines internen Standards verzichtet, da durch die Verwendung von Zellkulturproben die biologische Variabilität allgemein recht gering ist. Zudem bestand ein Experiment aus insgesamt drei verschiedenen Behandlungsansätzen (DMSO-Kontrolle, 100 μ M und 500 μ M Ferulasäure), wodurch sich die Fluoreszenzmarkierung einer jeden Probe mit einem der drei vorhandenen Fluorochrome (Cy2, Cy3 und Cy5) anbot.

Die bei der 2D-DIGE verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die sog. *cyanine dyes* (CyDyes), sind sehr sensitiv (< 1 ng pro Spot) und decken einen hohen dynamischen Bereich ab ($> 10^3$) [Tonge *et al.*, 2001; Gorg *et al.*, 2004b; Marouga *et al.*, 2005]. Im Vergleich dazu liegt die Sensitivität einer Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie i. d. R. bei etwa 10-30 ng pro Spot [Candiano *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2005]. Die Silberfärbung ist ähnlich sensitiv wie die Fluoreszenzmarkierung mittels *cyanine dyes*; Proteinspots unter 1 ng können noch sichtbar gemacht werden [Tonge *et al.*, 2001; Westermeier & Marouga, 2005]. Allerdings stellen Silberfärbungen keine Endpunktfärbungen dar und sind daher nicht für quantitative Untersuchungen geeignet [Westermeier & Marouga, 2005].

Ein Nachteil der 2D-DIGE-Technik ist die schwierigere Spotidentifizierung mittels MS (s. Ausführungen Kap. 4.3.3). Eine weitere Problematik sind experimentelle Fehler, z. B. bei der Probenvorbereitung, der Fluoreszenzmarkierung der Proben und bei der Bildverarbeitung (mangelnde Spoterkennung und Hintergrundprobleme durch unterschiedliche Fluoreszenzcharakteristika von Acrylamid bei verschiedenen Wellenlängen).

Trotz technischer Verbesserungen besteht noch immer eine Hauptschwierigkeit in der begrenzten Reproduzierbarkeit von 2D-Gelen [Barrett *et al.*, 2005]. Daher sind Mehrfachbestimmungen unbedingt nötig, um eine statistisch sinnvolle, quantitative Aussage zu erhalten, v. a. bei Anwendung der 2D-PAGE-Technik. In dieser Arbeit

wurden mindestens drei unabhängige Experimente (biologische Replikate) durchgeführt sowie innerhalb eines Experiments jede Probe in einer Doppelbestimmung mitgeführt (technische Replikate). Nur diejenigen Proteine wurden als reguliert angesehen, deren Expression mindestens um den Faktor 0,5 bzw. 2 verändert war. Statistische Berechnungen ergaben, dass bei drei biologischen Replikaten im Allgemeinen mindestens zwei technische Replikate notwendig sind [Horgan, 2007]. Wird eine technische Variabilität von 20-30 % angenommen, wird erst ab einer zweifachen Expressionsänderung statistische Signifikanz erreicht [Barrett *et al.*, 2005].

4.3.3 Ferulasäureregulierte Proteine

Die Ergebnisse der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigen, dass Ferulasäure das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen beeinflussen konnte. Allerdings waren die Effekte von Ferulasäure auf Proteinebene überwiegend gering, was die relativ niedrigen Regulationsfaktoren v. a. in Anbetracht der hohen Standardabweichungen verdeutlichen. Lediglich für Annexin II konnte eine vierfach gesteigerte Expression nach Ferulasäurebehandlung ermittelt werden (s. Tab. 14).

Nahezu alle der mittels 2D-PAGE identifizierten 17 regulierten Proteine wurden durch Ferulasäure in ihrer Expression erhöht (s. Tab. 14). Lediglich *Endoplasmic precursor (HSP 90)* war nach 24-stündiger Behandlung mit 100 μ M Ferulasäure herunterreguliert. Interessanterweise konnten die meisten Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen beobachtet werden, wenn die Zellen für 4 h mit 100 μ M Ferulasäure inkubiert wurden. Dies lässt eine Kurzzeitwirkung von Ferulasäure vermuten. Keines dieser Proteine wurde durch 500 μ M Ferulasäure nach einem Zeitraum von 4 h vermehrt exprimiert, was möglicherweise auf einer dosisabhängigen Wirkung von Ferulasäure beruht. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Ferulasäure nicht nur antioxidative, sondern auch prooxidative Aktivität besitzt, was u. a. abhängig ist von der eingesetzten Dosis [Lee, 2005; Stagos *et al.*, 2005].

Die Mehrzahl der durch 2D-PAGE ermittelten ferulasäureregulierten Proteine besitzt katalytische Aktivität: *Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit*, *Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain*, *Ornithine aminotransferase* (mitochondriale

Vorläuferproteine), *Neutral alpha-glucosidase AB*, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B* (Vorläuferproteine) und *Transketolase*.

Drei der identifizierten Proteine sind sog. Chaperone⁴: *Heat shock protein 75 kDa* (mitochondriales Vorläuferprotein), *T-complex protein 1 subunit eta* und *Endoplasmic reticulum chaperone (HSP 90)* (Vorläuferprotein). Chaperone sind Proteine, die die Faltung und Oligomerisierung anderer Proteine kontrollieren. Die Expression einiger Chaperone wird unter Stressbedingungen (z. B. bei erhöhter Temperatur) induziert, weshalb diese Proteine daher Hitzeschockproteine (HSP) genannt werden.

Ezrin und *WD-repeat protein 1* sind Proteine, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind.

Annexin II und *Annexin IV* gehören zur Gruppe der durch Kalzium regulierten phospholipidbindenden Proteine.

Die Fähigkeit GTP zu binden, besitzen sowohl *Elongation factor 2* als auch *Septin-2*. Während *Elongation factor 2* an der Translation beteiligt ist, übt *Septin-2* eine Funktion in der Zytokinese und damit in der Zellvermehrung aus.

Nucleophosmin ist in der Lage Nukleinsäuren zu binden und dient als Shuttle-Protein für den nukleolären Transport von ribosomalen Komponenten.

Ein ferulasäurereguliertes Protein, das *Solute carrier family 25, member 24*, gehört zur Gruppe der mitochondrialen integralen Membranproteine.

Mit Hilfe der 2D-DIGE-Technik konnten durch Ferulasäurebehandlung von HT29 Klon 19A-Zellen insgesamt sieben Proteine nachgewiesen werden, die mindestens zweifach herunterreguliert waren (s. Tab. 15). Keines dieser Proteine war ebenfalls mittels 2D-PAGE identifiziert worden. Fünf der sieben Proteine konnten nachfolgend massenspektrometrisch bestimmt werden.

Die Proteine mit katalytischer Aktivität, *Protein disulfide-isomerase A3* (Vorläuferprotein) und *Creatine kinase B-type*, wurden sowohl nach vierstündiger Behandlung mit 100 µM Ferulasäure als auch nach vierstündiger Inkubation mit 500 µM Ferulasäure in ihrer Expression vermindert. *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1* und *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H* sind zytosolische Proteine, die die Fähigkeit besitzen Nukleinsäuren zu binden. Die

⁴ *chaperone*: engl. für Anstandsdame

Expression beider Proteine war nach Inkubation der HT29 Klon 19A-Zellen mit 100 μM Ferulasäure für 4 h um die Hälfte reduziert. Das Chaperon *Heat shock protein 60 kDa* (mitochondriales Vorläuferprotein) wurde durch eine vierstündige Behandlung mit 500 μM Ferulasäure herunterreguliert.

Zwei Proteine (Spot e und f), die nach vierstündiger Inkubation der Zellen mit 100 μM Ferulasäure reguliert worden waren, konnten mittels LS-ESI-MS/MS nicht identifiziert werden. Bei Anwendung der 2D-DIGE-Technik ist die nachfolgende Analyse der fluoreszenzmarkierten Proteine mitunter schwierig.

Sofern kein automatisierter Spotpicker zur Verfügung steht, müssen die fluoreszenzmarkierten Proteine nach dem Scannen der 2D-DIGE-Gele angefärbt werden, um diese sichtbar zu machen. Da im Vergleich zu präparativen 2D-PAGE-Gelen die aufgetragene Proteinmenge in analytischen 2D-DIGE-Gelen bedeutend geringer ist, scheiden weniger sensitive Färbemethoden wie z. B. die CBB-Färbung aus. Möglich ist die Visualisierung durch eine MS-kompatible Silberfärbung [Shevchenko *et al.*, 1996], die jedoch schlecht reproduzierbar ist.

Weit problematischer gestaltet sich die massenspektrometrische Proteinidentifizierung auf Grund zu geringer Proteinmengen von Spots aus analytischen Gelen. Daher werden häufig präparative 2D-Gele zur Proteinidentifikation per MS verwendet. Prinzipiell kann im gleichen Gel neben der fluoreszenzmarkierten Proteinprobe unmarkiertes Zelllysate derselben Probe aufgetrennt werden. Diese 2D-DIGE-Gele können nach dem Scannen mit CBB gefärbt und zur massenspektrometrischen Analyse eingesetzt werden. Bei der Methode des *minimal labellings*, bei der ca. 1-2 % aller Lysinreste eines Proteins fluoreszenzmarkiert werden [Unlu *et al.*, 1997], besitzt der geringe Anteil an fluoreszierendem Protein pro Farbstoffmolekül eine um ca. 500 Da höhere Masse als das unmarkierte Protein. Markiertes und unmarkiertes Protein sind deshalb im Gel nicht an exakt der gleichen Stelle zu finden, was sich stärker auf Proteine mit einem geringen Molekulargewicht auswirkt [Gharbi *et al.*, 2002]. Dies kann dazu führen, dass möglicherweise das falsche Protein aus dem 2D-Gel ausgestanzt wird [Hrebicek *et al.*, 2007].

In dieser Arbeit wurde bei der Auftrennung von fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem Protein mittels 2D-DIGE mit anschließender CBB-Färbung eine Abnahme in der Qualität der Spotmuster verzeichnet (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung die ferulasäure-

regulierten Proteinspots aus CBB-gefärbten 2D-PAGE-Gelen derselben Behandlungsgruppe ausgeschnitten. Sowohl Spot e als auch Spot f waren im CBB-Gel jedoch nicht zu erkennen. Dies ist in der geringeren Sensitivität der kolloidalen CBB-Färbung im Vergleich zur Fluoreszenzmarkierung mit *CyDyes* begründet [Tonge *et al.*, 2001; Gorg *et al.*, 2004b]. Zudem unterschieden sich die Spotmuster von 2D-PAGE- und 2D-DIGE-Gel derselben Behandlung leicht, was die Spotlokalisierung erschwerte. Durch das in dieser Arbeit durchgeführte *minimal labelling* (s. Kap. 2.2.5.8) werden nur diejenigen Proteine effizient gelabelt, die einen hohen Anteil an Lysin enthalten. So können bestimmte Spots in geringerem Maße im 2D-DIGE-Gel zu finden sein als im 2D-PAGE-Gel. Proteine, die kein Lysin enthalten, werden nicht markiert und sind daher letztendlich nicht im Gel erkennbar [Marouga *et al.*, 2005].

Es konnte kein Protein nachgewiesen werden, das nach Anwendung beider Proteomanalyse-Techniken als ferulasäurereguliert identifiziert wurde. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen überwiegend gering waren. Zum anderen dürfen die bereits beschriebenen methodischen Unterschiede bei der Durchführung einer 2D-PAGE oder einer 2D-DIGE nicht außer Acht gelassen werden. Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt die aufgetragene Proteinmenge. Während letztendlich nur 150 µg pro 2D-DIGE-Gel verwendet wurden, betrug die Proteinmenge pro 2D-PAGE-Gel fast das Vierfache. Je höher der Proteinauftrag in der ersten Dimension ist, desto größer ist die Konkurrenz der Proteine um das Einwandern ins Gel. Dies wirkt sich v. a. auf sehr hydrophobe bzw. sehr alkalische Proteine oder solche mit einem hohen Molekulargewicht aus. Diese Proteine tendieren generell zur Aggregation und Präzipitation in wässriger Lösung und wandern nur mit Schwierigkeit in die Gelmatrix ein [Rabilloud *et al.*, 1997; Gorg *et al.*, 2004b].

4.4 Untersuchung der ferulasäurevermittelten Proteinregulation am Beispiel von Annexin II, Annexin IV und Ezrin

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal ferulasäurevermittelte Effekte auf das Proteom von Kolonkarzinomzellen analysiert. Nach unserem derzeitigen Wissensstand existieren bislang nur Untersuchungen, die sich mit der Wirkung von Flavonoiden (Quercetin bzw. Flavon) auf das Proteom von Kolonkarzinomzellen beschäftigt haben [Wenzel *et al.*, 2004; Herzog *et al.*, 2004a; Mouat *et al.*, 2005]. Verschiedene Proteine, die durch Quercetin bzw. Flavon in ihrer Expression verändert wurden, wurden auch durch Ferulasäure reguliert, so z. B. Proteine der Annexinfamilie wie Annexin II und IV.

Annexine bilden eine Familie strukturell verwandter Proteine, die in Abhängigkeit von Kalzium an Phospholipide und Membranen binden können [Raynal & Pollard, 1994; Rescher & Gerke, 2004]. Die meisten Annexine sind häufig vorkommende intrazelluläre Proteine, die oft mehr als 2 % des zellulären Gesamtproteins ausmachen [Raynal & Pollard, 1994]. Wichtige Funktionen von Annexinen umfassen u. a. die Beteiligung an Exo- und Endozytoseprozessen sowie die Mitwirkung bei der Membranorganisation [Rescher & Gerke, 2004].

Annexin II ist ein Struktur- bzw. Gerüstprotein (*scaffolding protein*), das vermutlich verschiedene Membrandomänen in der Zelle stabilisiert und/oder deren Dynamik reguliert [Rescher & Gerke, 2004]. Annexin II ist ein Substrat für verschiedene Proteintyrosinkinasen und scheint an zahlreichen Signaltransduktionsprozessen beteiligt zu sein, die Einfluss auf die Krebsentstehung nehmen [Gerke & Moss, 2002]. Eine Funktion von Annexin II im Rahmen der DNA-Synthese und Zellproliferation wird diskutiert [Vishwanatha *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1999]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Annexin II in einer Vielzahl von Krebszelllinien und Tumoren höher exprimiert ist [Frohlich *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 1992; Vishwanatha *et al.*, 1993; Nygaard *et al.*, 1998]. Auch bei HT29-Kolonkarzinomzellen wurde eine höhere Annexin II-Expression im Vergleich zu nicht transformierten Zellen detektiert [Wildrick *et al.*, 1992]. In Prostatakrebszellen konnte im Gegensatz dazu eine verminderte Expression von Annexin II nachgewiesen werden [Liu *et al.*, 2003]. Noch besteht Unklarheit darüber, ob eine gesteigerte Expression von

Annexin II mit der Tumorprogression und Metastasierung von kolorektalen Karzinomen assoziiert [Emoto *et al.*, 2001] oder zelltypspezifisch ist und vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängt [Guzman-Aranguez *et al.*, 2005].

Die Funktion von Annexin IV im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen ist weniger gut erforscht. Annexin IV ist wie Annexin II ein Substrat für die Proteinkinase C [Weber *et al.*, 1987] und nimmt eine Schlüsselrolle bei der Apoptose von Zellen ein [Mouat *et al.*, 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass Annexin IV im Verlauf des programmierten Zelltodes aus dem Kern in das Zytosol transloziert [Gerner *et al.*, 2000]. Damit scheint Annexin IV als ein früher Apoptosemarker zu fungieren [Sohma *et al.*, 2002]. Durch Proteomanalysen wurde eine erhöhte Expression von Annexin IV bei Nierenzellkarzinomen [Zimmermann *et al.*, 2004] sowie in HCT15/A204197-Kolonkarzinomzellen nachgewiesen [Han *et al.*, 2000]. Möglicherweise kommt Annexin IV eine Bedeutung bei der Tumordissemination zu [Zimmermann *et al.*, 2004].

Während Annexin II und Annexin IV nach Inkubation von HT29-Zellen mit 150 μM Flavon in ihrer Expression vermindert waren [Herzog *et al.*, 2004a], wurden verschiedene Annexine durch Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit Quercetin in einer Konzentration von 20 μM [Mouat *et al.*, 2005] bzw. 150 μM [Wenzel *et al.*, 2004] vermehrt exprimiert. Unsere Versuche zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression von Annexin II und Annexin IV nach vierstündiger Behandlung der Zellen mit 100 μM Ferulasäure. Wenzel *et al.* vermuten, dass der quercetininduzierte Annexin II-Anstieg in HT29-Kolonkarzinomzellen mit einer gestörten Migrationsfähigkeit der Zellen einhergeht [Wenzel *et al.*, 2004]. Dies wäre eine Erklärung für die hemmende Wirkung von Quercetin auf die Tumorprogression. Bereits Liu *et al.* konnten durch Reexpression von Annexin II in Prostatakrebszellen inhibierende Effekte von Annexin II auf die Zellmotilität und -migration aufzeigen, wobei Proliferation und Apoptose unbeeinflusst waren [Liu *et al.*, 2003]. Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zur Zytotoxizität von Ferulasäure sowie zur Apoptoseinduktion durch Ferulasäure lassen sich nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 100 μM Ferulasäure nur geringe antiproliferative jedoch keine proapoptotischen Effekte feststellen (s. Kap. 3.2 und 3.3). Ein möglicher Einfluss von Ferulasäure auf die Zellmigration könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Nach Behandlung von NCOL-1-Kolonepithelzellen mit 150 μ M Quercetin für 24 h konnten Herzog *et al.* mittels Proteomanalyse eine erhöhte Expression an Annexin IV nachweisen. Die Apoptoseinduktion durch Quercetin wird für diesen Effekt verantwortlich gemacht [Herzog *et al.*, 2004b]. Da eine proapoptotische Wirkung durch 100 μ M Ferulasäure in unseren Versuchen ausgeschlossen werden kann, müssen andere Gründe für die Hochregulation von Annexin IV in Betracht gezogen werden.

Neben Annexin II und IV wurde zudem der Einfluss von Ferulasäure auf die Expression von Ezrin auf Translationsebene mittels Western Blot und auf Transkriptionsebene mittels Real Time-PCR überprüft.

Ezrin gehört neben Radixin und Moesin zur Gruppe der ERM-Proteine. ERM-Proteine verbinden Aktinfilamente mit der Plasmamembran und sind beteiligt an der Morphogenese von Membranstrukturen, an der Zellmotilität sowie an der Zelladhäsion [Tsukita *et al.*, 1997; Mangeat *et al.*, 1999]. Ezrin ist ein wichtiger Bestandteil der Mikrovilli intestinaler Epithelzellen und kommt in aktinreichen Strukturen zahlreicher Zelllinien vor [Berryman *et al.*, 1993]. Wie Annexin II ist auch Ezrin Substrat für verschiedene Proteintyrosinkinasen und spielt damit eine Rolle bei Signaltransduktionsprozessen [Akisawa *et al.*, 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass Ezrin mit dem Produkt des Tumorsuppressorgens *NF-2*, Merlin, interagieren kann und dadurch vermutlich an der Tumorentstehung beteiligt ist [Meng *et al.*, 2000]. Inzwischen besteht eine zunehmende Evidenz für eine Bedeutung von Ezrin im Rahmen der Tumorprogression [Gautreau *et al.*, 2002]. Im Vergleich zwischen metastatischen und nicht-metastatischen Zellen unterschiedlichen Ursprungs weisen metastatische Zellen eine allgemein höhere Expression an Ezrin auf [Akisawa *et al.*, 1999; Ohtani *et al.*, 1999]. Auch invasive Zellen von Tumoren sind durch eine hohe Ezrinexpression charakterisiert [Geiger *et al.*, 2000; Nestl *et al.*, 2001]. Unsere Ergebnisse der 2D-PAGE, die eine Hochregulation von Ezrin nach Ferulasäurebehandlung aufzeigten, stehen dazu im Widerspruch. Allerdings war in unseren Versuchen die Regulation von Ezrin durch Ferulasäure nicht übermäßig stark; der durchschnittliche Regulationsfaktor betrug etwa 2.

4.4.1 Ferulasäurevermittelte Regulation von Annexin II, Annexin IV und Ezrin auf Expressionsebene

Mit anderen molekularbiologischen Methoden sollte die mittels Proteomanalyse erkennbare Regulation von Annexin II, Annexin IV und Ezrin durch Ferulasäure genauer untersucht werden. Die ferulasäurevermittelten Effekte wurden erneut auf Proteinebene durch Western Blot und nachfolgender Immunodetektion sowie auf mRNA-Ebene durch Real Time-PCR analysiert. Neben den in der zweidimensionalen Gelelektrophorese verwendeten Konzentrationen wurden zusätzlich niedrigere bzw. höhere Ferulasäurekonzentrationen eingesetzt. Auch der Einfluss einer unterschiedlichen Inkubationsdauer und der Zelldichte wurde überprüft.

Weder auf Translationsebene mittels Western Blot noch auf Transkriptionsebene mittels Real Time-PCR konnte eine signifikante Wirkung von Ferulasäure auf die Expression der ausgewählten Proteine bzw. der zugehörigen Zielgene festgestellt werden (s. Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14). Damit gingen die im 2D-Gel erkennbaren Unterschiede in der Spotintensität von Annexin II, IV und Ezrin nach Ferulasäureinkubation nicht auf eine differenzielle Expression zurück. Eine Expressionsänderung hätte zumindest im Western Blot sichtbar sein müssen. Dagegen geht die Regulation auf Proteinebene nicht zwingend mit einer solchen auf mRNA-Ebene einher. Dies kann mehrere Ursachen haben wie z. B. alternatives Spleißen der RNA oder posttranslationale Modifikationen [Czupalla *et al.*, 2005]. Welche Gründe für die ferulasäurevermittelte Regulation von Annexin II, Annexin IV und Ezrin verantwortlich sein könnten, wurde Gegenstand der nachfolgenden Untersuchung.

Allen drei ausgewählten Proteinen ist gemein, dass sie intrazellulär sowohl in löslicher Form im Zytoplasma als auch membranassoziiert vorliegen können [Mangeat *et al.*, 1999; Gerke *et al.*, 2005]. Eine Bindung von Annexin II, Annexin IV bzw. Ezrin an Membranstrukturen und deren Beteiligung an der Membranorganisation erfolgt jedoch nur auf bestimmte Auslöser hin. Im Falle vieler Annexine kommt es vorwiegend dann zu einer Rekrutierung an die Membran, wenn der intrazelluläre Kalziumspiegel steigt [Rescher & Gerke, 2004; Gerke *et al.*, 2005]. Bei ERM-Proteinen wie Ezrin führt vermutlich eine Konformationsänderung zu einer Translokation des Proteins aus dem löslichen Pool zur membranassoziierten Form. Dabei geht die Verknüpfung von Membran-Zytoskelett-Strukturen durch ERM-Proteine mit einer gesteigerten ERM-Phosphorylierung einher. Im Gegensatz dazu

vermittelt die Dephosphorylierung den Übergang zum löslichen Zustand [Mangeat *et al.*, 1999].

Möglicherweise wäre ein ferulasäurevermittelter Verteilungsunterschied von Annexin II, Annexin IV und Ezrin innerhalb der Zelle denkbar, der sich auf die zweidimensionale Proteinsolubilisierung bzw. -auftrennung auswirken und die feststellbaren Veränderungen in der Spotintensität im HT29 Klon 19A-Proteom erklären könnte. Dies sollte am Beispiel von Annexin II genauer untersucht werden.

4.4.2 Einfluss von Ferulasäure auf die Lokalisation und Solubilisierung von Annexin II

Zunächst sollte ausgeschlossen werden, dass auf Grund möglicher posttranslationaler Modifikationen Isoformen von Annexin II existieren, die sich zwischen unbehandelten HT29 Klon 19A-Zellen und Zellen nach Ferulasäurebehandlung unterscheiden könnten. Die Fokussierung von Proteinisoformen zu unterschiedlichen isoelektrischen Punkten während der ersten Dimension hätte eine Lokalisation von Annexin II in verschiedenen Bereichen des 2D-Gels zur Folge. Die Summe der Annexin II-Expression bliebe dabei insgesamt unverändert. Das Vorkommen bestimmter Annexin II-Isoformen könnte die mittels Proteomanalyse festgestellten Unterschiede in der Spotintensität zwischen Kontrolle und Behandlung erklären (s. Abb. 11). Die Immunodetektion von Annexin II im gesamten 2D-Gel machte deutlich, dass Annexin II zwar in mehreren Isoformen vorlag, diese aber kaum zwischen unbehandelten und behandelten Gelen differierten. Lediglich im pH-Bereich 5-7 des HT29 Klon 19A-Proteoms wurden nach Ferulasäurebehandlung zwei Isoformen in geringer Intensität nachgewiesen, die im Kontrollgel nicht sichtbar waren (s. Abb. 15). Auffällig war, dass Annexin II durch Ferulasäure zweidimensional besser aufgeschlossen bzw. aufgetrennt wurde. Während im 2D-Gel nach Ferulasäurebehandlung stärkere Annexin II-Signale im pH-Bereich 7 im Vergleich zur Kontrolle detektiert wurden, wies das Kontrollgel mehr präzipitiertes Annexin II an der Probenapplikationsstelle für die erste Dimension auf (s. Abb. 15).

Ein möglicher Grund für die geringere Annexin II-Präzipitation nach Ferulasäureinkubation könnte ein verstärktes Einwandern dieses Proteins in den Gelstreifen

während der ersten Dimension sein. Dies wäre mit einer besseren Löslichkeit von Annexin II erklärbar. Die Proteinlöslichkeit scheint dabei eng mit der Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle verknüpft zu sein. Generell sind hydrophobe Proteine, insbesondere integrale Membranproteine, im Vergleich zu löslichen zytoplasmatischen Proteinen schlechter solubilisierbar und tendieren zur Aggregation und Präzipitation in wässriger Lösung [Gorg *et al.*, 2004b]. Periphere Membranproteine lassen sich durch sehr hoch- oder niederosmolare Lösungen bzw. durch Lösungen mit extremen pH-Werten von der Membran lösen. Dagegen sind integrale Membranproteine nur unter Bedingungen löslich, die zur Zerstörung der Membran führen. Eine Schwierigkeit besteht häufig auch im Transfer der Membranproteine von der ersten zur zweiten Dimension [Rabilloud *et al.*, 1997; Gorg *et al.*, 2004b]. Es wurde beobachtet, dass die quantitativen Verluste an Membranproteinen umso größer sind, je mehr Protein in der ersten Dimension aufgetragen wird (v. a. bei präparativen 2D-Gelen) [Rabilloud *et al.*, 1997].

Annexin II als peripheres Membranprotein ist ein wichtiger Teil des submembranösen Zytoskellets und überwiegend in Subdomänen von Plasmamembran und frühen Endosomen zu finden [Gerke & Moss, 1997; Gerke & Moss, 2002]. Durch Assoziation von Annexin II mit Dimeren des S100-Proteins p11 liegt Annexin II als Heterotetramer ($Anx_2/p11_2$) vor, welches durch hydrophobe Wechselwirkung stabilisiert wird [Gerke, 1989; Gerke & Moss, 1997]. An der Verknüpfung von Membran-Zytoskelett-Strukturen ist nur heterotetrameres Annexin II beteiligt [Thiel *et al.*, 1992; Waisman, 1995]. Heterodimere Formen von Annexin II können mit dem Zellkern assoziieren, während monomeres Annexin II hauptsächlich im Zytosol lokalisiert ist [Waisman, 1995]. Welche Form von Annexin II in der Zelle überwiegt, ist abhängig von der Zelllinie bzw. vom Gewebe. In intestinalen Epithelzellen liegt Annexin II nahezu zu 100 % als $Anx_2/p11_2$ -Heterotetramer vor [Eberhard *et al.*, 2001].

Thiel *et al.* konnten zeigen, dass monomeres Annexin II durch Triton X-100 unter Anwesenheit von Kalzium vollständig extrahiert wurde. Heterotetrameres Annexin II dagegen konnte nicht extrahiert werden, da es mit dem submembranösen Zytoskelett vernetzt war [Thiel *et al.*, 1992]. Liu und Zimmermann demonstrierten, dass mittels EGTA nur die Extraktion von löslichem zytoplasmatischem Annexin II erfolgte. Annexin II in membrangebundener Form konnte unter alkalischen Bedingungen extrahiert und durch Behandlung mit Triton X-114 solubilisiert werden [Liu *et al.*, 1997].

Für den Anx₂/p11₂-Komplex wurde in der Literatur zudem eine Assoziation mit Membrandomänen wie z. B. *lipid rafts* beschrieben [Eberhard *et al.*, 2001; Rescher & Gerke, 2004]. Generell lassen sich Proteine aus Membrandomänen nur nach Isolierung des Subproteoms mittels spezieller Fraktionierungstechniken nachweisen. Auch die Wahl der Detergenzien bei der Probenaufarbeitung ist kritisch für die Solubilisierung von *lipid raft*-Proteinen. So ist die Löslichkeit von Membranproteinen deutlich erhöht, wenn anstelle des Detergens CHAPS, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde, Triton X-100 in Kombination mit Harnstoff und Thioharnstoff verwendet wird [Sprenger *et al.*, 2004].

Es ist daher anzunehmen, dass die zelluläre Lokalisation von Annexin II Einfluss auf dessen Solubilisierungsfähigkeit hat. Annexin II in membranassoziierter Form ist höchstwahrscheinlich für die zweidimensionale Auftrennung schlechter in Lösung zu bringen. Die Proteinsolubilisierung mit 2D-Lysispuffer ohne Zusatz von Kalziumkomplexierern wie EGTA oder EDTA lässt vermuten, dass membranassoziertes Annexin II nur unvollständig von der Membran gelöst wurde.

Inwieweit sich das subzelluläre Vorkommen von Annexin II durch Ferulasäure verändert, wurde zunächst mittels Immunfluoreszenz überprüft. Bei unbehandelten HT29 Klon 19A-Zellen war Annexin II überwiegend im Bereich der Plasmamembran lokalisiert (s. Abb. 16), was ebenfalls Guzmán-Aránguez *et al.* am Beispiel der Kolonkarzinomzelllinie BCS-TC2 aufzeigen konnten [Guzman-Aranguez *et al.*, 2005]. Nach Inkubation der Zellen mit Ferulasäure, v. a. bei einer verwendeten Konzentration von 500 µM, war Annexin II nur noch in geringem Maße mit der Plasmamembran assoziiert. Dagegen wurde Annexin II verstärkt im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen (s. Abb. 16). Dies ließ einen Einfluss von Ferulasäure auf die intrazelluläre Verteilung von Annexin II vermuten. Da eine Quantifizierung von Annexin II mittels Immunfluoreszenz nicht möglich war, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt und die Menge an Annexin II in Kern-, Zytosol- und Membranfraktion durch Immundetektion bestimmt. Dabei konnte auf Translationsebene keine veränderte Verteilung von Annexin II nach Ferulasäurebehandlung festgestellt werden (s. Abb. 17). Annexin II wurde vorwiegend in der Kernfraktion detektiert, was den Immunfluoreszenzerggebnissen für unbehandelte Zellen widerspricht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kernfraktion Kontaminationen mit Membranstrukturen aufwies (s. Abb. 17). Diese Verunreinigung der Kernfraktion könnte in der Durchführung der

Fraktionierung begründet sein. Jüngste Untersuchungen von Say und Hooper ergaben, dass nukleäre Fraktionen je nach Art der subzellulären Fraktionierung mit *lipid raft*-Membranstrukturen bzw. mit sonstigen Membranbestandteilen kontaminiert sein können [Say & Hooper, 2007].

Mittels Zellfraktionierung konnte damit keine Veränderung des intrazellulären Vorkommens von Annexin II nachgewiesen werden. Für die Immunodetektion von Annexin II wurde in der Immunfluoreszenz wie auch im Western Blot der gleiche monoklonale Antikörper verwendet. Da mittels Immunfluoreszenz eine veränderte Annexin II-Verteilung nach Ferulasäurebehandlung sichtbar war, könnte die Diskrepanz der Immunfluoreszenz- und Western Blot-Ergebnisse möglicherweise in der Durchführung der Zellfraktionierung begründet sein. In nachfolgenden Untersuchungen wäre zu klären, ob die Verwendung des hypotonen Puffers bzw. die Zentrifugationsbedingungen bei der Zellfraktionierung die Verteilung von Annexin II beeinflussen können.

Weiterhin könnte der Frage nachgegangen werden, inwieweit bzw. durch welchen möglichen Mechanismus Ferulasäure die Solubilisierung von Annexin II oder anderen Proteinen verbessern kann. Denkbar wäre, dass Ferulasäure mit dem heterotetrameren membranassoziierten Annexin II einen Komplex bildet, dessen Wechselwirkungen jene zwischen Annexin II und Kalziumionen übersteigen. Dies könnte zur Ablösung des Annexin II-Ferulasäure-Komplexes von der Membran führen. In der nachfolgenden proteomanalytischen Probenaufarbeitung würden die frei vorliegenden Komplexe mittels 2D-Lysisbuffer gespalten. Das entstehende monomere Annexin II wäre besser zweidimensional auftrennbar, was die mittels Proteomanalyse sichtbaren Unterschiede in der Spotintensität zwischen Kontrolle und nach Ferulasäureinkubation erklären könnte. Die Durchführung einer Autoradiographie könnte Aufschluss über die potenzielle Komplexbildung zwischen Ferulasäure und Annexin II geben.

Grundlegend muss jedoch ausgeschlossen werden, dass die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese festgestellte Regulation von Annexin II kein bloßes Artefakt ist. In einer Vielzahl von publizierten Proteomanalysen wurde Annexin II als differenziell reguliert identifiziert. Allerdings erfolgte häufig keine Validierung auf

Translations- bzw. Transkriptionsebene unter Verwendung anderer Methoden [Wenzel *et al.*, 2004; Mouat *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007]. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die zweidimensionale Gelelektrophorese als hoch auflösende Trenntechnik mit Schwierigkeiten in der technischen Durchführung und mit verschiedenen Limitationen verbunden ist. Das Proteom als dynamisches System reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen verschiedenster Einflussgrößen. Die größte Problematik bei der Durchführung einer quantitativen Proteomanalyse liegt daher in der reproduzierbaren Darstellung des Proteoms, ohne die in der Natur vorliegenden quantitativen Verhältnisse während der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu verändern.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich, dass Ferulasäure in physiologischen Konzentrationen nahezu keinen Effekt auf die Apoptoserate bzw. auf die Proliferation von HT29 Klon 19A-Zellen ausübt. Auch konnte nur eine marginale Wirkung von Ferulasäure auf Proteomebene festgestellt werden.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung dar. Es besteht eine überzeugende Evidenz dafür, dass ein hoher Obst- und Gemüseverzehr dazu beiträgt das kolorektale Krebsrisiko zu senken. Die krebsprotektiven Effekte von Obst und Gemüse beruhen auf den darin enthaltenen potenziell antikarzinogenen Bestandteilen wie Ballaststoffen, Vitaminen und sekundären Pflanzenstoffen. Phenolsäuren sind in der Natur weit verbreitete sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wobei deren krebspräventive Wirkungsweise auf molekularer Ebene bislang nur unzureichend bekannt ist. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ferulasäure, der häufigsten Hydroxycimtsäure in Getreide, auf zelluläre Mechanismen der Kolonkarzinogenese und Tumorprogression in einem Zellkulturmodell (HT29 Klon 19A) untersucht. Vorversuche ergaben, dass Ferulasäure ab einer Konzentration von 100 μM über einen Zeitraum von 48 h unter Standardzellkulturbedingungen nahezu vollständig stabil war. In niedrigen Ferulasäurekonzentrationen konnten kaum proapoptotische bzw. proliferationshemmende Effekte nachgewiesen werden. Erst in hohen Konzentrationen ($> 3 \text{ mM}$) wirkte Ferulasäure zytotoxisch und induzierte signifikant Apoptose. Mittels Proteomanalyse (2D-PAGE und 2D-DIGE) wurde untersucht, inwieweit Ferulasäure in Konzentrationen von 100 μM bzw. 500 μM über einen Expositionszeitraum von 4 h bzw. 24 h die Proteinexpression in HT29 Klon 19A-Zellen verändern kann. Die in ihrer Expression veränderten Proteine wurden massenspektrometrisch unter Verwendung von LC-ESI-MS/MS bestimmt. Durch 2D-PAGE wurden insgesamt 17 regulierte Proteine nach Ferulasäurebehandlung identifiziert, während durch 2D-DIGE sieben differenziell exprimierte Proteine ermittelt wurden. Dabei waren die Effekte von Ferulasäure auf das Proteom von HT29 Klon 19A-Zellen relativ gering, was sich in niedrigen Regulationsfaktoren widerspiegelte. Die durch Ferulasäure am stärksten hochregulierten Proteine waren Annexin II und Annexin IV, welche gemeinsam mit Ezrin in den nachfolgenden Experimenten näher auf ihre Regulation hin untersucht wurden. Es konnte sowohl auf Translationsebene mittels Western Blot als auch auf Transkriptionsebene durch Real Time-PCR gezeigt werden, dass die Regulation der ausgewählten Proteine durch Ferulasäure nicht auf einer veränderten Expression beruhte. Da Annexin II und Annexin IV wie auch Ezrin intrazellulär sowohl in löslicher Form als auch membranassoziiert vorliegen können, schien ein durch Ferulasäure vermittelter Verteilungsunterschied innerhalb der Zelle wahrscheinlich. Dies wurde im Weiteren am Beispiel von Annexin II untersucht. Die Immunodetektion von Annexin II im gesamten 2D-Gel ergab, dass dieses Protein nach Ferulasäurebehandlung besser zweidimensional aufgetrennt wurde, was vermutlich in einer gesteigerten Proteinlöslichkeit begründet war und die scheinbare Regulation erklärte. Eine veränderte Lokalisation von Annexin II als Grundlage für eine verbesserte Solubilisierung ließ sich nach Ferulasäureinkubation mittels Immunfluoreszenz jedoch nicht durch Zellfraktionierung nachweisen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Ferulasäure die zellulären Mechanismen der Kolonkarzinogenese und Tumorprogression *in vitro* nur in hohen Konzentrationen beeinflusste. Obwohl Ferulasäure in großer Menge in pflanzlichen Lebensmitteln zu finden ist, geht eine

mögliche krebsschutzende Wirkung daher wahrscheinlich nicht auf die Einzelsubstanz als solche zurück. Die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte eines hohen Verzehrs an Obst und Gemüse sowie Getreide/-produkten auf das Kolonkrebsrisiko lassen sich vermutlich vielmehr auf das Zusammenspiel verschiedenster potenziell antikarzinogener bzw. antimutagener Lebensmittelinhaltsstoffe zurückführen.

6 Summary

Colorectal cancer is the third most common type of cancer worldwide. Eating plenty of fruit and vegetables is said to reduce the risk of contracting colorectal cancer. Fruit and vegetables contain potentially anticarcinogenic ingredients, such as fibres, vitamins and secondary plant substances, which protect against cancer. Phenolic acids are secondary plant substances widespread in nature. The way these phenolic acids work on molecular level to prevent cancer, is insufficiently known so far. The most common hydroxycinnamic acid in grain is ferulic acid. In this study, the influence of ferulic acid on the cellular mechanisms of colon carcinogenesis and tumor progression was investigated in a cell culture model (HT29 clone 19A). Preliminary tests showed that ferulic acid was almost completely stable under cell culture conditions at a concentration of 100 μM over a time period of 48 h. At low concentrations ferulic acid caused only marginally proapoptotic or proliferation inhibiting effects. Only at high concentrations ($> 3 \text{ mM}$) did ferulic acid have a cytotoxic effect and induced apoptosis significantly. By means of proteome analysis (2D-PAGE and 2D-DIGE) it was investigated, whether ferulic acid at concentrations of 100 μM or 500 μM may change the protein expression of HT29 clone 19A cells after an incubation time of 4 h and 24 h. Proteins changed in expression level were analysed with the help of mass spectrometry using LC-ESI-MS/MS. By means of 2D-PAGE a total of 17 regulated proteins were identified after ferulic acid treatment. With the help of 2D-DIGE seven differentially expressed proteins were determined. The effects of ferulic acid upon the proteome of HT29 clone 19A cells were relatively small due to low regulation factors. The proteins Annexin II and Annexin IV were upregulated to the strongest extent by ferulic acid. In the following experiments, the regulation of those proteins and of Ezrin was investigated in more detail. Western Blotting revealed at the translational level that the regulation of the selected proteins by ferulic acid was not due to an altered expression. In addition, this was also shown at the transcriptional level using Real time PCR. Annexin II and IV and also Ezrin occur intracellularly in soluble as well as in membrane associated form. Therefore, a distinct cellular distribution of them by ferulic acid seemed to be probable. This was further investigated by using the example of Annexin II. The immunodetection of Annexin II within the 2D-gel revealed that the protein was better separated two-dimensionally after having been treated with ferulic acid. Presumably, this was due to an increased protein solubility and could account for the apparent regulation. A changed localization of Annexin II, which might be the basis for a better solubilization, was detected by means of immunofluorescence but could not be analysed using cell fractionation.

The present study shows that ferulic acid affected the cellular mechanisms of colon carcinogenesis and tumor progression *in vitro* solely in high concentrations. Although ferulic acid occurs in plant-based foods in large amounts, a possible cancer protective effect is probably not due to the single substance. The beneficial impact of a high intake of fruit and vegetables as well as of grain and cereal products described in the literature is more likely based on the interaction of distinct potentially anticarcinogenic or antimutagenic food ingredients.

7 Literaturverzeichnis

- Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M, Demigne C, Remesy C (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr* 132, 1962-1968.
- Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S (1996). Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol* 81, 943-955.
- Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, Onishi S, Hollingsworth MA (1999). High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 395-400.
- Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Electrophoresis* 3, 36-44.
- Anderson NL, Anderson NG (1978). Analytical techniques for cell fractions. XXII. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple gradient-slab gel electrophoresis. *Anal Biochem* 85, 341-354.
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT (2001a). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem* 49, 5679-5684.
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT (2001b). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radic Biol Med* 31, 304-314.
- Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Hansen A, Meyer AS (2001c). Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 49, 4090-4096.
- Augeron C, Laboisie CL (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 44, 3961-3969.
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221.
- Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ, Keshavarzian A (1999). Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 1075-1085.

- Barch DH, Rundhaugen LM, Pillay NS (1995). Ellagic acid induces transcription of the rat glutathione S-transferase-Ya gene. *Carcinogenesis* 16, 665-668.
- Barch DH, Rundhaugen LM, Stoner GD, Pillay NS, Rosche WA (1996). Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis* 17, 265-269.
- Barrett J, Brophy PM, Hamilton JV (2005). Analysing proteomic data. *Int J Parasitol* 35, 543-553.
- Beranova-Giorgianni S (2003). Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends Anal Chem* 22, 273-281.
- Berglund G (2002). Anthropometry, physical activity and cancer of the breast and colon. *IARC Sci Publ* 156, 237-241.
- Berryman M, Franck Z, Bretscher A (1993). Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* 105 (Pt 4), 1025-1043.
- Biesalski HK (2002). Meat and cancer: meat as a component of a healthy diet. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 1, S2-11.
- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorransoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361, 1496-1501.
- Bourne L, Paganga G, Baxter D, Hughes P, Rice-Evans C (2000). Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. *Free Radic Res* 32, 273-280.
- Bourne LC, Rice-Evans C (1998). Bioavailability of ferulic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 222-227.
- Boyle P, Ferlay J (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16, 481-488.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Buchanan CJ, Fry SC, Eastwood MA (1996). The use of ¹⁴C-labelled substrates to study plant cell wall breakdown in the gastrointestinal tract. *Proc Nutr Soc* 55, 927-936.
- Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, Riboli E (2002). Plant foods and the risk of colorectal cancer in Europe: preliminary findings. *IARC Sci Publ* 156, 89-95.

- Bunzel M, Steinhart H (2003). Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten. *Chem Unserer Zeit* 37, 188-196.
- Busche R, Jeromin A, von EW, Rechkemmer G (1993). Basolateral mechanisms of intracellular pH regulation in the colonic epithelial cell line HT29 clone 19A. *Pflugers Arch* 425, 219-224.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22, 749-760.
- Castelluccio C, Bolwell GP, Gerrish C, Rice-Evans C (1996). Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem J* 316 (Pt 2), 691-694.
- Chan WH, Chang YJ (2006). Dosage effects of resveratrol on ethanol-induced cell death in the human K562 cell line. *Toxicol Lett* 161, 1-9.
- Chen K, Qiu JL, Zhang Y, Zhao YW (2003). Meta analysis of risk factors for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 9, 1598-1600.
- Chesson A, Provan GJ, Russell WR, Scobbie L, Richardson AJ, Stewart C (1999). Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J Sci Food Agric* 79, 373-378.
- Chiang Y, Rizzino A, Sibenaller ZA, Wold MS, Vishwanatha JK (1999). Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 199, 139-147.
- Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 18, 1670-1681.
- Clifford MN (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 79, 362-372.
- Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL (1997). Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. *Cancer Causes Control* 8, 649-667.
- Cole SP, Pinkoski MJ, Bhardwaj G, Deeley RG (1992). Elevated expression of annexin II (lipocortin II, p36) in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* 65, 498-502.
- Cross AJ, Sinha R (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen* 44, 44-55.
- Czupalla C, Mansukoski H, Pursche T, Krause E, Hoflack B (2005). Comparative study of protein and mRNA expression during osteoclastogenesis. *Proteomics* 5, 3868-3875.

- Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT (2002). Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 61, 97-103.
- DeVries JW (2003). On defining dietary fibre. *Proc Nutr Soc* 62, 37-43.
- DGE (Hrsg.) (2004). Ernährungsbericht 2004. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn.
- Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE (2001). Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* 114, 3155-3166.
- Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Nakajima Y (2001). Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 92, 1419-1426.
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86, 543-552.
- Faivre J, Bonithon-Kopp C (2002). Effect of fibre and calcium supplementation on adenoma recurrence and growth. *IARC Sci Publ* 156, 457-461.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Ferguson LR (2005). Does a diet rich in dietary fibre really reduce the risk of colon cancer? *Dig Liver Dis* 37, 139-141.
- Ferguson LR, Zhu ST, Harris PJ (2005). Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Mol Nutr Food Res* 49, 585-593.
- Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M (1987). Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327, 298-303.
- Friedenreich CM, Orenstein MR (2002). Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 132, 3456S-3464S.
- Friedman M, Jurgens HS (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48, 2101-2110.
- Frohlich M, Motte P, Galvin K, Takahashi H, Wands J, Ozturk M (1990). Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol* 10, 3216-3223.
- Garcia-Conesa MT, Wilson PD, Plumb GW, Ralph J, Williamson G (1999). Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- β,β' -bicycinnamic acid (8-8-diferulic acid, non-cyclic form). *J Sci Food Agric* 79, 379-384.

- Gautreau A, Louvard D, Arpin M (2002). ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling. *Curr Opin Cell Biol* 14, 104-109.
- Gazzaniga JM, Lupton JR (1987). Dilution effect of dietary fiber sources: An in vivo study in the rat. *Nutr Res* 7, 1261-1268.
- Geiger KD, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A (2000). Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 157, 1785-1793.
- GEKID (Hrsg.) (2006). Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut, Saarbrücken.
- Gerhaeuser C (2001). Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe. *Aktuel Ernaehr Med* 26, 137-143.
- Gerke V (1989). Tyrosine protein kinase substrate p36: a member of the annexin family of Ca²⁺/phospholipid-binding proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 14, 449-454.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 449-461.
- Gerke V, Moss SE (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357, 129-154.
- Gerke V, Moss SE (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82, 331-371.
- Gerner C, Frohwein U, Gotzmann J, Bayer E, Gelbmann D, Bursch W, Schulte-Hermann R (2000). The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J Biol Chem* 275, 39018-39026.
- Gharbi S, Gaffney P, Yang A, Zvelebil MJ, Cramer R, Waterfield MD, Timms JF (2002). Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics* 1, 91-98.
- Giovannucci E (2003). Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt)* 12, 173-182.
- Goncalves J, Jallepalli P, Gabuzda DH (1994). Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68, 704-712.
- Gorg A, Drews O, Klaus A, Luck C, Reil G, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2004a). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A laboratory manual.
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ (2004b). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
- Graf E (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med* 13, 435-448.

- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J (1997). Molecular Biology of Colorectal Cancer. *Curr Probl Cancer* 21, 233-300.
- Guzman-Aranguez A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Perez-Ramos P, Lopez de Silanes I, Lizarbe MA (2005). Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 94, 178-193.
- Halliwell B (2003). Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett* 540, 3-6.
- 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.
- Han EK, Tahir SK, Cherian SP, Collins N, Ng SC (2000). Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines. *Br J Cancer* 83, 83-88.
- Helser MA, Hotchkiss JH (1994). Comparison of Tomato Phenolic and Ascorbate Fractions on the Inhibition of *N*-Nitroso Compound Formation. *J Agric Food Chem* 42, 129-132.
- Herrmann K (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28, 315-347.
- Herzog A, Kindermann B, Doring F, Daniel H, Wenzel U (2004a). Pleiotropic molecular effects of the pro-apoptotic dietary constituent flavone in human colon cancer cells identified by protein and mRNA expression profiling. *Proteomics* 4, 2455-2464.
- Herzog A, Kuntz S, Daniel H, Wenzel U (2004b). Identification of biomarkers for the initiation of apoptosis in human preneoplastic colonocytes by proteome analysis. *Int J Cancer* 109, 220-229.
- Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, Lee MJ, Yang CS (2004). Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 25, 1671-1679.
- Horgan GW (2007). Sample size and replication in 2D gel electrophoresis studies. *J Proteome Res* 6, 2884-2887.
- Hrebicek T, Durrschmid K, Auer N, Bayer K, Rizzi A (2007). Effect of CyDye minimum labeling in differential gel electrophoresis on the reliability of protein identification. *Electrophoresis* 28, 1161-1169.
- Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH (1991). Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 51, 813-819.
- Jass JR (2006). Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 12, 4943-4950.

- Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, Dewitt DL, Nair MG (2006). Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 54, 5375-5381.
- Jenner AM, Rafter J, Halliwell B (2005). Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 38, 763-772.
- Jubb AM, Bell SM, Quirke P (2001). Methylation and colorectal cancer. *J Pathol* 195, 111-134.
- Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtzioglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6, R63-R74.
- Kern SM, Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA, Garcia-Conesa MT (2003a). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J Agric Food Chem* 51, 6050-6055.
- Kern SM, Bennett RN, Needs PW, Mellon FA, Kroon PA, Garcia-Conesa MT (2003b). Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 51, 7884-7891.
- Kitisin K, Mishra L (2006). Molecular biology of colorectal cancer: new targets. *Semin Oncol* 33, S14-S23.
- Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farre S, Galeotti T (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 25, 191-198.
- Konishi Y, Kobayashi S (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 52, 2518-2526.
- Konishi Y, Shimizu M (2003). Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 856-862.
- Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M (2006). Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J Agric Food Chem* 54, 7539-7543.
- Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Robertson JA, Williamson G (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J Agric Food Chem* 45, 661-667.
- Kroon PA, Williamson G (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J Sci Food Agric* 79, 355-361.
- Kune G, Watson L (2006). Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. *Nutr Cancer* 56, 11-21.

- Lee YS (2005). Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. *Arch Pharm Res* 28, 1183-1189.
- Li M, Xiao ZQ, Chen ZC, Li JL, Li C, Zhang PF, Li MY (2007). Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue. *J Biochem Mol Biol* 40, 72-81.
- Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA (1999). Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr* 19, 545-586.
- Liu JW, Shen JJ, Tanzillo-Swarts A, Bhatia B, Maldonado CM, Person MD, Lau SS, Tang DG (2003). Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene* 22, 1475-1485.
- Liu L, Tao JQ, Zimmerman UJ (1997). Annexin II binds to the membrane of A549 cells in a calcium-dependent and calcium-independent manner. *Cell Signal* 9, 299-304.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lopez JL (2007). Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849, 190-202.
- Macours N, Vandingenen A, Gielens C, Hens K, Baggerman G, Schoofs L, Huybrechts R (2003). Isolation of angiotensin converting enzyme from testes of *Locusta migratoria* (Orthoptera). *Eur J Entomol* 100, 467-474.
- 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.
- Mangeat P, Roy C, Martin M (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9, 187-192.
- Marlett JA, McBurney MI, Slavin JL (2002). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* 102, 993-1000.
- Marouga R, David S, Hawkins E (2005). The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382, 669-678.
- Mateos R, Goya L, Bravo L (2006). Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J Agric Food Chem* 54, 8724-8732.
- Matos E, Brandani A (2002). Review on meat consumption and cancer in South America. *Mutat Res* 506-507, 243-249.

- Meng JJ, Lowrie DJ, Sun H, Dorsey E, Pelton PD, Bashour AM, Groden J, Ratner N, Ip W (2000). Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J Neurosci Res* 62, 491-502.
- Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA (2003). Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* 3, 1912-1919.
- Mori H, Kawabata K, Matsunaga K, Ushida J, Fujii K, Hara A, Tanaka T, Murai H (2000). Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. *Biofactors* 12, 101-105.
- Mouat MF, Kolli K, Orlando R, Hargrove JL, Grider A (2005). The effects of quercetin on SW480 human colon carcinoma cells: a proteomic study. *Nutr J* 4, 11.
- Nagase H, Nakamura Y (1993). Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 2, 425-434.
- Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K, Thies WG, Herrlich P, Hofmann M, Sleeman JP (2001). Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* 61, 1569-1577.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nguyen HT, Amine AB, Lafitte D, Waheed AA, Nicoletti C, Villard C, Letisse M, Deyris V, Roziere M, Tchiakpe L, Danielle CD, Comeau L, Hiol A (2006). Proteomic characterization of lipid rafts markers from the rat intestinal brush border. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 236-244.
- Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, Gonzalez C, Navarro C, Quiros JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San JM, Hemon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst* 97, 906-916.
- Norat T, Riboli E (2001). Meat consumption and colorectal cancer: a review of epidemiologic evidence. *Nutr Rev* 59, 37-47.
- Nygaard SJ, Haugland HK, Kristoffersen EK, Lund-Johansen M, Laerum OD, Tysnes OB (1998). Expression of annexin II in glioma cell lines and in brain tumor biopsies. *J Neurooncol* 38, 11-18.
- Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, Chen Z, Satoh K, Naftolin F (1999). Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. *Cancer Lett* 147, 31-38.

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Peek RM, Jr. (2004). Prevention of colorectal cancer through the use of COX-2 selective inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 54 Suppl 1, S50-S56.
- Pinto M, Appay MD, Simonassmann P, Chevalier G, Dracopoli N, Fogh J (1982). Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol Cell* 44, 193-196.
- Poquet L, Clifford MN, Williamson G (2007). Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metab Dispos*.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-237.
- Preussmann R (1984). Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften* 71, 25-30.
- Qiu L, Gao HQ, Zhou RH, Liang Y, Zhang XH, Wang XP, You BA, Cheng M (2007). Proteomics Analysis of the Proliferative Effect of Low-Dose Ouabain on Human Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull* 30, 247-253.
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307-316.
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G (1998). Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Z Ernahrungswiss* 37, 190-197.
- Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J Chem Soc Perkin Trans* 1, 3485-3498.
- Raynal P, Pollard HB (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197, 63-93.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 33, 220-235.
- Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med* 30, 1213-1222.
- Rescher U, Gerke V (2004). Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117, 2631-2639.
- Riboli E, Norat T (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 78, 559S-569S.

- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2, 152-159.
- Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, Fromentin G, Durand P, Tome D, Prost M, Berset C (2004). Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. *J Agric Food Chem* 52, 4338-4343.
- Rousset M (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68, 1035-1040.
- Say YH, Hooper NM (2007). Contamination of nuclear fractions with plasma membrane lipid rafts. *Proteomics* 7, 1059-1064.
- Sergediene E, Jonsson K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Rietjens IM, Cenas N (1999). Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett* 462, 392-396.
- Shen L, Issa JP (2002). Epigenetics in colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 18, 68-73.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Silberberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A, Remesy C (2006). The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr* 45, 88-96.
- Sohma H, Ohkawa H, Hashimoto E, Sakai R, Saito T (2002). Ethanol-induced augmentation of annexin IV expression in rat C6 glioma and human A549 adenocarcinoma cells. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 44S-48S.
- Souglakos J (2007). Genetic alterations in sporadic and hereditary colorectal cancer: implementations for screening and follow-up. *Dig Dis* 25, 9-19.
- Sprenger RR, Speijer D, Back JW, De Koster CG, Pannekoek H, Horrevoets AJ (2004). Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 25, 156-172.
- Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D (2005). Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15, 1013-1022.
- Steinmetz KA, Potter JD (1991). Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2, 427-442.
- Stewart BW and Kleihues P (Hrsg.) (2003). World Cancer Report. IRACPress, Lyon.
- Stich HF, Rosin MP (1984). Naturally occurring phenolics as antimutagenic and anticarcinogenic agents. *Adv Exp Med Biol* 177, 1-29.

- Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 41, 185-192.
- Tannu NS, Hemby SE (2006). Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc* 1, 1732-1742.
- Thiel C, Osborn M, Gerke V (1992). The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci* 103 (Pt 3), 733-742.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377-396.
- Towbin H, Ozbey O, Zingel O (2001). An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 22, 1887-1893.
- Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S (1997). ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci* 22, 53-58.
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.
- Vishwanatha JK, Chiang Y, Kumble KD, Hollingsworth MA, Pour PM (1993). Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers. *Carcinogenesis* 14, 2575-2579.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Waisman DM (1995). Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 149-150, 301-322.
- Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 15, 1867-1876.
- Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE, Velasco M, Woods J, Price R, Gray K, Kelloff GJ (2000). Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* 21, 1149-1155.
- Wattenberg LW, Coccia JB, Lam LK (1980). Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. *Cancer Res* 40, 2820-2823.
- Watzl B, Rechkemmer G (2001). Phenolsäuren - Basiswissen aktualisiert. *Ernährungs-Umschau* 48, 413-416.

- WCRF/AICR (World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research) (Hrsg.) (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. AICR, Washington.
- Weber K, Johnsson N, Plessmann U, Van PN, Soling HD, Ampe C, Vandekerckhove J (1987). The amino acid sequence of protein II and its phosphorylation site for protein kinase C; the domain structure Ca²⁺-modulated lipid binding proteins. *EMBO J* 6, 1599-1604.
- 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.
- Westermeier R, Marouga R (2005). Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* 25, 19-32.
- Wice BM, Trugnan G, Pinto M, Rousset M, Chevalier G, Dussaulx E, Lacroix B, Zweibaum A (1985). The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *J Biol Chem* 260, 139-146.
- Wildrick DM, Priebe-Malven M, Boman BM (1992). Expression of the gene coding for the light chain of calpactin I (annexin II) in cell lines DiFi, HT-29, and WI-38. *Anticancer Res* 12, 1721-1724.
- Willett WC (2001). Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 3-8.
- Wolffram S, Weber T, Grenacher B, Scharrer E (1995). A Na⁽⁺⁾-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J Nutr* 125, 1300-1308.
- Wood AW, Huang MT, Chang RL, Newmark HL, Lehr RE, Yagi H, Sayer JM, Jerina DM, Conney AH (1982). Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: exceptional activity of ellagic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5513-5517.
- Wu K, Willett WC, Fuchs CS, Colditz GA, Giovannucci EL (2002). Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J Natl Cancer Inst* 94, 437-446.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21, 381-406.
- Zhao Z, Egashira Y, Sanada H (2004). Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *J Nutr* 134, 3083-3088.
- Zhao Z, Egashira Y, Sanada H (2005). Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. *J Agric Food Chem* 53, 5030-5035.
- Zimmermann U, Balabanov S, Giebel J, Teller S, Junker H, Schmoll D, Protzel C, Scharf C, Kleist B, Walther R (2004). Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination. *Cancer Lett* 209, 111-118.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. G. Rechkemmer für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Schwab für die Übernahme des Koreferats, die wertvollen Diskussionen und sein stetes Engagement.

Frau Dr. I. Schmöller für die stets kompetente und umfassende Betreuung. Durch ihr unermüdliches Engagement, ihre wertvollen Anregungen und durch ihre eingehende Korrektur hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn I. Krause für die freundliche Unterstützung bei der massenspektrometrischen Proteinidentifizierung, seine jederzeit gewährte Hilfe und für die wertvollen fachlichen Gespräche.

Herrn B. Tiemann für seine kompetente Mitarbeit bei der Durchführung der Stabilitätsversuche.

Herrn N. Gebhardt für seine große Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Allen Kollegen des Lehrstuhls für Biofunktionalität der Lebensmittel der Technischen Universität München für ihre Hilfsbereitschaft, das hervorragende Arbeitsklima und für die angenehme Atmosphäre.

Meiner Familie für ihre unentwegte Unterstützung und ihren Glauben an mich.

All meinen Freunden, die immer für mich da waren, für ihre Motivation sowie das Korrekturlesen.

Von Herzen danke ich ganz besonders meinem Freund Christian für seine unermüdliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht, für seine Zuversicht und seine Liebe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anja Osterhues
Geburtsdatum, -ort 13. Januar 1978, Speyer
Familienstand ledig

Schulbildung

8/1984 – 7/1988 Grundschule Römerberg-Berghausen
8/1988 – 6/1997 Edith-Stein-Gymnasium Speyer
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studienvorbereitende Praktika

7/1997 – 9/1998 Praktikum im Bereich Analytik bei der Landwirtschaftlichen
Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ), Speyer
Praktikum im Bereich Ernährungsberatung bei der AOK
Regionaldirektion Vorderpfalz, Ludwigshafen

Studium

10/1998 – 8/2004 Studium der Ernährungswissenschaft an der Universität
Hohenheim; Vertiefungsfach: Spezielle Biochemie
Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
9/2002 – 2/2003 Auslandssemester an der Universidad Politécnicä de
Valencia, Spanien
9/2003 – 8/2004 Diplomarbeit in Kooperation mit der Ludwig-Maximilians-
Universität München am Pathologischen Institut, München
Thema: Vergleichende Proteomanalyse der *lipid raft*-
assoziierten Proteine der Stammzelllinie DO64 und zweier
abgeleiteter Tumorzelllinien

Dissertation

9/2004 – 9/2007 Experimenteller Teil der Dissertation an der Technischen
Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan,
Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, Freising
Thema: Untersuchungen zum Einfluss von Ferulasäure auf
zelluläre Mechanismen der Kolonkarzinogenese und Tumor-
progression mit einem Zellkulturmodell (HT29 Klon 19A)

Berufstätigkeit

9/2004 – 4/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Technischen Universi-
tät München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Lehr-
stuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, Freising