

**Wirkung zweier Flavonoide  
Flavon und Quercetin – auf das Proteom humaner transformierter  
und nicht transformierter Kolonozyten**

Angelika Herzog

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
Für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Freising

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

**Wirkung zweier Flavonoide  
–Flavon und Quercetin- auf das Proteom humaner transformierter  
und nicht transformierter Kolonozyten**

**Angelika Herzog**

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. G. Forkmann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
2. Univ.-Prof. Dr. G. Rechkemmer
3. apl.-Prof. Dr. A. Görg

Die Dissertation wurde am 22.10.03 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.02.04 angenommen.

In den letzten 4 Jahren haben viele Personen meine Doktorarbeit beeinflusst und jeder hat auf seine Art zum Gelingen beigetragen. Allen –auch den namentlich nicht erwähnten- danke ich ganz herzlich. Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. H. Daniel für die Überlassung des interessanten Themas und Ihre Unterstützung und Anregungen während meiner Promotionszeit.

Herrn Dr. Uwe Wenzel für seine Betreuung, die vielseitigen Hilfestellungen und besonders für die kritische und schnelle Durchsicht meines Manuskripts sowie der Publikationen.

Frau Prof. Dr. A. Görg und Herrn Prof. Dr. G. Rechkemmer für die Übernahme der Koreferate und Herrn Prof. Dr. G. Forkmann als Prüfungsvorsitzenden für die Organisation des Prüfungsverfahrens.

Herrn Günther Boguth und Herrn Christian Obermaier aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. A. Görg für Ihre Unterstützung bei meinen ersten Schritten mit der 2-DE.

Birgit Kindermann für die Durchführung und Einweisung in die DNA-Array-Technik.

Herrn Dr. Michael Kersten für die Einblicke in die ProteomWeaver Auswertung.

Heike tom Dieck, Gerlinde Kettenring, Helene Prunkl, Beate Rauscher, Rainer Reichlmair, Margot Siebler und Diana Wittstock-Stengl für die seelische, organisatorische und nahrhafte Unterstützung und ihre Freundschaft.

Frau Dr. E. Luttermann, ohne ihre Telefonaktion hätte die Aussprache nicht zu dem vorgesehenen Termin stattfinden können.

Der gesamten Hochfeldwegtruppe für die sportlichen, kulturellen, musikalischen und kulinarischen „Events“, die wir im Laufe der 4 Jahre gemeinsam unternommen haben und die wir hoffentlich auch in Zukunft noch pflegen werden.

Meiner Familie und Daniel danke ich für Alles.

<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Vorwort</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Kolonkarzinom</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Entstehung des kolorektalen Karzinoms (CRC).....	5
1.2.2 Entwicklung des CRC.....	5
1.2.3 Sporadisches CRC.....	6
1.2.4 Hereditäre CRC-Formen.....	7
1.2.5 Bedeutung von Ernährungsfaktoren in der Genese des kolorektalen Karzinoms.....	9
1.2.6 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	11
<b>1.3 Flavonoide</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Einteilung der Flavonoide.....	12
1.3.2 Vorkommen der Flavonoide.....	13
1.3.3 Pharmakologie der Flavonoide.....	14
1.3.3.1 Pharmakodynamik.....	14
1.3.3.2 Wirkungen der Flavonoide in der Karzinogenese.....	15
<b>1.4 Proteomics zur Untersuchung der Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen</b> .....	<b>20</b>
<b>2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Zellkultur</b> .....	<b>24</b>
3.1.1 Kultivierung der transformierten Zelllinie HT-29.....	24
3.1.2 Kultivierung der nicht-transformierten humanen Kolonozyten Zelllinie NCOL-1.....	25
<b>3.2 Bestimmung der antioxidativen Wirkung der Flavonoide</b> .....	<b>25</b>
3.2.1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	25
3.2.2 Superoxidradikalanionen.....	26
<b>3.3 Apoptosemessungen</b> .....	<b>26</b>
3.3.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität als frühes Ereignis der Apoptose.....	26
3.3.2 Membrandesintegration als früher Apoptosemarker.....	27
3.3.3 DNA-Fragmentierung als später Apoptosemarker.....	27
<b>3.4 2 dimensionale Gelelektrophorese</b> .....	<b>28</b>
3.4.1 Herstellung des Gradientengels.....	28
3.4.2 Herstellung der SDS-Gele.....	28
3.4.3 Probenaufarbeitung.....	29
3.4.3.1 Gesamtproteinlysat.....	30
3.4.3.2 Protein-Fraktionierung nach Ramsby <i>et al</i> .....	30
3.4.3.3 Protein-Fraktionierung mittels ProteoPrep™ Universal Extraction Kit.....	31
3.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford.....	31
3.4.5 Erste Dimension.....	31
3.4.5.1 Rehydratisierung der IPG-Streifen.....	31
3.4.5.2 Laufbedingungen der IEF.....	32
3.4.6 Zweite Dimension.....	32
3.4.7 Färbungen.....	33
3.4.7.1 Coomassie-Färbung (kolloidal).....	33
3.4.7.2 Silber-Färbung.....	33
3.4.7.2.1 Silberfärbung in Anlehnung an Blum.....	33
3.4.7.2.2 Silberfärbung für die Massenspektrometrie: (Amersham Biosciences).....	34
<b>3.5 Software gestützte Auswertung der 2-DE-Gele</b> .....	<b>34</b>
3.5.1 ImageMaster (Amersham Biosciences, Freiburg).....	34
3.5.2 ProteomeWeaver (Definiens, München).....	35
<b>3.6 Massenspektrometrie</b> .....	<b>35</b>
3.6.1 Funktionsprinzip.....	35
3.6.2 Probenaufarbeitung zur massenspektrometrischen Analyse.....	37
3.6.2.1 Trypsinverdau im Gel.....	37
3.6.2.2 Probenauftrag zur MALDI-TOF-MS Analyse.....	37

<b>3.7</b>	<b>RNA-Isolierung</b> .....	<b>38</b>
3.7.1	Überprüfung der Qualität der Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese.....	38
3.7.2	DNA-Array.....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleichende Analyse der antioxidativen Wirkung von Flavonoiden</b> .....	<b>40</b>
4.1.1	Antioxidative Wirkung der Flavonoide in HT-29 Zellen .....	40
4.1.2	Antioxidative Wirkung der Flavonoide in NCOL-1 Zellen .....	42
<b>4.2</b>	<b>Wirkung von Flavon und Quercetin auf die Apoptose in HT-29-und NCOL-1 Zellen</b> .....	<b>46</b>
4.2.1	Bestimmung der Caspase-3-aktivität als Indikator der Apoptoseinduktion .....	46
4.2.2	Membrandesintegration als früher Indikator der Apoptose in HT-29 und NCOL-1 Zellen .....	46
4.2.3	DNA-Fragmentierung als später Indikator der Apoptose in HT-29 und NCOL-1 Zellen .....	49
<b>4.3</b>	<b>Etablierung der Methode der 2-DE</b> .....	<b>51</b>
4.3.1	Färbetechnik .....	51
4.3.2	Fraktionierung des Gesamtproteins.....	53
<b>4.4</b>	<b>2-DE zur Untersuchung der Wirkung von Flavon auf das Proteom von HT-29 Zellen</b> ....	<b>55</b>
4.4.1	Wirkung von Flavon nach 24 h Inkubation auf das Proteom von HT-29 Zellen .....	55
4.4.2	Identifizierung Flavon-regulierter Proteine nach Fraktionierung der HT-29 Zellen.....	59
4.4.3	Wirkung einer 48 h Flavon-Exposition auf das Proteom von HT-29 Zellen.....	63
4.4.4	DNA-Array zur Untersuchung der Wirkung von Flavon auf das Transkriptom von HT-29 Zellen ....	65
<b>4.5</b>	<b>2-DE zur Untersuchung der Wirkung von Quercetin auf das Proteom von HT-29 Zellen</b> ..	<b>68</b>
4.5.1	Wirkung von Quercetin nach 24 h Inkubation auf das Proteom von HT-29 Zellen.....	68
4.5.2	Identifizierung von durch Quercetin beeinflusste Proteine nach Fraktionierung der Proteine aus HT-29 Zellen .....	71
4.5.3	Wirkung einer 48 h Inkubation mit Quercetin auf das Proteom von HT-29 Zellen.....	75
<b>4.6</b>	<b>Wirkung von Flavon nach 24 h Inkubation auf das Proteom der NCOL-1 Zellen</b> .....	<b>78</b>
<b>4.7</b>	<b>Wirkung von Quercetin auf das Proteom von NCOL-1 Zellen</b> .....	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>Proteomanalyse zur Identifizierung der Zielproteine von Flavon und Quercetin</b> .....	<b>89</b>
<b>5.2</b>	<b>DNA-Array zur Analyse der Wirkung von Flavon auf das Transkriptom von HT-29 Zellen</b> .....	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>110</b>
<b>8.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>110</b>
8.1.1	Chemikalien.....	110
8.1.2	Flavonoide .....	111
8.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe.....	111
8.1.4	Zellkultur-Supplemente .....	111
8.1.5	Molekularbiologische Reagenzien.....	112
8.1.6	Puffer und Lösungen .....	112
<b>8.2</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>114</b>
<b>8.3</b>	<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>115</b>
8.3.1	Abkürzungsverzeichnis .....	115
8.3.2	Liste identifizierter Peptidfragmente .....	116
8.3.3	Literaturverzeichnis.....	127

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Entwicklungsstadien bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms aus normalem Epithelgewebe.....	5
Abbildung 2: Molekulare Mechanismen der Entstehung und Progression des CRC in Anlehnung an das Vogelstein Modell.....	9
Abbildung 3: Flavonoide und ihre Biogenese.....	12
Abbildung 4: Regulation der Apoptose durch pro- und anti-apoptotische Faktoren.....	19
Abbildung 5: Das Proteom als dynamisches Gebilde unter dem Einfluss zahlreicher Parameter.....	20
Abbildung 6: Funktionsweise des MALDI-TOF-Massenspektrometers.....	36
Abbildung 7: Antioxidative Wirkung der Flavonoide Baicalein, Quercetin und Morin in HT-29 Zellen bei einer Konzentration von 150 $\mu$ M.....	41
Abbildung 8: Flavonoide, die bei einer Konzentration von 150 $\mu$ M in HT-29 Zellen die Wasserstoffperoxid-Konzentration vermindern.....	42
Abbildung 9: Antioxidative Wirkung der Flavonoide Quercetin, Fisetin und Morin in NCOL-1 Zellen bei einer Konzentration von 150 $\mu$ M.....	43
Abbildung 10: Flavonoide, die bei einer Konzentration von 150 $\mu$ M in NCOL-1 Zellen die Wasserstoffperoxid-Konzentration vermindern.....	44
Abbildung 11: Wirkung von Flavon und Quercetin auf das früh apoptotische Stadium der HT-29 Zellen.....	47
Abbildung 12: Wirkung von Flavon und Quercetin auf das früh apoptotische Stadium der NCOL-1 Zellen.....	48
Abbildung 13: Wirkung von Flavon und Quercetin auf die DNA-Fragmentierung in HT-29 und NCOL-1 Zellen.....	49
Abbildung 14: Vergleich von 3 Silberfärbungen, im pH 4-9 Gradientengel (selbstgegossen) mit 100 $\mu$ g Proteinauftrag aus unbehandelten HT-29 Zellen.....	52
Abbildung 15: Vergleich zweier Silber gefärbter Gele, im pH 4-9 Gradientengel (selbstgegossen) mit 100 $\mu$ g Proteinauftrag.....	52
Abbildung 16: Vergleich eines Silber-gefärbten Gels, pH 4-9 Gradientengel mit 100 $\mu$ g Proteinauftrag, mit einem Coomassie-gefärbten Gel, pH 4-9 Gradientengel mit 500 $\mu$ g Proteinauftrag.....	53
Abbildung 17: Vergleich eines HT-29 Kontrollgels (Gesamtproteinlysate) mit den Proteinfractionen.....	54
Abbildung 18: Coomassie gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus HT-29 Zellen.....	56
Abbildung 19: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus HT-29 Zellen.....	59
Abbildung 20: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus HT-29 Zellen.....	60
Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus HT-29 Zellen.....	63
Abbildung 22: Zahl Transkripte mit reduziertem ( ) bzw. erhöhtem ( ) Spiegel geordnet nach funktionellen Genklassen.....	67
Abbildung 23: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen HT-29 Zellen.....	68
Abbildung 24: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus HT-29 Zellen.....	71
Abbildung 25: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus HT-29.....	72
Abbildung 26: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus HT-29 Zellen.....	76
Abbildung 27: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus NCOL-1 Zellen.....	79
Abbildung 28: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus NCOL-1 Zellen.....	80
Abbildung 29: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus NCOL-1 Zellen.....	81
Abbildung 30: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus NCOL-1 Zellen.....	85
Abbildung 31: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus NCOL-1 Zellen.....	86
Abbildung 32: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus NCOL-1 Zellen.....	87
Abbildung 33: Spaltung der Proteine des Cytoskeletts durch aktivierte Caspasen im Verlauf der Apoptose.....	93
Abbildung 34: Interaktion der Chaperone mit Reaktionsketten der Apoptose.....	98

## Einleitung

### 1.1 Vorwort

Flavonoide gehören zur Klasse der Polyphenole und sind als sekundäre Pflanzenstoffe im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie kommen bevorzugt in glykosidierter Form in oberirdischen Pflanzenteilen vor. In Abhängigkeit ihres Oxidationsgrades der C-Atome 2,3 und 4 des Chromanrings erfolgt ihre Einteilung in Flavone, Flavanole, Flavanone, Flavonole, Flavandiole und Flavylumsalze. Mittlerweile sind mehr als 6.000 Flavonoide identifiziert worden. Die einzelnen Vertreter der Stoffgruppen unterscheiden sich wiederum durch Hydroxylierungen bzw. Methylierungen einzelner Hydroxylgruppen. Ihre unterschiedlichen biologischen Effekte wurden in Studien mit verschiedenen Säugerzellen und auch *in vivo* untersucht. Besondere Aufmerksamkeit gilt zum einen der antioxidativen Wirkung vieler Flavonoide und zum anderen ihren inhibitorischen Effekten in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung, die in Tierstudien gezeigt wurden. Die Fähigkeit einiger Flavonoide, in die Karzinogenese einzugreifen besteht unter anderem darin, aktivierte Mutagene und Kanzerogene abzufangen oder auch mit Kontrollproteinen des Zellzyklus zu interagieren.

Quercetin, ein Hauptvertreter der Flavonolgruppe, ist ein starkes Antioxidans. Durch die Verhinderung der Oxidation von LDL (Low density lipoproteins) wird ihm daher bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques ein protektiver Effekt zugeschrieben. Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass eine hohe alimentäre Zufuhr von Flavonolen negativ mit dem Auftreten koronarer Herzerkrankungen korreliert. Zudem ist Quercetin in der Lage, den programmierten Zelltod in humanen Kolonepithelzellen auszulösen.

Flavon, ein Vertreter der Gruppe der Flavone zeigt keine antioxidativen Effekte, jedoch ist es in der Lage, sehr potent und spezifisch die Apoptose in transformierten humanen Kolonepithelzellen zu stimulieren.

Da die zellulären und molekularen Wirkmechanismen der beiden Flavonoide nicht hinreichend bekannt sind, scheint es notwendig, mit neuen methodischen Ansätzen ihre biologische Aktivität zu charakterisieren.

## 1.2 Kolonkarzinom

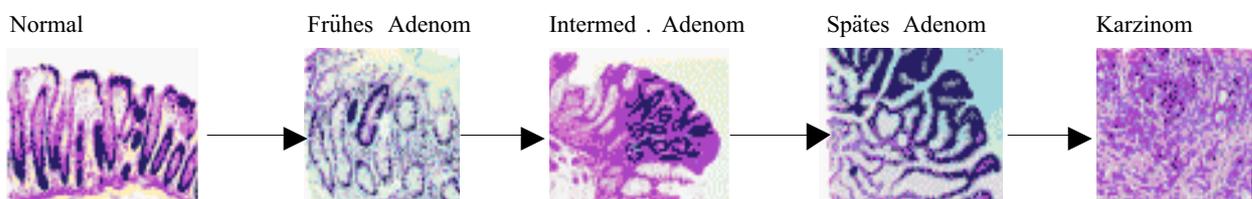
### 1.2.1 Entstehung des kolorektalen Karzinoms (CRC)

Das kolorektale Karzinom ist nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung mit Todesfolge in den westlichen Industrieländern<sup>1</sup>. Das relative Risiko, an CRC zu erkranken, ist bei genetischer Prädisposition erhöht, wobei der Anteil der erblich bedingten Darmkrebsfälle jedoch nur bei 10 % liegt. Patienten mit chronischen Darmerkrankungen, wie z.B. *Colitis Ulcerosa*\* und *Morbus Crohn* tragen ebenfalls ein erhöhtes Risiko der Tumorbildung im Darm<sup>2</sup>. Das sporadische CRC, in dessen Genese exogene Faktoren wie z.B. Umweltbelastung, falsche Ernährung (fettreich, wenig Ballaststoffe und Gemüse) oder Zigarettenrauch fördernd wirken, betrifft 90 % der Fälle<sup>3,4</sup>.

### 1.2.2 Entwicklung des CRC

Die erste histologische Manifestation in der Entwicklung des CRC ist die Ausbildung von einzelnen dysplastischen Krypten (Adenomen) aus normalen Epithelzellen. Adenome werden aufgrund ihrer histologischen Struktur in tubulär, tubovillös und villös unterteilt. Im Laufe ihres Entwicklungsstadiums verändern sie sich nicht nur in ihrer Größe, sondern gehen von der tubulären Architektur in die villöse über. Villöse Adenome haben das höchste maligne Potential, d.h. 5 % der adenomatösen Polypen entwickeln sich im Laufe von 5-10 Jahren zu malignen Tumoren<sup>4</sup>.

Die Prävalenz von Adenomen in der Bevölkerung ist weitaus höher, als die Anzahl der CRC Erkrankungen, was belegt, dass nicht alle Adenome im Laufe der Zeit zu Tumoren werden<sup>5</sup>.



**Abbildung 1: Verschiedene Entwicklungsstadien bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms aus normalem Epithelgewebe.**

\* Im fortlaufenden Text werden Begriffe, die nicht aus dem Deutschen stammen kursiv markiert.

### 1.2.3 Sporadisches CRC

*Mutationen des APC-Gens.* Die häufigsten und als erstes identifizierten Mutationen in Adenomen treten im APC (*Adenopolyposis coli*) Tumorsuppressor-Gen auf<sup>6</sup>. Es ist auf dem Chromosom 5q21 lokalisiert und ist in 60-80 % der sporadischen CRC mutiert<sup>7-10</sup>. Das nicht mutierte APC-Gen kodiert für ein cytoplasmatisches multifunktionelles 312 kDa Protein, das unter anderem an zelluläre Transkriptionsfaktoren und an  $\beta$ -Catenin bindet<sup>11</sup>. Als Bindungspartner dient das APC-Produkt der Spaltung und der Aktivitätskontrolle des  $\beta$ -Catenins<sup>12-14</sup>. Das mutierte und gespaltene APC Produkt ist nicht mehr fähig, an  $\beta$ -Catenin zu binden und somit seine Aktivität zu regulieren. Ein Effekt der dadurch verstärkten  $\beta$ -Catenin Aktivität ist die vermehrte Bildung des Tcf-4 Transkriptionsfaktors<sup>15</sup>, dessen Zielgen das Onkogen *c-myc* ist, das in kolorektalen Tumoren vermehrt exprimiert wird<sup>16</sup>. Aufgrund seiner vielseitigen Effekte, wie z.B. der Aktivierung des Zellzyklus wird *c-myc* als Schlüsselement für die Balance zwischen zellulärer Proliferation und Apoptose betrachtet. Seine fehlerhafte Expression kann dieses empfindliche Gleichgewicht stören<sup>17</sup>.

*Mutationen im k-ras Gen.* Bei 50 % der sporadischen kolorektalen Tumore wurden Mutationen im *k-ras* Onkogen identifiziert. Das *k-ras* Genprodukt p21 ist ein Molekül der Signaltransduktion, das im Komplex mit GTP aktiviert ist und durch Hydrolyse von GTP inaktiviert wird. Liegt eine Mutation im *k-ras* Produkt vor, so verringert sich seine Sensitivität gegenüber der Hydrolyse, was zu einer verlängerten Aktivität führt<sup>18</sup>. Hyperaktiviertes *k-ras* induziert zum einen die Zellproliferation und inhibiert gleichzeitig die durch Cytochrom-C hervorgerufene Apoptose, indem die Pro-Caspase 9 durch *k-ras* phosphoryliert wird und somit das Apoptosom nicht gebildet werden kann<sup>19</sup>. Ein Zusammenwirken von *k-ras* mit  $\beta$ -Catenin führt außerdem zur verstärkten Expression des Cyclin D<sub>1</sub> durch die Aktivierung unterschiedlicher cis- und trans-Elemente des Cyclin D<sub>1</sub> Promotors<sup>20</sup>.

*Fehlregulierung des TGF $\beta$ -Signalweges.* TGF $\beta$ -Signale führen normalerweise zu einer Inhibierung des Zellzyklus und zu zellulärer Differenzierung. Defekte in diesem Signalweg, spielen somit eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Das Tumorsuppressorgen SMAD-4 ist eine Komponente des TGF $\beta$ -Signalweges und zeigt bei 6-30 % der CRC Fälle eine Mutation<sup>21,22</sup>. SMAD-2, ebenfalls ein Tumorsuppressorgen und Element des TGF $\beta$ -Signalweges, kann durch *k-ras* aktiviert werden und scheint im Falle des CRC zu fehlen<sup>23,24</sup>.

*Zusammenspiel von c-myc, TGF $\beta$  und k-ras.* Der Zellzyklus wird u.a. über die Aktivität des Cyclin E-cdk2-Komplexes reguliert. Durch die *c-myc* vermittelte Abspaltung des cdk-Inhibitors p27<sup>kip1</sup> wird Cyclin E-cdk2 aktiviert. Diese Aktivierung kann durch TGF $\beta$  verhindert werden. Kommt es nun gleichzeitig zu einer Überexpression des *c-myc* und durch die SMAD-4 Mutation zu einem verstärkten Abbau von TGF $\beta$ , wirken beide Fehlregulationen synergistisch auf den Zellzyklus ein. In diesen Prozeß kann auch das *ras-Oncogen* eingreifen, da es durch Aktivierung des MAP-Kinase Wegs die p27<sup>kip1</sup> Degradierung beschleunigen kann<sup>25</sup>. In aggressiven CRC konnte dementsprechend ein verstärkter Abbau von p27<sup>kip1</sup> beobachtet werden<sup>26</sup>.

*Mutationen in p53.* Die physiologische Rolle des Tumorsuppressorgens p53 als „Wächter des Genoms“ wurde von Lane bereits ausführlich beschrieben<sup>27</sup>. Als Transkriptionsfaktor stellt p53 einen wichtigen Regulator des Zellzyklusgeschehens dar<sup>28,29</sup>. p53 liegt normalerweise inaktiv vor und wird erst infolge von DNA-Schäden exprimiert und aktiviert. Dadurch kommt es zum Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>/S-Phase damit entsprechende Reparaturmechanismen die Schäden eliminieren können. Der Zellzyklus wird fortgesetzt, wenn die Schäden behoben wurden, anderenfalls kann p53 die Apoptose der Zelle einleiten. In 50 % der humanen Tumoren liegt eine Mutation in p53 Gen vor, sodass die Zellen mit geschädigter DNA nicht eliminiert werden, sondern ungehindert proliferieren können.

#### 1.2.4 Hereditäre CRC-Formen

Die Beobachtung, dass das sporadische CRC vermehrt im Alter auftritt unterstützt die Annahme, dass in einer Zelle gleichzeitig die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen stattfinden muss, damit es zu einer malignen Transformation kommt. Von Geburt an bestehende Keimbahnabnormalitäten bedingen, dass wenige neue Mutationen nötig sind, um eine Transformation auszulösen. Das Risiko, schon in jungen Jahren an CRC zu erkranken, ist für Mitglieder einer Familie, in der prädisponierende Mutationen in der Keimbahn vorkommen, größer, als für die restliche Bevölkerung<sup>4</sup>.

Die Mutationen werden in erblich bedingten Fällen bereits als Defekte in der Keimbahn weitergegeben. Die zwei häufigsten Erscheinungsbilder der vererbaren CRC sind zum einen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und zum anderen die häufiger beobachtete hereditäre CRC-Form, das nicht-polypöse kolorektale

Karzinom (HNPCC). In beiden erblichen Formen des CRC (FAP, HNPCC) verläuft die Entwicklung, wie bei der sporadischen Form, vom Adenom zum Karzinom<sup>4</sup>.

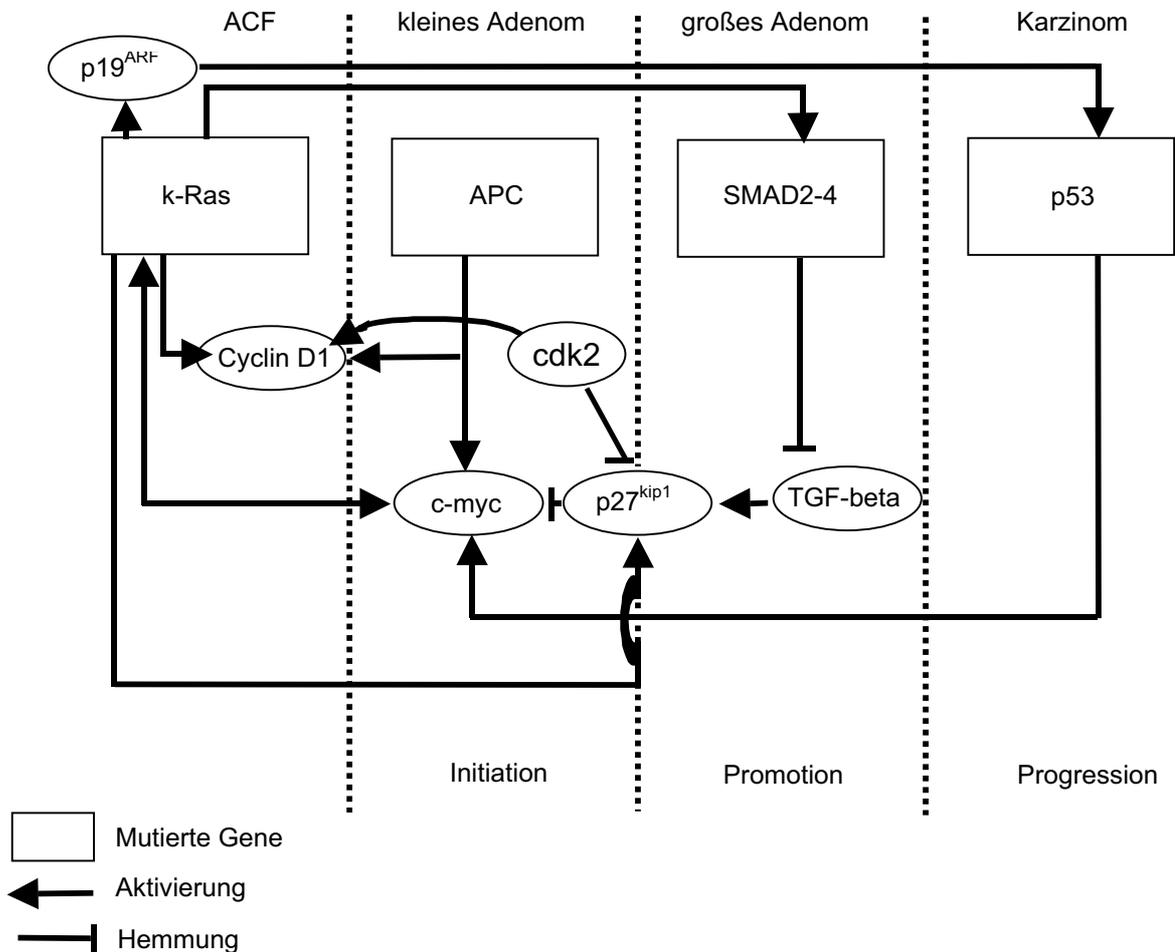
#### FAP

Die familiäre adenomatöse Polyposis macht nur etwa 1 % der vererbten CRC aus und wird durch eine Keimbahnmutation im APC Gen auf dem Chromosome 5q hervorgerufen<sup>30,31</sup>. Die Vererbung erfolgt autosomal dominant und ihre klinische Diagnose ist durch die Identifizierung von mindestens 100 kolorektalen Polypen in frühen Lebensstadien definiert. Die adenomatösen Polypen entsprechen histologisch denen, die auch bei der sporadischen CRC auftreten. Ein einzelner Polyp birgt ein geringes Risiko der malignen Transformation, mit der Anzahl der Polypen steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit der CRC-Entstehung. Ab einem Alter von ca. 40 Jahren besteht bei FAP-Patienten ohne Eingriff ein nahezu 100 %iges Risiko für die Entwicklung eines malignen Tumors<sup>32,33,34</sup>.

#### HNPCC

Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), auch Lynchsyndrom I genannt, wird autosomal dominant vererbt. HNPCC wird durch Keimbahn-Mutationen in DNA *Mismatch-Reparatur* Genen ausgelöst. Bis heute sind in 4 verschiedenen Genen Mutationen identifiziert worden, die zur HNPCC führen (hMSH2, hMLH1, hPMS2 und hMSH6)<sup>35-39</sup>. Diese Gene kodieren für Enzyme, die die Korrektur von falschen Basenkombinationen in der DNA kontrollieren und sind somit bedeutsam für die korrekte DNA-Synthese während der Replikation<sup>40</sup>. Insgesamt 6% aller CRC Fälle werden als HNPCC diagnostiziert. Mitglieder einer Familie, in der HNPCC aufgetreten ist, haben nicht nur ein erhöhtes Risiko an Darmkrebs zu erkranken, sondern durch die Einschränkung des *Mismatch-Reparatursystems* erhöht sich auch das Risiko zur synchronen und metasynchronen Entwicklung von Tumoren in Magen, Gebärmutter, Eierstöcken, der Haut oder des Leber- und Gallentraktes<sup>41,42</sup>. Das Risiko der zusätzlichen Tumorbildung wird deutlich im Falle des Gebärmutterhalskrebses, der bei 50-80 % der HNPCC-Patientinnen diagnostiziert wird<sup>4</sup>. Die Überlebensrate der HNPCC Patienten ist nach einer Studie von Myrhoj *et al.*<sup>43</sup> jedoch besser, als die bei Patienten mit sporadischem CRC, da die Neigung der Tumoren zur Metastasierung bei HNPCC geringer ist. Auch eine unterschiedliche immunologische Antwort auf den Tumor könnte Ursache dafür sein. Ausschlaggebend für die Entwicklung bzw. Progression jeder CRC-Art ist die

Expression von Interleukin-2 (IL-2), IL-4 und des Tumor-Nekrose-Faktors TNF- $\alpha$ . Barth *et al.* fanden in einer Studie heraus, dass sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-4 in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) des Kolonkarzinoms exprimiert werden<sup>44</sup>. Ropponen *et al.* bestätigten, dass der Nachweis von TIL in allen Arten des CRC von hohem prognostischen Wert für die Überlebensrate eines Patienten ist<sup>45</sup>.



**Abbildung 2: Molekulare Mechanismen der Entstehung und Progression des CRC in Anlehnung an das Vogelstein Modell.**

Die Entwicklung des CRC ist eine Mehrstufen-Karzinogenese, die mit einer einzelnen Mutation beginnt und im Laufe der Zeit durch Akkumulation weiterer Mutationen das Gewebe in ein Karzinom überführt. Die Mutationen betreffen hauptsächlich Proto-Onkogene, wie z.B. k-Ras und Tumorsuppressorgene, wie z.B. APC, SMAD2-4 und p53. Die mutierten Gene sind als Kästen dargestellt, Pfeile bedeuten die Aktivierung, T-Linien die Hemmung von Substraten.

### 1.2.5 Bedeutung von Ernährungsfaktoren in der Genese des kolorektalen Karzinoms

Kolorektale Tumore sind weltweit die viert-häufigste Krebserkrankung bei Männern und Frauen, wobei im Jahr 2000 ca. 943 000 Neuerkrankungen und 510 000 Todesfälle registriert wurden<sup>46</sup>. Neben einer genetischen Prädisposition stellen

Umweltbedingungen, Bewegungsmangel und insbesondere Nahrungskomponenten die primären Risikofaktoren des CRC dar.

Es gilt als gesichert, dass zum einen ein hoher Verzehr an Gemüse protektiv wirkt und zum anderen ein übermäßiger Verzehr von „rotem“ Fleisch das CRC-Risiko erhöht. Seit Mitte der 90er Jahre wird die europäische Studie zu Ernährung und Krebs<sup>47,47</sup> durchgeführt, an der in 10 Ländern der Europäischen Gemeinschaft insgesamt 500.000 Probanden teilnehmen. Der Zusammenhang zwischen einem hohen Konsum an rotem Fleisch (Rind, Schaf, Schwein) und einer erhöhten CRC-Inzidenz wird auch in dieser Studie bestätigt. Zwei Gründe zur Erklärung dieser Beobachtung werden diskutiert. Die Zubereitungsart des roten Fleisches wird u.a. als die Ursache der Risikoerhöhung betrachtet, da durch starkes Erhitzen karzinogen wirkende heterozyklische aromatische Amine bzw. speziell durch Grillen des Fleisches polyzyklische Kohlenwasserstoffe entstehen können<sup>48</sup>. Die verstärkte endogene Bildung von karzinogenen N-Nitrosoverbindungen durch den Verzehr von rotem Fleisch könnte ebenfalls im Zusammenhang mit dem erhöhten Risiko der Bildung kolorektaler Tumoren stehen. Die 10-fach höhere Konzentration an Häm in rotem Fleisch gegenüber weißem Fleisch wurde in einer Studie von Cross *et al.* eindeutig mit der vermehrten Bildung dieser Karzinogene in Zusammenhang gebracht<sup>49</sup>.

Der Zusammenhang zwischen Gemüsekonsum und kolorektalen Tumoren wurde in mehreren epidemiologischen Studien untersucht. Der *World Cancer Research Fund* (WCRF) und das *American Institute of Cancer Research* (AICR) sehen in ihrem Bericht von 1997 die Befundlage als hinreichend gesichert, um einem hohen Gemüsekonsum einen protektiven Effekt zuschreiben zu können<sup>50</sup>. Die positive Wirkung einer hohen Verzehrsmenge von Obst konnte bisher jedoch nicht gesichert werden. Die Problematik der Reproduzierbarkeit wird durch eine von Michels *et al.* veröffentlichte Studie deutlich, die auch den protektiven Effekt von Gemüse in 2 Studien mit über 130.000 Probanden nicht bestätigen konnten<sup>51</sup>.

Die Kombination aus hohem Fleischverzehr und geringem Konsum an Obst und Gemüse bedingt nach Tomatis *et al.* ca. 30-40 % der kolorektalen Tumoren<sup>52</sup>.

Auch Ballaststoffe werden im Zusammenhang einer protektiven Wirkung pflanzlicher Kost als relevant diskutiert. Während europäische Studien hierzu protektive Effekte zeigten, führte eine amerikanische Studie zu keinem signifikanten Befund<sup>53,50</sup>. Die postulierte protektive Wirkung von Ballaststoffen ließ sich jedoch in den Studien nicht

eindeutig den unverdaulichen Faserstoffen zuordnen, da sie nicht von denen anderer biologisch aktiver Nahrungsmittelinhaltsstoffe, wie z.B. Vitamine, Mineralien, Spurenelemente, getrennt werden können.

Die in Obst und Gemüse vorkommenden antioxidativ wirksamen Substanzen, wie z.B. Carotinoide oder Vitamin E und C, werden als kausale Faktoren in Zusammenhang mit einer Verminderung der Kolonkarzinomrate diskutiert<sup>54</sup>. Die bis heute vorliegenden Studien über den Einfluss von Carotinoiden auf die Entstehung von kolorektalen Tumoren sind jedoch nicht ausreichend, um einen eindeutigen Effekt zu belegen<sup>55</sup>. Auch die Befunde zur Vitamin E Supplementierung sind nicht ausreichend, um den postulierten protektiven Effekt zu substantiieren<sup>56</sup>.

In der Studie von McCullough *et al.* wurde der Einfluss von Calcium, Vitamin D und Milchprodukten auf die Bildung von kolorektalen Tumoren untersucht. Während eine hohe Calcium Zufuhr geringfügig das Risiko von CRC verminderte, zeigte eine hohe Vitamin D Zufuhr nur bei Männern eine signifikante Reduktion der CRC-Rate. Für Milchprodukte konnte keine Wirkung nachgewiesen werden<sup>57</sup>.

Auch wenn die Wirkung einer Obst und Gemüse reichen Kost im Zusammenhang mit der Entstehung von CRC bisher nicht auf einzelne Inhaltsstoffe zurückgeführt werden kann, wird diesen beiden Lebensmittelgruppen ein protektiver Effekt zugeschrieben und von allen Fachgesellschaften einschließlic WCRF und AICR uneingeschränkt empfohlen.

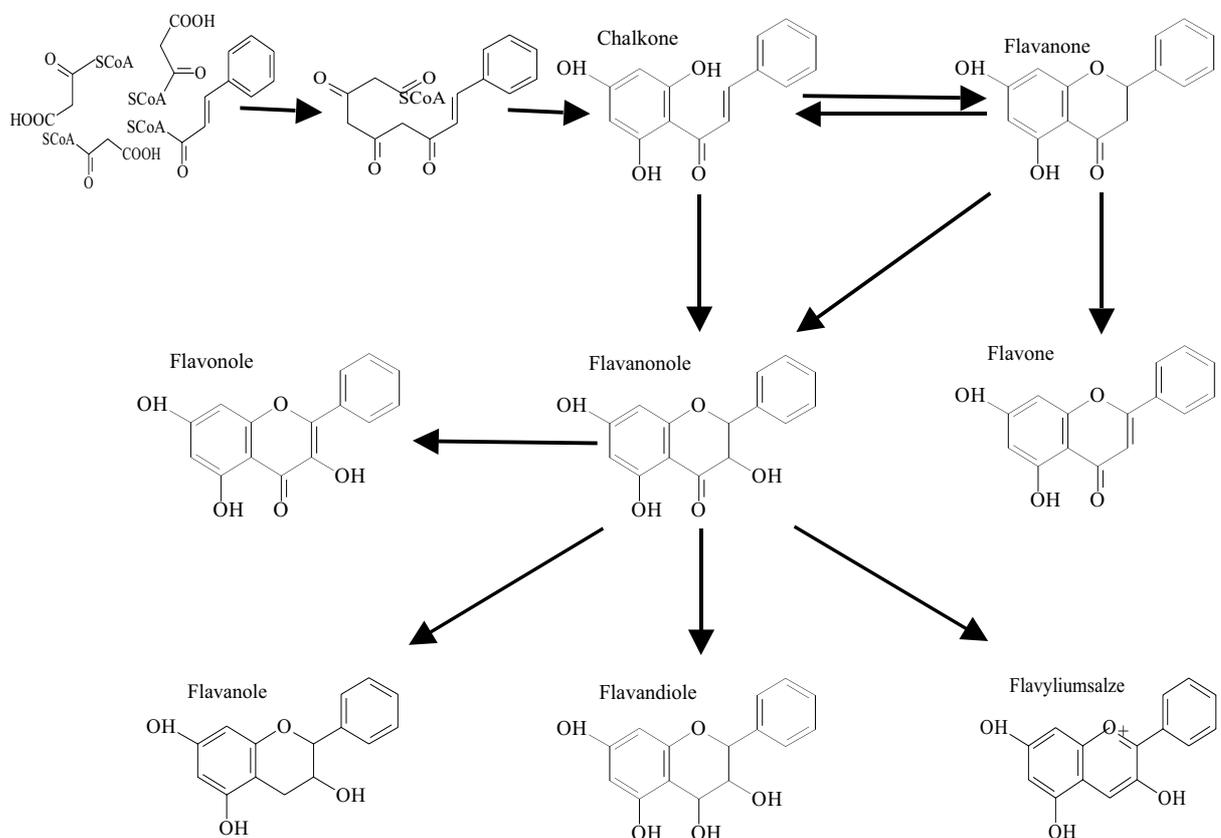
#### 1.2.6 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Die epidemiologisch belegte gesundheitsfördernde Wirkung von pflanzlichen Lebensmitteln ist nicht alleine auf deren Gehalt an Vitaminen, Mineralstoffen und Ballaststoffen zurückzuführen. Auch den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wird eine protektive Wirkung bei verschiedenen Erkrankungen zugeschrieben. Zur Gruppe der nicht-nutritiven sekundären Pflanzeninhaltsstoffe zählen Carotinoide, Glukosinolate, Saponine, Phytosterine, Terpene und Polyphenole<sup>58</sup>. Besonders den zu den Polyphenolen zählenden Flavonoiden wird eine protektive Rolle in der Genese von Herz- und Kreislauferkrankungen, sowie Krebserkrankungen beigemessen. Flavonoide kommen in vergleichsweise hohen Konzentrationen in Obst, Gemüse, Rotwein, schwarzem und grünem Tee vor. Für diese Lebensmittel lässt sich in epidemiologischen Studien eine Krebs-präventive Wirkung dokumentieren<sup>59</sup>.

## 1.3 Flavonoide

### 1.3.1 Einteilung der Flavonoide

Die in Pflanzen vorkommenden Flavonoide umfassen etwa 6500 Verbindungen, die abhängig von ihrer Struktur unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Allen gemein ist das 2-Phenyl-Chroman-Gerüst (Flavangrundgerüst), das aus 2 aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) besteht. In Abhängigkeit vom Oxidationsgrad der C-Atome 2, 3 und 4 des Chromanrings, erfolgt die Einteilung in Flavone, Flavanole, Flavanone, Flavonole, Flavandiole und Flavyliumsalze. Eine besondere Gruppe bilden die Isoflavone, die ein 3-Phenyl-chroman-Gerüst besitzen.



**Abbildung 3: Flavonoide und ihre Biogenese.**

Die Pflanze bildet Flavonoide durch Kondensation von Pflanzensäuren zu einer C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Verbindung, dem Chalkon. Der Sechseringschluss der phenolischen Hydroxylgruppe mit der Arylkette führt zur Grundstruktur der Flavane, dem 2-Phenylchroman. Je nach Oxidationsgrad des sauerstoffhaltigen Ringes ergeben sich die weiteren Grundstrukturen. Die Doppelbindung in Position C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> unterscheidet die Flavone bzw. Flavonole von den Flavanonen bzw. Flavanonolen. Eine Hydroxylgruppe in Position C<sub>3</sub> ist für Flavonole, Flavanole, Flavanonole und Flavandiole charakteristisch. Den Flavanolen und Flavyliumsalzen fehlt die C<sub>4</sub>-Carbonylgruppe und sie weisen einen unterschiedlichen Sättigungsgrad im O-heterocyclischen Ring auf. Im Unterschied zu den Flavonen sitzt der aromatische B-Ring der Isoflavonoide an Position C<sub>3</sub> und nicht an C<sub>2</sub>.

Modifikationen am Grundgerüst, wie zum Beispiel Hydroxylierungen in unterschiedlichen Positionen oder Methylierungen einzelner Hydroxylgruppen führen zu den einzelnen Vertretern der diversen Stoffgruppen. Flavonoide kommen bevorzugt in glykosidierter Form vor, wobei die Bindung der Zucker O-glykosidisch, bei Flavonolen zumeist in Position 3, bei Flavonen und Flavanonen dagegen in Position 7, erfolgt. Bei Flavanonen kann der Zucker auch in Position 6 und 8 C-glykosidisch gebunden sein. Isoflavone liegen in Pflanzen ebenfalls hauptsächlich als Glykoside vor, in fermentierten Produkten überwiegen jedoch ihre Aglykone.

### 1.3.2 Vorkommen der Flavonoide

Flavonoide gehören zur Gruppe der Polyphenole und sind in höheren Pflanzen die quantitativ bedeutendsten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Sie kommen nicht nur in allen Obst- und Gemüsesorten vor, sondern sind auch in Nüssen und Getreiden enthalten. Flavonoide treten zumeist als lösliche Glykoside im Zellsaft der Pflanze auf, wobei bereits mehr als 80 verschiedene Zucker nachgewiesen werden konnten. Die diversen Flavonoide bieten der Pflanze Schutz vor äußeren schädlichen Einflüssen und finden sich daher in Kohlgemüsen und Salaten in den äußeren Blättern und bei Früchten in der Schale. Sie ähneln in ihren regulatorischen Eigenschaften den fettlöslichen Vitaminen und dienen vielen Pflanzen durch ihre unterschiedlichen Farben und Gerüche als Kommunikationsfaktoren mit der Umwelt<sup>60</sup>. Nach Moyano *et al.* kommt Flavonoiden eine Rolle bei der Wachstumsregulation der Pflanzen zu<sup>61</sup>. Darüberhinaus können Flavonoide auch in den Stickstoff-Metabolismus eingreifen und bei Stickstoff-fixierenden Pflanzen, die Knöllchenbildung fördern<sup>62</sup>.

Speziell die Anthocyanidine dienen als rote oder blaue Pigmente in Blüten dem Anlocken von Insekten. Die hell-gelben Pigmente in Zwiebeln oder Sellerie werden sowohl durch Flavonole als auch Flavone gebildet. Flavanone sind oftmals Bitterstoffe, wie zum Beispiel das Naringenin aus der Grapefruit. Für die adstringierende Wirkung in Rotwein und grünem Tee sind Flavanole verantwortlich. Die beiden Isoflavonoide Genistein und Daidzein kommen hauptsächlich in Sojabohnen vor und sind als Phytoöstrogene bekannt<sup>63</sup>. Die Synthese der Flavonoide ist lichtabhängig, daher ist der Flavonoidgehalt in Obst und Gemüse abhängig von der Jahreszeit ihrer Ernte<sup>64</sup>.

### 1.3.3 Pharmakologie der Flavonoide

#### 1.3.3.1 Pharmakodynamik

Durch die Nahrung aufgenommenen Flavonoide werden im Gastrointestinaltrakt in unterschiedlich großem Umfang resorbiert<sup>65</sup>. Die Abspaltung der Glykoside vom Aglykon erfolgt primär durch bakterielle Enzyme im Dickdarm mit nachfolgender Resorption der Aglykone. Flavon- und Flavonolaglykone werden auch im Dünndarm resorbiert und nach Glukuronidierung, Sulfatierung oder Methylierung in der Leber über die Galle in den Dünndarm sezerniert<sup>64</sup>. Ein wichtiger Faktor, der die Resorption der Flavonoide aus dem Darm determiniert, ist die Art des Glykosids. Galt bisher, dass Glykoside im Dünndarm nicht hydrolisiert und absorbiert werden können, sondern zunächst im Dickdarm durch Mikroorganismen gespalten werden müssen, so ist heute bekannt, dass beispielsweise Quercetinglykoside aus Zwiebeln mit ca. 52 % eine höhere Bioverfügbarkeit besitzen, als ihre entsprechenden Aglykone, mit einer Verfügbarkeit von 24%<sup>66</sup>. Befunde von Hollman *et al.* und Aziz *et al.* deuten darauf hin, dass die Quercetinglycoside über den intestinalen Natrium-abhängigen Glukosetransporter (SGLT-1) in die Darmepithelzellen aufgenommen werden, wenngleich dies nicht durch *in vivo* Studien belegt ist<sup>63,67,68</sup>. Es wurden auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Flavonoidabsorption beobachtet. Bei Frauen, die Kontrazeptiva einnahmen, konnten die höchsten Plasmakonzentrationen bestimmt werden, während die Absorptionsrate bei Männern noch geringer war, als bei Frauen, die keine Kontrazeptiva eingenommen hatten<sup>64</sup>. Die Bioverfügbarkeit der unterschiedlichen Flavonoide aus den Subgruppen variiert beträchtlich. Flavanone wie Naringenin und Hesperetin besitzen eine vergleichsweise hohe Bioverfügbarkeit und die der Flavanole liegt generell höher als die anderer Flavonoide, da die Resorption der Flavanole nach ihrer Spaltung durch Magensäure zu Epicatechinmonomeren und -dimeren erleichtert wird.

Die Halbwertszeiten der Flavonoide im Körper variieren ebenfalls beträchtlich. In Studien werden Halbwertszeiten der Flavanole von lediglich 1-2 Stunden beschrieben,<sup>69,70</sup> andere zeigen z.B. für Quercetin eine Ausscheidung im Urin erst nach 23-28 h<sup>71</sup>. Die langsamere Elimination des Quercetins wird mit dessen Bindung an Albumin erklärt. Flavonoide, die im Plasma nicht an Albumin gebunden vorliegen, können offenbar schneller metabolisiert und ausgeschieden werden<sup>72,73</sup>.

Die Metabolisierung der Flavonoide erfolgt hauptsächlich in der Leber. Hepatocyten bringen die Flavonoide zum Golgiapparat und wahrscheinlich auch zu den

Peroxisomen, wo sie partiell oxidativ abgebaut werden können<sup>74</sup>. Der Abbau der Flavonoidaglykone kann ebenfalls im Darm durch bakterielle Enzyme (Glykosidasen, Glukuronidasen und Sulfatasen) erfolgen<sup>75</sup>. Resultierende Flavonoidfragmente werden über Transportproteine für organische Säuren in das Blut transportiert und über die Nieren ausgeschieden<sup>76</sup>.

Bis heute ist es nicht geklärt, ob und in welchem Umfang Flavonoide im menschlichen Organismus gespeichert werden können. Die höchsten Flavonoidkonzentrationen werden im Dickdarm nach oraler Flavonidaufnahme gefunden und können bis zu 3 mM erreichen, während die Plasmaspiegel meist nur 1-2 µM betragen<sup>77</sup>. Da von oral aufgenommenen Flavonolen und Flavanolen nur etwa 1-2 % in intakter Form ausgeschieden werden, lässt dies auf eine fast vollständige Metabolisierung in Dickdarm und Leber schließen.

### **1.3.3.2 Wirkungen der Flavonoide in der Karzinogenese**

Durch eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass Flavonoide eine Vielzahl biologischer Wirkungen aufweisen und antivirale, antiinflammatorische, antiproliferative, antimutagene, anti-kanzerogene und antioxidative Eigenschaften besitzen. Damit kommt ihnen auch in der Genese von Tumoren eine bedeutende Rolle zu.

#### Wirkungen der Flavonoide in der Initiationsphase

Durch Hemmung der Phase-I-Enzyme (z.B. Cytochrom P450 Isoenzyme CYP1A1, CYP1A2) des Fremdstoffmetabolismus können Flavonoide die Tumor-Initiation beeinflussen<sup>78</sup>. Phase-I-Enzyme sind in der Lage eine Vielzahl von Prokarzinogenen metabolisch zu aktivieren, die ihrerseits mit zellulären Nucleophilen interagieren können und somit zu ultimativen Karzinogenen werden. Die Aktivierung von Phase-II-Enzymen wie z.B. der Glutathione-S-Transferase oder der UDP-Glucuronyl-Transferase durch Flavonoide führt dahingegen zu einer verstärkten Ausscheidung von Karzinogenen und damit zu deren Detoxifikation<sup>79</sup>.

Im gesunden menschlichen Organismus stellt sich immer wieder ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen ein. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes in Richtung Oxidation führt zur verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und resultiert im oxidativen Stress. Freie Radikale und andere ROS können aufgrund ihrer Reaktivität unkontrolliert Lipide, Proteine, DNA

und/oder Kohlenhydrate oxidieren. Während die Proteinoxidation zum Aktivitätsverlust z.B. von Enzymen führen kann, bewirkt die Oxidation von DNA Veränderungen in der DNA-Struktur und Genfunktion. So wurde für Genistein, ein Isoflavon aus der Sojabohne, gezeigt, dass es eine oxidative Veränderung der DNA vermindert, die durch UV-Licht oder ROS ausgelöst wurde. Die Bildung von 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG), als Marker der DNA-Veränderung, konnte durch das Isoflavon in Abhängigkeit seiner Konzentration nahezu vollständig unterdrückt werden<sup>80</sup>.

Wie bereits erwähnt, akkumulieren freie Radikale normalerweise nicht im Körper, sondern werden durch Entgiftungsreaktionen reduziert. Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren sind u.a. Superoxiddismutase (SOD), Katalase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase. Die Wirkung vieler sekundärer Pflanzenstoffe basiert nicht nur auf der Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale abzufangen, sondern auch auf der Aktivierung der ROS-reduzierenden Enzymsysteme oder in der Inhibierung von Enzymen, die an der Bildung von Radikalen beteiligt sind. Die Hemmung der prooxidativen Cyclooxygenasen (COX), Lipoxigenasen (LOX) oder Xanthinoxidase durch Flavonoide könnte jedoch auch in späteren Phasen der Tumorpromotion und Progression von entscheidender Bedeutung sein, da die Enzyminhibition hier mit einer Hemmung der Tumorzellproliferation assoziiert ist<sup>81,82</sup>.

#### Antiproliferative Eigenschaften von Flavonoiden

Bei Krebserkrankungen ist unter anderem das Gleichgewicht von Zellproliferation und Apoptose gestört, so dass es zum ungehemmten Zellwachstum und folglich der Ausbildung von Tumoren kommt. Die Wachstumshemmung von Krebszellen durch Flavonoide wurde in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Studien belegt. Kandaswami *et al.* konnten z.B. in ihrer Studie zeigen, dass die beiden Flavonoide Nobiletin und Tangeritin in der Lage sind, signifikant das Wachstum einer humanen Karzinom-Zelllinie (HTB43) zu hemmen<sup>83</sup>. Die Effekte der Flavonoide auf Tumorzellen sind meist pleiotrop, d.h. sie sind in der Lage, in verschiedene Prozesse der Tumorentstehung einzugreifen.

Flavonoide wirken als effektive Inhibitoren von Enzymen der Signaltransduktion und können so, z.B. über die Inaktivierung der Proteinkinase C (PKC)<sup>84</sup>, der Protein-

Tyrosinkinase (PTK)<sup>82</sup> oder der Phosphoinositol-3-Kinase (PIP<sub>3</sub>)<sup>85</sup> in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen.

Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), gelten als Regulatoren des Zellzyklus. In vielen Tumoren liegt eine Hyperaktivierung der CDKs vor, und es kommt zur unkontrollierten Zellteilung. Genistein, Quercetin, Daidzein, Luteolin und Kämpferol sind Beispiele für Flavonoide, die an den Kontrollstellen des Zellzyklus (G1/S, G2/M) eingreifen können und zum Zellzyklusarrest führen<sup>86,87</sup>.

Einige Flavonoide sind auch in der Lage, die Differenzierung von Zellen zu fördern<sup>88</sup>. Während zum Beispiel Genistein, Apigenin und Quercetin die Differenzierung der Leukämie Zelllinie HL-60 auslösen konnte, induzierte Flavon die Differenzierung der humanen Kolonkrebszelllinie HT-29<sup>89,90</sup>.

### Induktion von Apoptose

Eine sehr wichtige anti-karzinogene Wirkung der Flavonoide besteht in der Induktion von Apoptose. Der programmierte Zelltod wird durch eine Reihe von Genen reguliert, die entweder die Apoptose oder das Überleben der Zellen fördern. Ein hoch reguliertes Netzwerk von wechselwirkenden Proteasen und ihren Inhibitoren antwortet auf extrazelluläre Signale, die über membranständige Rezeptoren (Apo1/FAS; CD3; TNF-R) in die Zelle geleitet werden oder auf intrazelluläre Signale, die die Aktivierung von pro-oder anti-apoptotischen Faktoren in den Mitochondrien beeinflussen.

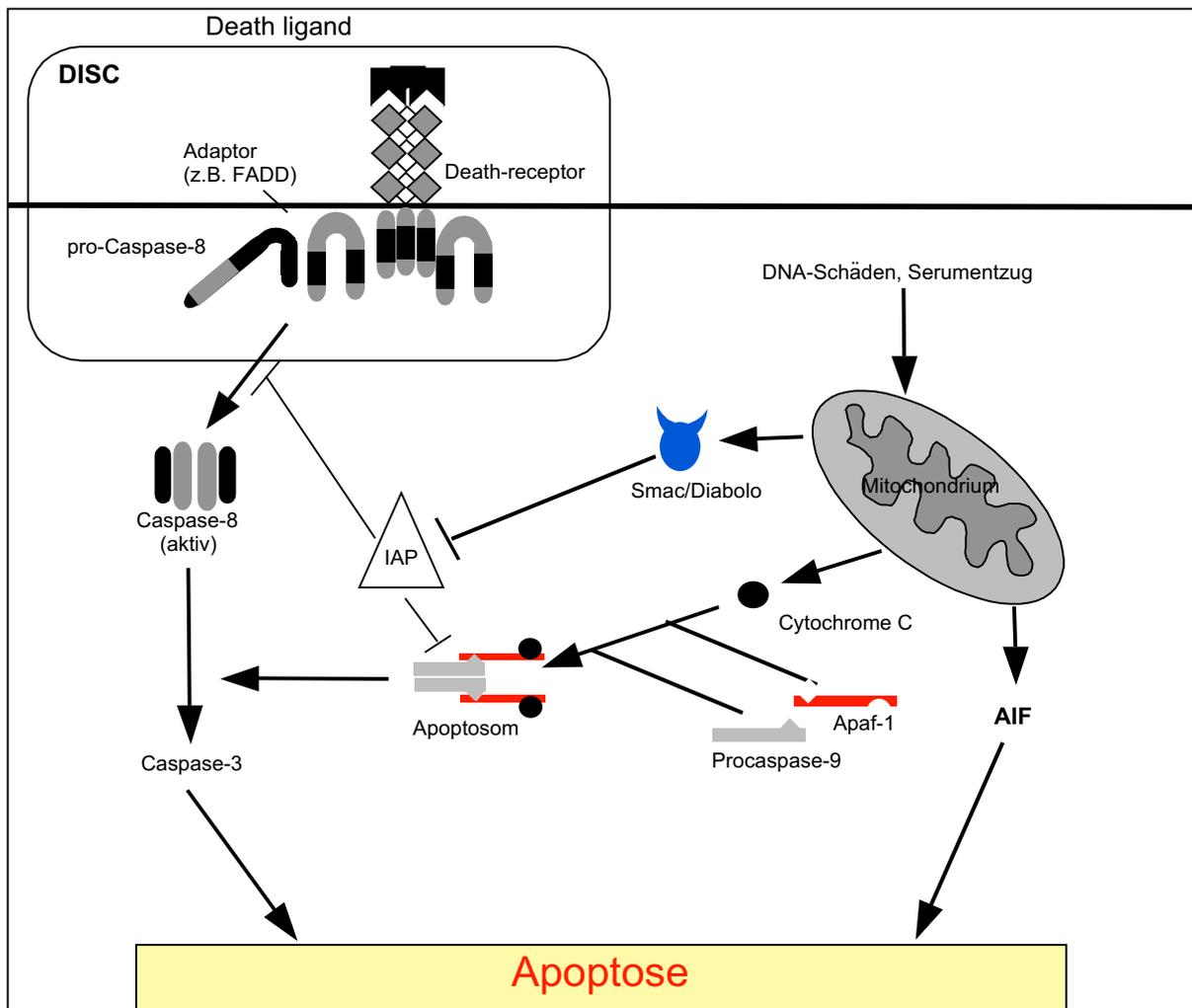
Während der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Caspasen, einer Familie von Cystein-Proteasen (**C**ystein **A**spartat spezifische **P**rotease), die andere Proteine spezifisch nach Aspartat-Resten schneiden. Zu den Substraten der Caspasen gehören zum Beispiel Proteine des Cytoskeletts und Lamine<sup>91</sup> deren Hydrolyse zum Abbau der Zelle bzw. der Schrumpfung des Zellkerns führt. Auch die Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP), ein ATP-abhängiges Enzym der DNA-Reparaturprozesse<sup>92</sup> und das Retinoblastom Protein (Rb), das relevant für die Progression des Zellzyklus ist<sup>93</sup>, werden durch Caspasen gespalten. Das PARP wird durch Caspase-7 und Caspase-3 hydrolysiert, wodurch sowohl seine DNA-Reparaturfähigkeit, als auch die ATPase Aktivität verloren gehen<sup>94</sup>. Sobald Fehler im DNA-Reparatursystem auftreten, tritt p53, als „Wächter des Genoms“ in Kraft und löst die Apoptose aus. Das Rb dient der Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2-F), die den Zellzyklus aktivieren. Eine Phosphorylierung von Rb bewirkt die

Dissoziation und somit die Aktivierung von E2-F. Die Spaltung des Rb durch Caspasen hat zur Folge, daß Rb nicht mehr als Bindungspartner für E2-F zur Verfügung steht. Aufgrund der fehlenden Regulation des Transkriptionsfaktors antwortet die Zelle folglich mit dem Vollzug der Apoptose. Ein Protein, das durch Caspaseangriff aktiviert wird, ist die Proteinkinase C $\delta$ , d.h. ihr aktives Spaltprodukt ist in die Chromatinkondensation, einem morphologischen Kennzeichen der Apoptose, involviert<sup>95</sup>. Die Regulation der Caspasen erfolgt auch durch ihre Bindung an IAPs (Inhibitoren der Apoptose). Auch die IAPs können ihrerseits durch Bindung an das Protein Smac/DIABOLO inaktiviert werden, sodass ihre Caspasehemmung aufgehoben wird und Apoptose wieder stattfinden kann<sup>96</sup>.

Regulatoren der Apoptose sind auch die Mitglieder der Bcl-2 Familie. Sie können in Agonisten (bax, bac, bcl-x<sub>s</sub>m bad, bok) und Antagonisten (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>) der Apoptose unterteilt werden. Das Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren ist für das Überleben oder das Absterben der Zelle ausschlaggebend. Die Hauptfunktion der Proteine der Bcl-2 Familie scheint die Regulation der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, insbesondere des Cytochrom C aus den Mitochondrien zu sein. Pro-apoptotische Bcl-Homologe bewirken die Freisetzung von Cytochrom C, die in Anwesenheit von anti-apoptotischen Bcl-Homologen gehemmt wird. Das freigesetzte Cytochrom C bindet an APAF-1 (Apoptose assoziierten Faktor-1) und Caspase-9 und bildet in Anwesenheit von ATP ein Holoenzymkomplex, das sogenannte Apoptosom. Dieses ist in der Lage, über die Aktivierung von Caspase-3 die Apoptose auszulösen.

Der programmierte Zelltod kann darüberhinaus auch unabhängig von Caspasen durch das mitochondriale Flavoprotein AIF (Apoptose induzierender Faktor) ausgelöst werden, wobei dieser Mechanismus noch ungeklärt ist<sup>97</sup>.

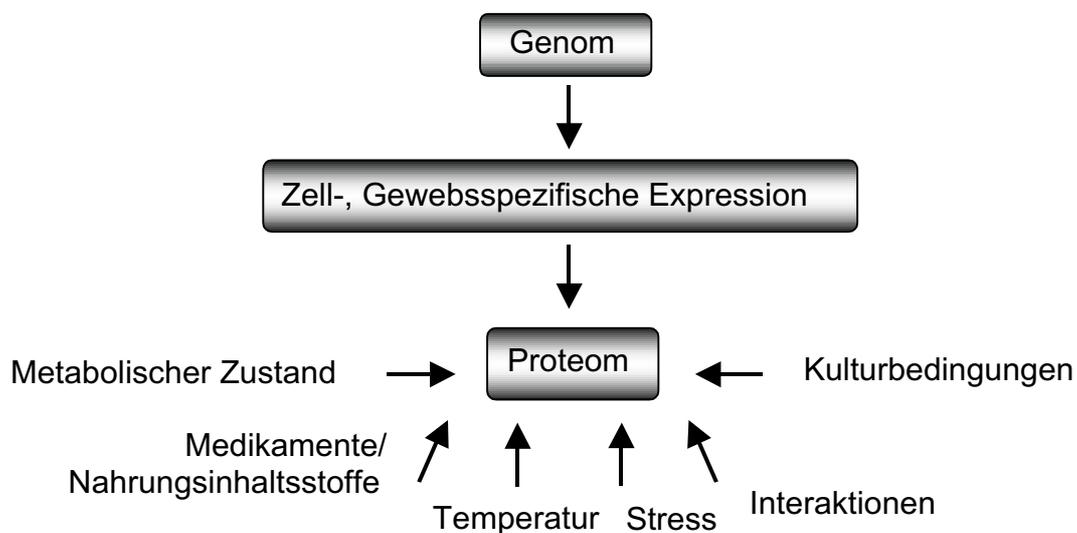
Fehlregulationen der Apoptose und der Apoptoseresistenz sind kritische Faktoren in der Onkogenese und daher erscheint es lohnenswert zu prüfen, in wieweit Flavonoide in die Förderung der Apoptose eingreifen können. Verminderung von ROS<sup>98</sup>, Regulation der Expression von Heat-shock-Proteinen (HSPs)<sup>99</sup>, Modulation der Signalwege<sup>100</sup>, Freisetzung von Cytochrom C mit resultierender Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3<sup>101</sup>, Verminderung der Expression der anti-apoptotischen Gene Bcl-2, Bcl-X(L) und NF-kappaB sowie eine gleichzeitige Verstärkung der Expression von Bax und Bak,<sup>90</sup> sind bisher nachgewiesene Wirkungen ausgewählter Flavonoide im Zusammenhang mit den Apoptosegeschehen.



**Abbildung 4: Regulation der Apoptose durch pro- und anti-apoptische Faktoren.**  
 Pfeile bedeuten eine Aktivierung, T-Linien symbolisieren eine Hemmung. Weitere Erläuterungen im Text.

#### 1.4 Proteomics zur Untersuchung der Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen

Das Genom steht für das gesamte genetische Material einer Zelle oder eines Organismus und liegt in jedem Entwicklungszustand unverändert vor. Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus und ist im Gegensatz zum Genom hoch dynamisch. Es verändert sich nicht nur mit dem Entwicklungszustand der Zellen, des Gewebes oder Organismus, sondern paßt sich beständig an veränderte Umgebungsbedingungen des Organismus an (Abb. 5).



**Abbildung 5: Das Proteom als dynamisches Gebilde unter dem Einfluss zahlreicher Parameter.**  
Die Menge exprimierter Proteine schwankt unter wechselnden Bedingungen.

Proteomics bezeichnet die Analyse der Gesamtheit aller Proteine die von einem Genom unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Die einzige Methode, die es zur Zeit ermöglicht, tausende von Proteinen voneinander zu trennen, ist die 2 dimensionale Gelelektrophorese (2-DE)<sup>102,103,104</sup>. Sowohl die Fortschritte in der Reproduzierbarkeit der 2-DE, die zunehmende Sensitivität der Proteinfärbung, als auch vor allem die Weiterentwicklung der massenspektrometrischen Analyse der Proteine waren Voraussetzungen für den Erfolg dieser Methode in der heutigen Forschung. Diese Technologie ermöglicht es, eine große Zahl an Proteinen voneinander zu trennen, sie anschließend zu identifizieren und ihre Modifikationen zu erkennen. Limitationen der Methode ergeben sich bei der Auftrennung von sehr basischen oder hydrophoben Proteinen, sowie daraus, dass Proteine mit sehr großem oder sehr kleinem Molekulargewicht im 2D-Gel nicht sichtbar sind und

außerdem Polyacrylamid eine schlechte Matrix für alle anschließenden Proteinchemischen Untersuchungen ist.

Wie bereits oben erwähnt, beschreibt das 2-DE Muster die Proteinzusammensetzung eines biologischen Systems zu dem Zeitpunkt, an dem die Proteine aus ihrer biologischen Umgebung isoliert werden. Das 2-DE Proteinmuster kann dann zum Vergleich unterschiedlicher Einflussfaktoren herangezogen werden. Zum Beispiel können unbehandelte und behandelte Krebszellen miteinander verglichen werden, um die Wirkung eines Medikamentes oder Nahrungsmittelinhaltsstoffes auf Proteinebene zu untersuchen. Es werden für den Vergleich mehrere Gele von der gleichen Probe generiert, um Durchschnittsgele zu bilden. Die Spotmuster von Durchschnittsgelen aus verschiedenen Proben werden durch subtraktive Analyse miteinander verglichen<sup>105</sup>, um veränderte Proteine zu analysieren. Zur Identifikation der Proteine werden die Proteinspots aus dem Gel geschnitten, tryptisch verdaut und mit z.B. MALDI-TOF-MS analysiert.

Bei der Suche nach bioaktiven Nahrungsinhaltsstoffen bzw. Biomarkern für die *in vivo* Wirksamkeit eines Nährstoffes, finden zunehmend auch in der Ernährungsforschung die Methoden der Genomics und Proteomics ihren Einsatz.

Die Methode der 2 DE ermöglicht es, die Proteinexpression z. B. eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen und die Wirkung eines Effektors auf das Proteom durch subtraktiven Vergleich der 2 DE-Muster zu analysieren. Durch die anschließende Identifizierung regulierter Proteine besteht somit die Möglichkeit, neue Einblicke in die Stoffwechselregulation zu erhalten und den Wirkmechanismus eines Effektors aufzuklären. Von Tan *et al.* wurde erstmals ein Proteomprofil von HT-29 Zellen vorgelegt, mit dem der Einfluss von Butyrat auf die Krebszelllinie untersucht wurde. Butyrat entsteht bei der bakteriellen Fermentation von resistenter Stärke im Dickdarm. Die hemmende Wirkung von Butyrat auf das Wachstum von Darmkrebszellen ist bekannt, außerdem wird durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren im Darm durch die Fermentation der pH-Wert gesenkt, sodass die Umwandlung von primären Gallensäuren in prokanzerogene sekundäre Gallensäuren vermindert wird. Neben Proteinen, die bereits im Zusammenhang mit der Butyratwirkung und der resultierenden zellulären Differenzierung bzw. Apoptose untersucht wurden, konnten auch Proteine identifiziert werden, die bisher noch in keinen Zusammenhang mit Apoptose und Differenzierung

gebracht werden konnten<sup>106</sup>. Im Zusammenhang mit dem Einsatz von resistenter Stärke als Ingredienz von funktionellen Lebensmitteln ist die Aufklärung des Butyrat-Wirkmechanismus im Dickdarm von besonderer Bedeutung.

Proteomics findet zunehmend auch bei der Suche nach diagnostischen Markerproteinen ihren Einsatz. Hierbei wird das Proteinexpressionsprofil von gesundem und krankem Gewebe verglichen. Veränderungen im Proteinexpressionsprofil können so beispielsweise schon in frühen Krebsstadien mit diesem Hochdurchsatzverfahren erkannt werden. Hanash *et al.* gelang es, mittels 2-DE ein solches therapeutisches Zielprotein der Leukämie zu identifizieren. Sie beobachteten, dass das Oncoprotein 18 (OP 18) in Lymphzellen der akuten Leukämie verglichen mit Kontrollzellen verstärkt exprimiert wird. Eine Hemmung des OP 18 hatte eine deutliche Reduktion der Tumorgenität der Leukämiezellen zur Folge<sup>107,108</sup>.

Auf der Suche nach neuen Markern aus Tumorgewebe der Leber wurden in der Studie von Kim *et al.* die Proteinexpression von gesundem humanen Lebergewebe mit Tumorgewebe aus der Leber verglichen. Anhand der subtraktiven Analyse der 2-DE Gele konnten 16 Proteinspots identifiziert werden, die sich in ihrer Intensität unterschieden. Obwohl ein bekannter Marker für HCC-Tumoren, das  $\alpha$ -Fetoprotein, vermutlich aufgrund seiner geringen Expression nicht in den Gelen detektiert werden konnte, ließen sich andere Marker, wie z.B. Ferritin und  $\alpha$ -Antitrypsin, die in größeren Mengen exprimiert werden, mittels 2-DE und anschließender MADLI-TOF-MS identifizieren<sup>109</sup>.

Auch wenn in den letzten Jahren die Methoden zur Trennung im 2D-Gel eine Erhöhung der Sensitivität im Nachweis der Proteine ermöglicht haben, so stellen Proteine mit geringer Expressionshöhe nach wie vor ein Problem dar. Sie sind schwierig in Anwesenheit von Proteinen mit hohem Expressionsspiegel zu detektieren, wie auch das obige Beispiel belegt.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Flavonoide werden als präventive Nahrungsinhaltsstoffe im Rahmen der Kolonkarzinogenese diskutiert. Viele ihrer Wirkungen werden auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem *Screening* die antioxidative Wirkung von 27 verschiedenen Flavonoiden in transformierten HT-29 Zellen und nicht transformierten NCOL-1 Zellen geprüft. Die beiden Flavonoide, die am stärksten in ihren antioxidativen Eigenschaften variierten, Flavon und Quercetin, wurden im Folgenden auf ihre Apoptose-auslösende Potenz untersucht.

Flavon zeigte sich als spezifischer Apoptoseinduktor in den transformierten Zellen, während Quercetin in beiden Zelllinien Apoptose auslösen konnte. Um die differentiellen Effekte von Flavon und Quercetin auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde eine Proteomanalyse der Kolonozyten mit und ohne Exposition gegenüber den Flavonoiden durchgeführt. Eine partielle Anreicherung der aus den Zellen isolierten Proteine fand durch Fraktionierung in lösliche Proteine und Membran-Proteine statt, die der 2 DE vorangestellt wurde.

Eine subtraktive Analyse der 2-DE Muster aus behandelten Zellen und Kontrollzellen sollte die Veränderungen auf Proteinebene wiedergeben. Die Proteinspots, die unterschiedliche Volumina zeigten, wurden tryptisch verdaut und ihr Peptid-Fingerabdruck im Massenspektrometer analysiert.

Durch Abgleich der Peptidmassen in einer Datenbank sollten schließlich die durch Flavon bzw. Quercetin in ihrer Quantität veränderten Proteine identifiziert werden, um daraus Hinweise auf den möglichen Wirkmechanismus des jeweiligen Flavonoids zu erhalten.

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit (Brutschrank Stericult 200, Forma Scientific) in 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen. Der Medienwechsel erfolgte alle 48 h. Hierzu wurde das verbrauchte Medium vollständig abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Alle Flüssigkeiten wurden zuvor auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden bei 70-80 %iger Konfluenz subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend für 3-5 min mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% w/v Trypsin und 0,02% EDTA in PBS Lösung, pH 7,4) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen sich vom Kulturflaschenboden gelöst hatten, wurde der Digestionsprozess durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt, anschließend wurden die Zellen mit entsprechender Dichte für die Versuche auf die Zellkulturflaschen ausgesät und ein Aliquot der Zellsuspension zur weiteren Passagierung verwendet.

##### 3.1.1 Kultivierung der transformierten Zelllinie HT-29

Die Krebszelllinie HT-29 wurde von „*American Type Culture Collection*“ (ATCC, Rockville, Maryland, USA) bezogen. Die humanen HT-29 Zellen sind den Stammzellen des Kolons recht ähnlich und wachsen unter Standardbedingungen unpolarisiert und undifferenziert, sind jedoch in der Lage, einen Monolayer zu bilden. Sie wurden von J.Fogh 1964<sup>110</sup> (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York*) aus einem Adenokarzinom des Kolons isoliert und kultiviert.

Es wurden Zellen der Passagen 153-156 verwendet. Für ihre Kultivierung wurde das in Tabelle 1 aufgeführte Nährmedium mit den entsprechenden Supplementen verwendet.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des Kulturmediums für die HT-29 Zelllinie

<b>Kulturmedium und Supplemente</b>	
RPMI 1640	500 ml
FKS	10 [%] (v/v)
L-Glutamin	1 [%] (v/v)
Penicillin	100 [U/ml]
Streptomycin	100 [µg/ml]

### 3.1.2 Kultivierung der nicht-transformierten humanen Kolonozyten Zelllinie NCOL-1

Die humanen Kolonepithelzellen NCOL-1 stammen aus dem Labor von C. Deveney von der *Oregon Health Sciences University* (Portland, USA). Die Zellen entstammten Biopsiematerial und konnten nach erfolgreicher Isolierung als humane epitheliale Kolonzellen etabliert werden. Die NCOL-1 Zellen können über mehrere Monate in Kultur gehalten werden<sup>111</sup>. Die morphologischen Charakteristika dieser Zellen konnten mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden. Sie sind in der Lage einen Zellrasen zu bilden und entwickeln sich als polarisierte epitheliale Zellen. Sie besitzen auf ihrer apikalen Membran kurze Mikrovilli und sind untereinander mit *tight junctions* verbunden und exprimieren den für Epithelzellen typischen Cytoskelettmarkers Cytokeratin.

Die NCOL-1 Zellen wurden in DMEM (25mM HEPES)-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) kultiviert und passagiert und bei Passage 76 für die Versuche verwendet. Die Subkultivierung erfolgte mit einer Lösung aus 0,1 % Trypsin und 0,04 % EDTA analog den HT-29 Zellen.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Kulturmediums für die Zelllinie NCOL-1

<b>Kulturmedium und Supplemente</b>	
DMEM/HEPES	500 ml
Penicillin/Streptomycin Lyophilisat	
Gentamycin	1,25 %
Fungizone	500µl
FKS	58,8 ml
MEM Aminosäuren 50x	11,7 ml
rhEGF	500 µl
BME-Vitamine 100x	5,88 ml

## 3.2 Bestimmung der antioxidativen Wirkung der Flavonoide

### 3.2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Um antioxidative Wirkungen einiger ausgewählter Flavonoide zu untersuchen, wurde bestimmt, in welchem Umfang das durch tertiäres Butylperoxid gebildete Wasserstoffperoxid in HT-29 bzw. NCOL-1 Zellen abgefangen werden kann. Dazu wurden die HT-29 und NCOL-1 Zellen in einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/well auf 24 well Platten (Renner, Dannstadt) ausgesät. Bei konfluentem Zellrasen wurden die Zellen zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes, Leiden) in einer Endkonzentration von 5 µM im Brutschrank inkubiert. Nach 40 min Farbstoffinkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit modifiziertem

Krebs-Puffer pH 7,4 (siehe Anhang 8.1.7) gewaschen. Zur intrazellulären Spaltung des Chloromethylesters wurden die Zellen erneut 20 min im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1 mM tertiärem Butylperoxid und 150  $\mu\text{M}$  des zu prüfenden Flavonoids beladen. Die Messung der Fluoreszenz von  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  nach Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte *on-line* bei 538 nm nach Anregung bei 485 nm in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader (Fluorskan, Ascent), wobei die Reaktion mit Wasserstoffperoxid eine Zunahme der Emission bewirkt.

### 3.2.2 Superoxidradikalanionen

Die antioxidative Wirkung der Flavonoide wurde auch durch die Messung des Quenchen von Superoxidradikalanionen in HT-29 und NCOL-1 Zellen untersucht. Analog zur Wasserstoffperoxid-Bestimmung wurden die Zellen mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/well auf 24 well Platten ausgesät und im konfluenten Zustand zur Messung eingesetzt. Zur Messung der Produktion von Superoxid-Radikalen wurde der Farbstoff Proxyl-Fluorescamin (Molecular Probes, Leiden) in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 390 nm wurde die Lichtemission des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 460 nm im Fluoroskan (Ascent) gemessen. Die Reaktion mit Superoxid-Radikalen erhöht die Emission des Farbstoffes. Die Farbstoffvorinkubation erfolgte über 2 h im Brutschrank. Als Superoxid-Radikal Donor wurde 50  $\mu\text{M}$  Camptothecin eingesetzt, die Flavonoide in einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$ . Die Inkubation der Zellen mit Proxylfluorescamin im Medium sowie die Messung der Fluoreszenz im modifizierten Krebs-Puffer erfolgte unter Zusatz von 250  $\mu\text{M}$  Cystein. Dadurch wurde die Reduktion des Fluorophors Nitrosid in sein entsprechendes Hydroxylamin bewirkt und somit eine Erhöhung der Emission erreicht.

## 3.3 Apoptosemessungen

### 3.3.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität als frühes Ereignis der Apoptose

Die Messung der Aktivität der Caspase-3 (CPP32) wurde nach Nicholson *et al.*<sup>112</sup> durchgeführt. Caspase-3 spaltet als Mitglied der ICE-Proteasefamilie während des Apoptoseprozesses proteolytisch PARP. Die CPP 32 Aktivierung ist ein Schlüsselereignis im Apoptoseprozess, und führt über eine Kaskadenaktivierung zu morphologischen Veränderungen der Zelle, die charakteristisch für den Zelltod sind. Zur Aktivitätsmessung wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ well auf einer 6-well Kulturplatte ausgesät. Bei 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen mit den

entsprechenden Effektoren für 24h inkubiert. Im Anschluss wurde der präkonfluente Zellrasen zweimal mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen und die Zellen trypsinisiert. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen in der Zellsuspension wurden pelletiert und das Zellpellet erneut mit PBS-Lösung gewaschen. Zur Isolierung des Cytosols, wurden die Zellen in 750 µl Apoptosepuffer (siehe Anhang 8.1.7) aufgenommen und mittels Motor getriebenem Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 14 000 rpm bei 4 °C für 30 min zentrifugiert und anschließend der cytosolische Überstand abgenommen. 500 µl des Cytosols wurden zur Messung eingesetzt und mit 5 µl des fluorogenen Caspase-3-Tetrapeptid-Substrates Ac-DEVD-amino-4-methylcoumarin (Endkonzentration 25 µM) versetzt. Die cytosolische Caspase bewirkt die Spaltung des Coumarinderivates und führt zur Bildung eines fluoreszierenden Produktes, das nach Anregung bei 390 nm und Emission bei 460 nm mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenreaders bestimmt werden kann.

### 3.3.2 Membrandesintegration als früher Apoptosemarker

Ein weiteres frühes Apoptoseereignis ist die Desintegration der Zellmembran.

Bei 70-80 %iger Konfluenz wurden die Zellen mit 150 µM des Effektors für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den Effektoren abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS (siehe Anhang 8.1.7) gewaschen. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 in einer Endkonzentration von 100 µg/ml für 5 min inkubiert. Die Farbstofflösung wurde abdekantiert, die Zellen mit einem Glasplättchen abgedeckt und im Mikroskop betrachtet. Das Meßprinzip basiert darauf, dass der Farbstoff in die apoptotischen Zellen, deren Membran bereits perforiert ist, eindringen kann und nach Bindung an die DNA fluoresziert.

### 3.3.3 DNA-Fragmentierung als später Apoptosemarker

Die Fragmentierung der DNA gilt als spätes Ereignis im apoptotischen Prozeß. Die Zellen wurden auf 4 well Platten mit Objektträger ausgesät. Bei 70-80 %iger Konfluenz wurden die Zellen für 48 h mit einigen ausgewählten Flavonoiden inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 % Paraformaldehydlösung für 10 min fixiert und getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 in einer Endkonzentration von 25 mg/ml für 10 min inkubiert. Nach Abdekantierung des überschüssigen Farbstoffes wurden die Zellen mit einem Glasplättchen abgedeckt

und im Mikroskop betrachtet. In den apoptotischen Zellen sind DNA Fragmente erkennbar, während die DNA nicht-apoptotischer Zellen einheitlich angefärbt wird.

### 3.4 2 dimensionale Gelelektrophorese

#### 3.4.1 Herstellung des Gradientengels

Die Gele wurden mit einem Gradienten von pH 4 bis pH 9 nach der Methode von Görg *et al*<sup>113</sup> unter Verwendung der in Tabelle 3 beschriebenen Lösungen hergestellt. Die SDS-Gele wurden mit einer Dicke von 0,5 mm gegossen und auf einen Gelbond-PAG-Film (Amersham Biosciences, Freiburg) aufpolymersiert.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Gradientenlösungen

Linearer pH Gradient	Saure Lösung pH 4	Basische Lösung pH 9
Immobiline pk 3.6	940 µl	167 µl
Immobiline pk 4.6	266 µl	481 µl
Immobiline pk 6.2	263 µl	408 µl
Immobiline pk 7.0	25 µl	336 µl
Immobiline pk 8.5	283 µl	81 µl
Immobiline pk 9.3	250 µl	751 µl
Acrylamid / Bisacrylamid (30% T, 3 %C)	2,26 ml	2,26 ml
<i>A. bidest</i>	9,4 ml	12,6 ml
Glycerol (>87 %)	4,25 g	-
TEMED (100 %)	11,3 µl	11,3 µl
APS (40 %)	17,0 µl	17,0 µl
Finales Volumen	17 ml	17 ml

#### 3.4.2 Herstellung der SDS-Gele

Die 12,5 %igen analytischen Trenngele wurden nach der Methode von Laemmli<sup>114</sup> hergestellt.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des 12.5 % SDS Gels

	Volumen [ml]
Acrylamid (30 %)/ Bisacrylamid (0,8 %)	375
1,5 M TrisCl, pH 8,8	225
SDS (20 %)	4,5
APS (10 %)	9
TEMED (10 %)	1,24

Je 12 Trenngele wurden in der ETTAN DALT Gelgießkammer gegossen. Die Gelgröße betrug 25,5 x 20,5 x 0,1 cm (w x h x d). Die Auspolymerisierung erfolgte über 2 Nächte bei 4°C, die Gele wurden bis zu 1 Woche bei 4°C gelagert.

### 3.4.3 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung ist der wichtigste Schritt in der 2-DE und hat den größten Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Methode. Ziel der Aufarbeitung ist es, die Löslichkeit und Disaggregation der Proteine zu maximieren, ohne gleichzeitig die Proteine durch Proteolyse zu spalten. Membrangebundene und sehr hydrophobe Proteine sind besonders schwer für die 2-DE zugänglich zu machen. Für jeden Zell- oder Gewebetypus muss die Methode spezifisch angepasst werden. Die Proteine, die am stärksten in dem untersuchten Organismus exprimiert werden, treten nicht zwangsläufig auch am stärksten im 2-D-Gel auf. Membrangebundene Proteine, die etwa 30% des Gesamtproteins ausmachen, sind im Gel zumeist unterrepräsentiert, da sie zum Großteil nach der Extraktion mit dem Pellet abgetrennt werden<sup>115</sup>. Im Gegensatz dazu können cytosolische Proteine, die eigentlich nur in geringem Umfang exprimiert sind deutlich im Gel sichtbar sein, da sie leicht in Lösung gehen. Um eine maximale Löslichkeit der Proteine zu erreichen, werden dem Lysepuffer neben Harnstoff auch Thioharnstoff zugesetzt<sup>113</sup>.

Mit Hilfe der hochauflösenden 2-DE gelingt es mittlerweile bis zu 10 000 Proteine aus einer einzelnen Probe aufzutrennen<sup>116</sup>. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen isoelektrischen Punktes getrennt, in der zweiten Dimension aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes bzw. ihrer molekularen Masse. Während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) laufen die Proteine in einem linearen pH-Gradienten im elektrischen Feld unter Hochspannung bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Der pH Gradient wird durch Immobiline, die kovalent an die Acrylamidmatrix gebunden sind erreicht<sup>113,117</sup>. Die Trennungsmatrix in der 2. Dimension ist Polyacrylamid, das mit Bisacrylamid vernetzt ist. SDS als starkes anionisches Detergenz bewirkt die Lösung und Dissoziation der Proteine in einzelne Polypeptidstränge und verleiht ihnen eine einheitliche negative Ladung. Auf diese Weise können Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-200 kDa in der 2. Dimension voneinander aufgetrennt werden.

### 3.4.3.1 Gesamtproteinlysat

Das Verfahren der Probenaufbereitung musste speziell für die Proteinisolierung aus Zellmaterial angepasst werden. Ziel der Aufarbeitung war es, die Proteine durch Disaggregation, Denaturierung und Reduktion komplett zu lösen. Um Proteinverlusten vorzubeugen, musste die Probenvorbereitung so einfach wie möglich gehalten werden.

Die Zellen wurden bei 80% Konfluenz 3x mit eisgekühlter Saccharoselösung (0,35 M) gewaschen und auf Eis abgeschabt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 7 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Saccharoselösung wurde abgesaugt und das Zellpellet in Lysepuffer 2 (siehe Anhang 8.1.7) aufgenommen. Unter Eiskühlung wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Ultraschallstabes (10 Stöße, Amplitude 0,5) homogenisiert. Das Proteinlysat wurde für 30 min bei 43000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die anschließende Proteinbestimmung erfolgte mit Bio-Rad Reagenz nach Bradford. Die Proben wurden aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Gebrauch eingefroren.

### 3.4.3.2 Protein-Fraktionierung nach Ramsby *et al*

Um eine Aufteilung des Gesamtproteinlysates in cytosolische-, Zellorganell- und Zellkernfraktion zu erreichen, wurden die Zellen zunächst analog der oben beschriebenen Methode von den Zellkulturflaschen abgeschabt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu\text{l}$  Digitoninpuffer aufgenommen und zur Suspendierung mehrfach durch eine Spritze gezogen. Die Zellen wurden solange auf Eis inkubiert, bis 80 % der Zellen lysiert waren. Die Kontrolle der Zelllyse erfolgte mittels Trypanblau-Färbung der lysierten Zellen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 2300 rpm zentrifugiert. Im Überstand wurde nach Bradford die Proteinkonzentration bestimmt. Die cytosolische Proteinfraction wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Das Zellpellet wurde in Triton-X-100 Puffer (siehe Anhang 8.1.7) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch 10 min Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 7500 rpm wurde die Zellorganellfraktion abgetrennt.

Das verbleibende Zellpellet wurde in Tween40/ Deoxycholate-Puffer mit Hilfe einer Spritze resuspendiert und erneut bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 8700 rpm zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die Zellkernproteine, das verbleibende Zellpellet (Cytoskelettale Proteine, Matrixproteine) wurde verworfen<sup>118</sup>.

### 3.4.3.3 Protein-Fraktionierung mittels ProteoPrep™ Universal Extraction Kit

Die Probenaufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurden die Zellen wie beschrieben von den Zellkulturflaschen geschabt und in Extraktionslösung 1 aufgenommen. Die leicht löslichen cytosolischen Proteine wurden zunächst durch 2fache Extraktion mit Extraktionslösung 1 isoliert, vereint und getrocknet (*speed vac*). Die Proteine der Membranfraktion wurden dann mit Extraktionslösung 2 aus dem Zellpellet gelöst und ebenfalls getrocknet. Anschließend wurden beide Proben reduziert und alkyliert, bevor sie zur Isoelektrischen Fokussierung eingesetzt werden konnten (Sigma, Deisenhofen).

### 3.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt des extrahierten Proteinlysates wurde photometrisch nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Mit Hilfe von Standardproben bekannter BSA-Konzentration wurde eine Eichgerade ermittelt. Von den zu bestimmenden Proben wurden 25 µl nach entsprechender Verdünnung eingesetzt. Anschließend wurde 1,25 ml Bio-Rad-Reagenz zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm in einem Spektralphotometer. Die Proteinkonzentration wurde durch den Vergleich mit der BSA-Eichgeraden ermittelt.

### 3.4.5 Erste Dimension

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist der erste Schritt bei der zweidimensionalen Trennung der Proteine und wurde mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) nach der Methode von Görg *et al.*<sup>113</sup> durchgeführt. Der immobilisierte pH-Gradient kann durch Kopolymerisation der *Immobiline*<sup>®</sup> (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit den Acrylamidmonomeren erreicht werden. Die Polymerisationslösungen entsprachen dem Anfangs- bzw. Endpunkt des pH-Gradienten (pH 4, pH 9 bei den selbstgegossenen Gelen bzw. pH 3, pH 10 bei den gekauften Streifen) und wurden in einem Gradientenmischer gemischt. Das Gradientengel wurde auf einen GelbondPAGfilm aufpolymerisiert.

#### 3.4.5.1 Rehydratisierung der IPG-Streifen

Vor der IEF mussten die 18 cm langen IPG-Streifen (pH 3-10 bzw. pH 4-9) rehydratisiert werden. Hierzu wurden die Streifen mit jeweils 340 µl Rehydratationspuffer im *Reswelling Tray* über Nacht inkubiert. Die Streifen wurden zunächst mit dem positiven Ende zur Anode hin luftblasenfrei in die Streifenhalter

gelegt und mit 5 ml Silikonöl überschichtet. Die Proteinproben wurden über das *Cup loading* Verfahren unter Spannung in die Streifen eingequollen. Bis zu 100 µl Probevolumen konnte pro Streifen eingesetzt werden<sup>113</sup>.

### 3.4.5.2 Laufbedingungen der IEF

Die isoelektrische Fokussierung wurde bei 20°C durchgeführt, die Stromstärke wurde während der Fokussierung konstant gehalten und betrug 50 µA pro IPG-Streifen. Die Spannung wurde schrittweise erhöht:

Spannung [V]	Spannungsgradienttyp	Zeit [h:m]	Zeit [Vh]
500	Gradient	0:01	
4 000	Gradient	1:30	
8 000	Step-n-hold		32 000

Schwankungen in der Leitfähigkeit des Rehydratationspuffers bewirkten, dass zeitweise nicht die Spannung von 8 000 V erreicht werden konnte. Damit die Fokussierung dennoch vollständig verlief, war es wichtig, den letzten Schritt über die Voltstunden zu definieren.

Die IPG-Streifen konnten nach der Fokussierung bis zur Trennung in der 2. Dimension bei –80°C aufbewahrt werden.

### 3.4.6 Zweite Dimension

Die 12,5 % SDS-Gele wurden wie unter 3.4.2 beschrieben gegossen<sup>113</sup>. Zunächst wurde der 1 x SDS-Elektrophoresepuffer in die Ettan Dalt II Kammer gefüllt und 1 h auf 20 °C temperiert. In dieser Zeit wurden die fokussierten Proteine mit SDS beladen. Dazu wurden die IPG-Streifen 15 min im Equilibrierungspuffer 1 und anschließend 15 min im Equilibrierungspuffer 2 auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die IPG-Streifen mit *A. bidest* gespült und jeweils ein Streifen auf eine SDS-Geloberfläche gebracht und mit 2 ml heißer Agaroselösung fixiert. Nach dem Plazieren der Gelkassetten in die Elektrophoresekammer, wurde die SDS-PAGE unter folgenden Laufbedingungen gestartet:

Für 12 Gele

Stromstärke [mA]	Zeit [h]
45	1
145	17

Der Lauf wurde gestoppt, sobald die Lauffront (Bromphenolblau) 0,5 cm vor dem unteren Ende des Gels angelangt war.

### 3.4.7 Färbungen

#### 3.4.7.1 Coomassie-Färbung (kolloidal)

Die Coomassie-Färbung basiert auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie-Blue G250 an alle Proteine. Die Proteine wurden zur Färbung im Gel zunächst fixiert. Die Gele wurden anschließend mit der Färbelösung imprägniert. Der nicht gebundene Farbstoff wurde durch Waschen des Gels mit *A. bidest* entfernt.

Fixierung:	40 % Ethanol, 10% HAc,	mindestens 6h
Färbung:	10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 25 % Methanol 5 % Coomassie	über Nacht
Entfärbung:	<i>A. bidest</i>	bis Hintergrund entfärbt

#### 3.4.7.2 Silber-Färbung

##### 3.4.7.2.1 Silberfärbung in Anlehnung an Blum

Die Silber-Färbung ist 10-100 fach sensitiver als die Coomassie-Färbung und wurde daher eingesetzt, um Proteine zu detektieren, die nur in sehr geringer Menge in den Zellen exprimiert wurden. Die verwendete Silberfärbung basierte auf der von Blum entwickelten Methode<sup>119</sup>:

	Reagenzien	Dauer
Fixierung:	10 % Eisessig 40 % Ethanol	Über Nacht
Waschlösung 1:	30 % Ethanol	2 x 20 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	20 min
Sensibilisierung:	0,02 % Natriumthiosulfat (wasserfrei)	1 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	3 x 20 sec
Färben:	0,2 % Silbernitrat 200 µl Formaldehyd	20 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	3 x 20 sec
Entwickeln:	3 % Natriumcarbonat 500 µl Formaldehyd 1 Kristall Natriumthiosulfat	4 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	2 x 5 min
Stoppen:	0,5 % Glycerin	10 min

### 3.4.7.2.2 Silberfärbung für die Massenspektrometrie: (Amersham Biosciences)

Damit die Silberfärbung auch mit der MALDI-TOF-MS Analyse kompatibel war, mussten in der Färbemethode Veränderungen vorgenommen werden. Zum einen wurde der Sensibilisierungslösung kein Glutardialdehyd zugesetzt, um die Modifizierung der Proteine zu vermeiden, zum anderen wurde ausschließlich in der Entwicklungslösung und nicht bereits in der Färbelösung Formaldehyd zugesetzt.

	Reagenzien	Dauer
Fixierung:	10 % Eisessig 40 % Ethanol	2 x 15 min
Sensibilisierung:	75 ml Ethanol 10 ml Natriumthiosulfat (5 %) 17 g Natriumacetat	30 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	3 x 5 min
Färben:	25 ml Silbernitrat (2,5 %)	20 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	2 x 1 min
Entwickeln:	6,25 g Na-carbonat 100 µl Formaldehyd	4 min
Stoppen:	3,65 g EDTA	10 min
Waschen:	<i>A. bidest</i>	2 x 5 min

## 3.5 Software gestützte Auswertung der 2-DE-Gele

### 3.5.1 ImageMaster (Amersham Biosciences, Freiburg)

Bevor die gefärbten Gele mit Hilfe des ImageScanner (Amersham Biosciences) eingescannt wurden, musste der Scanner kalibriert werden. Die Gelanalyse erfolgte mit dem Auswerteprogramm ImageMaster von Amersham Biosciences. Alle Spots, die mindestens ein Volumen von 60 Einheiten aufwiesen, deren Fläche größer 40 Einheiten betrug und die eine Zirkularität von 0,5 hatten, wurden durch die Software detektiert. Um Unterschiede in der Gelfärbung auszugleichen, wurden die Spotvolumina normalisiert. Nach der Spottedetektion wurde der Proteinmustervergleich durchgeführt. Zunächst wurde ein Gel als Referenzgel definiert, das mit allen anderen Gelen eines Versuches verglichen wurde. Der Mustervergleich lief zunächst nach Vorgabe einiger Parameter (Vektor Box Größe, Such Box Größe) automatisch ab, im Anschluss wurde jedoch eine manuelle Kontrolle der zugeordneten Spots durchgeführt, um Fehlzuordnungen auszubessern. Anschließend erfolgte die Bildung von Durchschnittsgelen aus mindestens 4 Gelen der gleichen Behandlungsgruppe. Die Durchschnittsgele wurden dann miteinander verglichen, wobei immer der Vergleich der behandelten Probe zur jeweiligen Kontrolle erfolgte. Die Spots, die sich

um mindestens den Faktor 2 in ihren Volumina voneinander unterschieden, wurden als reguliert betrachtet.

### 3.5.2 ProteomeWeaver (Definiens, München)

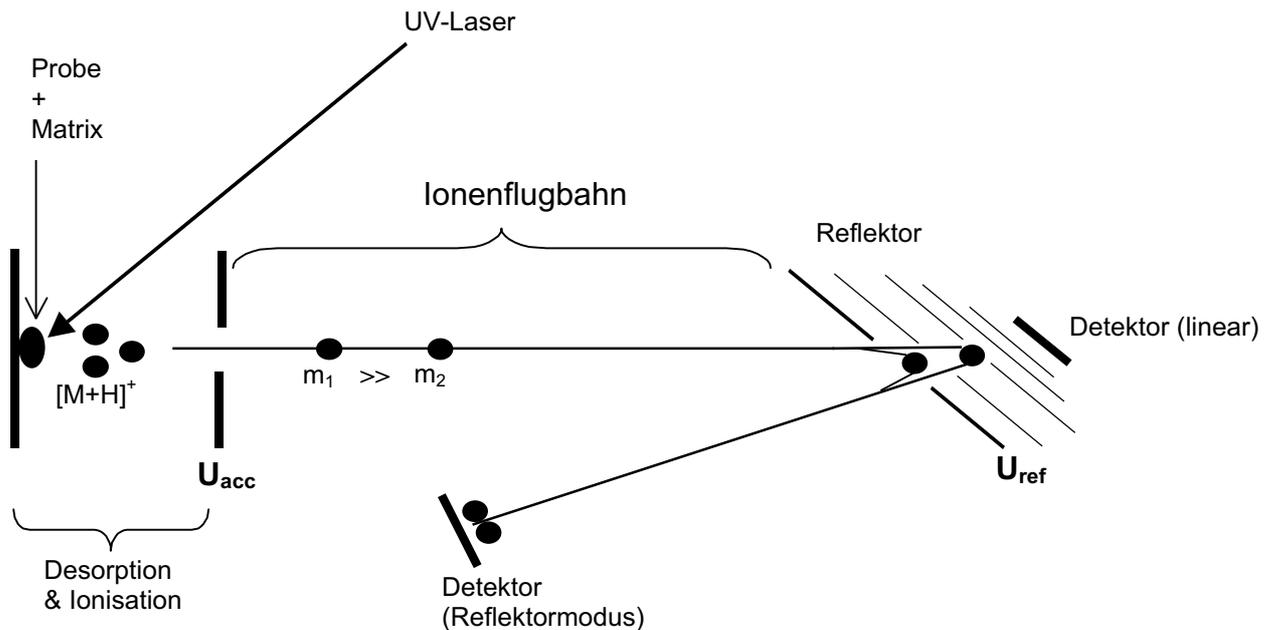
Die Spottedetektion erfolgte bei dieser Software vollautomatisch, wobei gleichzeitig eine Normalisierung der Spotvolumina und die Subtraktion des Hintergrundes durchgeführt wurde. Die Auswahlkriterien zur Spotererkennung waren eine Fläche von 128 Einheiten, ein Radiuslimit von 4 und ein Intensitätsminimum von 0,5 Einheiten. Alle Größen sind Software-spezifische Einheiten. Im Gegensatz zur Analyse mittels ImageMaster Analyse wird bei der Analyse mittels ProteomeWeaver kein Referenzgel gebildet, so dass die Gele direkt untereinander verglichen werden. Der Gelvergleich kann entweder Gruppenweise oder mit Einzelgelen erfolgen. Um zu entscheiden, ob eine signifikante Spotänderung bei einem Protein zwischen zwei Gruppen stattgefunden hat, wurden die Durchschnittswerte der Einzelgele einer Gruppe herangezogen und ein T-Test durchgeführt.

## 3.6 Massenspektrometrie

Trotz der Fortschritte in Sensitivität und Automatisierung der Protein Microsequenzierung nach Edman, ist diese Methode sehr aufwändig und erfordert isolierte und reine Proteine und Peptide. Die Mengen der meisten Proteine, die in einem Gel vorkommen, entsprechen meist nur wenigen Nanogramm oder weniger, d.h. Mengen, die für die Edmann-Sequenzierung nicht ausreichend sind. Folglich mussten neue Methoden zur Identifizierung der durch 2-DE aufgetrennten Proteine entwickelt werden. Die neue Ionisationstechnik in der Massenspektrometrie, die in den späten 80er Jahren entwickelt wurde, ermöglichte erstmals die Analyse von Peptiden und Proteinen. In den letzten Jahren setzte sich die Massenspektrometrie zur Identifizierung der Proteine in der Proteomanalyse durch.

### 3.6.1 Funktionsprinzip

Massenspektrometer bestehen aus 3 essentiellen Funktionsteilen (Abb. 6). Zunächst einer Ionenquelle, die die Moleküle in Gasphasenionen umwandelt. Sind die Ionen gebildet, werden die individuellen Masse/Ladungs Verhältnisse im Massenanalysator getrennt und zum Ionendetektor überführt.



**Abbildung 6: Funktionsweise des MALDI-TOF-Massenspektrometers.**  
Erläuterungen im Text.

Die von Karas und Hillenkamp 1988 weiterentwickelte *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) Massenspektrometrie erlaubte die leichte Ionisierung von Proteinen und Kohlenhydraten. 1970 wurde erstmals Laserlicht als Ionisationsmethode für die Massenspektrometrie eingesetzt. Der Durchbruch der Methode kam, als kleine UV-absorbierende Moleküle (Matrix) als Vehikel für die generierten Ionen eingesetzt wurden<sup>120</sup>. Der Analyt kokristallisiert so mit den Matrixmolekülen und formt einen Matrix/Analyten Kristall. Dieser Kristall absorbiert Licht von der Wellenlänge des Lasers und auf diese Weise werden Ionen gebildet. Laserschüsse auf die Kristalle bewirken durch die Energieübertragung eine schnelle Erhitzung des Kristalls, da die Moleküle die Energie in Form von Hitze absorbieren. Dadurch sublimiert der Matrixkristall. Durch MALDI werden primär einzelgeladene Ionen gebildet  $[M+H]^+$   $[M-H]^-$ .

Zur Analyse der Massen wird bei einem MALDI zumeist ein *time of flight* (TOF) Massenanalysator eingesetzt. Die Masse/Ladungs-Verhältnisse werden bestimmt, indem die Zeit gemessen wird, die ein Ion braucht, um durch ein feldfreies Rohr zu fliegen. Bei konstanter Spannung haben alle Ionen die gleiche kinetische Energie und die Flugzeit ist abhängig vom Masse/Ladungsverhältnis eines speziellen Ions. Ein Detektor am Ende des Flugrohres gibt ein Signal für jedes einzelne Ion, das ankommt. Zusätzlich gibt es heute noch einen Ionenreflektor und eine *delay-Extraktion*<sup>121</sup>, die gemeinsam eine isotopische Auftrennung der Peptide ( $R > 10\,000$ )

FWHM) und eine sehr hohe Massengenauigkeit (<10 ppm) erlauben. Der Reflektor ist eine Art Ionenspiegel und verlängert das Flugrohr. Am wichtigsten ist hierbei, dass der Reflektor kleine Unterschiede in der kinetischen Energie der Ionen ausgleicht, die das gleiche Masse/Ladungsverhältnis haben und somit eine Schärfung der Massepeaks ermöglicht.

Durch MALDI-TOF Massenspektrometer können mit hoher Sensitivität und beträchtlicher Geschwindigkeit Massenspektren von Peptidgemischen mit hoher Trennschärfe erreicht werden.

### 3.6.2 Probenaufarbeitung zur massenspektrometrischen Analyse

#### 3.6.2.1 Trypsinverdau im Gel

Die Proteinspots wurden mit Hilfe einer sterilen Hautstanze ( $\varnothing$  2 bzw 3 mm) aus dem Gel gepickt und in 200  $\mu$ l Eppendorfgefäße überführt. Um die Coomassiefärbung aus den Gelbanden zu entfernen, wurden die Spots abwechselnd je 15 min mit Acetonitril und anschließend mit 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung gewaschen. Jeder Spot wurde insgesamt 3 mal mit Acetonitril und 2 mal mit Bicarbonat inkubiert, bevor die Gelbanden in der Vakuumzentrifuge getrocknet wurden. Nach dem Trocknen wurden die Spots für 1 h bei 4°C mit Trypsin (0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l in 1 mM HCl) inkubiert. Das überschüssige Trypsin wurde abgesaugt und der Spot zweifach mit *A. bidest* gewaschen. Für den In-Gel-Verdau wurde soviel Bicarbonatlösung (50 mM) zugegeben, dass das Gel vollständig bedeckt war und für 16-20 h bei 37°C im PCR-Personal Cycler inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Bicarbonat verworfen. Die Peptidelution aus dem Gel erfolgte durch Zusatz von 5  $\mu$ l 0,1% TFA/ACN (2:3) ebenfalls bei 37°C für zunächst 6h. Der Überstand wurde in ein neues 200  $\mu$ l Eppendorfgefäß überführt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -4°C aufbewahrt. Der Proteinspot wurde erneut über Nacht mit 5  $\mu$ l 0,1 % TFA/ACN (2:3) bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 200 $\mu$ l Eppendorfgefäß überführt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur MALDI-TOF-MS Analyse der tryptischen Fragmente wurden beide Fraktionen vereint.

#### 3.6.2.2 Probenauftrag zur MALDI-TOF-MS Analyse

Die Peptidfragmente wurden in 5  $\mu$ l 1% TFA-Lösung aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad inkubiert, um die Peptide möglichst vollständig zu lösen. Die Proben wurden zur Analyse auf ein „Anchor-Chip-Target“ 400 (Bruker Daltonics, Leipzig) appliziert. Die Applikation erfolgte in Anlehnung an die Methode von Gobom *et al.*<sup>122</sup>.

Dazu wurde zunächst eine gesättigte Lösung von Hydroxy-cyano-zimtsäure (HCCA) in Aceton : 0,1% TFA (97:3) hergestellt. 1 µl der Matrix wurde auf das *Anchortarget* appliziert und sofort wieder entfernt. Dann wurde 1 µl der Probe auf die Matrix gegeben und für 3 min trocknen gelassen. Um störende Salze zu entfernen, wurde 1 µl 0,1 % TFA zugefügt und anschließend zusammen mit der überschüssigen Probe entfernt. Zur Umkristallisierung wurde 1 µl Rekristallisationslösung ( 0,1 g/l HCCA in Ethanol : Aceton : 0,1% TFA, 6:3:1) appliziert und trocknen gelassen.

Zur Eichung des MALDI-TOF-Massenspektrometers wurde 1 µl Peptidstandardmix (Bruker Daltonics, Leipzig) für jeweils 8 Probenmessungen gemessen.

### **3.7 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die HT-29 Zellen zunächst auf 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und bei 60 % Konfluenz mit 150 µM Flavon für 24 h inkubiert. Die RNA wurde durch die Phenol-Chloroform Extraktion nach Chomczynski und Sacchi durchgeführt<sup>123</sup>. Die HT-29 Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben trypsinisiert und für 5 min bei 2 000 rpm pelletiert. Pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurde 1 ml der RNA-Wiz-Lösung (RNA-Isolierreagenz, Ambion) zur Zelllyse eingesetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde 200 µl Chloroform zugesetzt und 20 sec stark geschüttelt. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT wurde das Lysat für 15 min bei 11 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl DEPC Wasser (siehe Anhang 8.1.7) versetzt und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde 1 ml Isopropanol zugesetzt und die Probe nochmals vorsichtig durchmischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte erneut eine Zentrifugation für 15 min bei 11 000 rpm und 4 °C. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet. Die Gesamt-RNA wurde in 30 µl DEPC Wasser aufgenommen und konnte so zur DNA-Array Analyse eingesetzt werden.

#### **3.7.1 Überprüfung der Qualität der Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese**

Die Qualität der Gesamt-RNA wurde durch Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 %igen Agarosegel geprüft. Bei guter Präparation liegt das Verhältnis der 18S- und 28S-rRNA-Untereinheiten bei 2:1.

10 µg der Gesamt-RNA wurde mit dem dreifachen Volumen Ladungspuffer (siehe Anhang 8.1.7) gemischt und bei 75 °C für 5 min denaturiert. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese in MOPS-Puffer (siehe Anhang

8.1.7) bei  $0,5 \text{ V/cm}^2$  aufgetrennt. Die Banden wurden durch Ethidiumbromid, das in dem Ladungspuffer enthalten war, auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht.

### 3.7.2 DNA-Array

Die DNA-Array Analyse wurde mit Hilfe des Pan<sup>®</sup> Human 10k Oligonucleotide Array (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Auf den Array waren 9850 Sequenzen humaner Gene gespottet. Die Probensynthese der cDNAs und die Arrayhybridisierung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus Kontrolle und Flavon-behandelten Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten gemischt und mit DNase behandelt, um sie von genomischer DNA zu befreien. Um Fluoreszenz-markierte Einzelstrang-DNA zu erhalten, wurde eine reverse Transcription mit oligo dT Primern in Anwesenheit von Cy3-oder Cy5 markierten dCTP durchgeführt. Die markierten Produkte wurden mittels QIAquick PCR purification system (Qiagen, Hilden) getrennt. Die Hybridisierung fand in einem Wasserbad bei  $42 \text{ °C}$  für 39 h statt. Die Arrays wurden bei Raumtemperatur mit  $2x \text{ SSC}/0,1 \text{ \% SDS}$ ,  $1x\text{SSC}$  und  $0,1x\text{SSC}$  gewaschen und mit dem Affymetrix 428<sup>TM</sup> Array Scanner (Affymetrix, Bedford, USA) eingescannt. Vor der Analyse der Bilder durch ImaGene<sup>TM</sup> 4.2 Software (BioDiscovery, Inc., Tucson, USA) wurden die Bilder auf mögliche Fehlspots untersucht. Drei unabhängige Hybridisierungen wurden durchgeführt. Gene wurden als reguliert betrachtet, wenn die Veränderung mindestens den Faktor 2 betrug und in mindestens 2 Hybridisierungen auftrat.

## 4 Ergebnisse

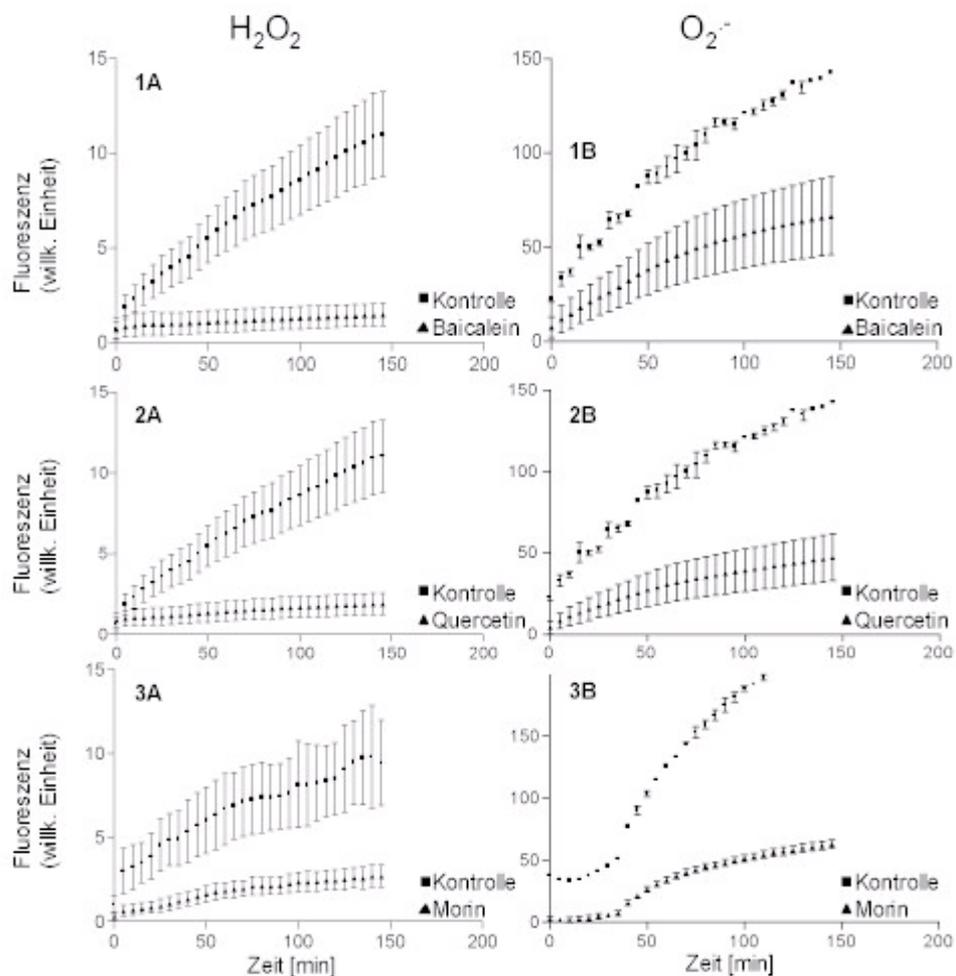
### 4.1 Vergleichende Analyse der antioxidativen Wirkung von Flavonoiden

Die biologischen Wirkungen der Flavonoide werden primär ihren antioxidativen Eigenschaften zugeschrieben. Um zu prüfen, inwieweit sich ihre Effekte auf das Proteom mit ihrem antioxidativen Potential in Bezug bringen lassen, wurden 27 verschiedene Flavonoide auf ihre antioxidative Wirkung in HT-29 und NCOL-1 Zellen nach Mayer *et al.*<sup>124</sup> untersucht. Die antioxidative Aktivität wurde zum einen gegenüber Superoxidradikalanionen die durch Camptothecin generiert wurden, bestimmt, zum anderen wurde die Fähigkeit geprüft, Wasserstoffperoxid, das in den Zellen durch tertiäres Butylperoxid freigesetzt wurde, zu reduzieren. Die Zellen wurden dazu -wie in 3.2.1 und 3.3.2 beschrieben- mit den spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen für Superoxidradikalanion oder Wasserstoffperoxid beladen. Dann wurde die Wirkung der Flavonoide in einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die Auswertung erfolgte über den Vergleich der Steilheit der Messkurven, die über einen Zeitraum von 150 min ermittelt wurden.

#### 4.1.1 Antioxidative Wirkung der Flavonoide in HT-29 Zellen

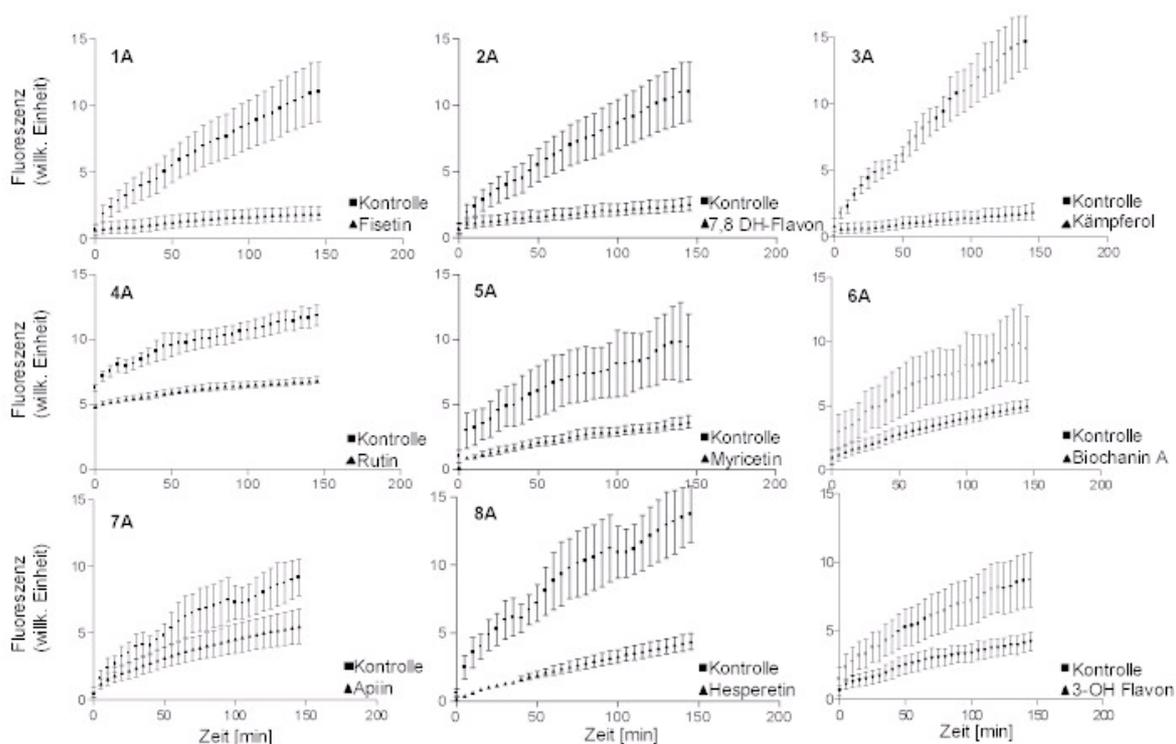
Die Flavonoide Baicalein, Quercetin und Morin zeigten eine starke antioxidative Wirkung in HT-29 Zellen. Sie konnten die durch Wasserstoffperoxid bedingte Fluoreszenz nahezu vollständig reduzieren, wie in Abbildung 7 1A-3A dargestellt. Die durch Superoxidradikalanionen induzierte Fluoreszenz des Proxylfluorescamins wurde durch alle 3 Flavonoide auf ein Drittel des Kontrollwertes reduziert, wie in Abbildung 7 1B-3B gezeigt ist.

Abbildung 8 zeigt die Effekte von 9 Flavonoiden, die in der Lage waren, die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelte Fluoreszenz von  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  zu reduzieren. 7 dieser Flavonoide zeigten dagegen keinerlei Wirkung auf die Konzentration der Superoxidradikalanionen. Kämpferol und Myricetin bewirkten hier sogar eine Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies um 120 % bzw. 175 % gegenüber der Kontrolle (nicht gezeigt). Fisetin (1A), 7,8 Dihydroxyflavon (2A) und Kämpferol (3A) konnten die Wasserstoffperoxid Konzentration nahezu vollständig auf Kontrollwerte reduzieren. Rutin (4A), Myricetin (5A), Biochanin A (6A) Apiin (7A), Hesperetin (8A) und 3-Hydroxyflavon (9A) ließen die Konzentration auf ca. die Hälfte des Kontrollwertes absinken.



**Abbildung 7: Antioxidative Wirkung der Flavonoide Baicalein, Quercetin und Morin in HT-29 Zellen bei einer Konzentration von 150 µM.**

(A) Verminderung der Wasserstoffperoxid-Konzentration ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). (B) Verminderung der Superoxidradikalanionen-Konzentration ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Maß für die antioxidative Kapazität der Flavonoide ist die Abnahme der Steilheit der Messkurve. (Prozentuale Abnahme, siehe Tabelle 5)



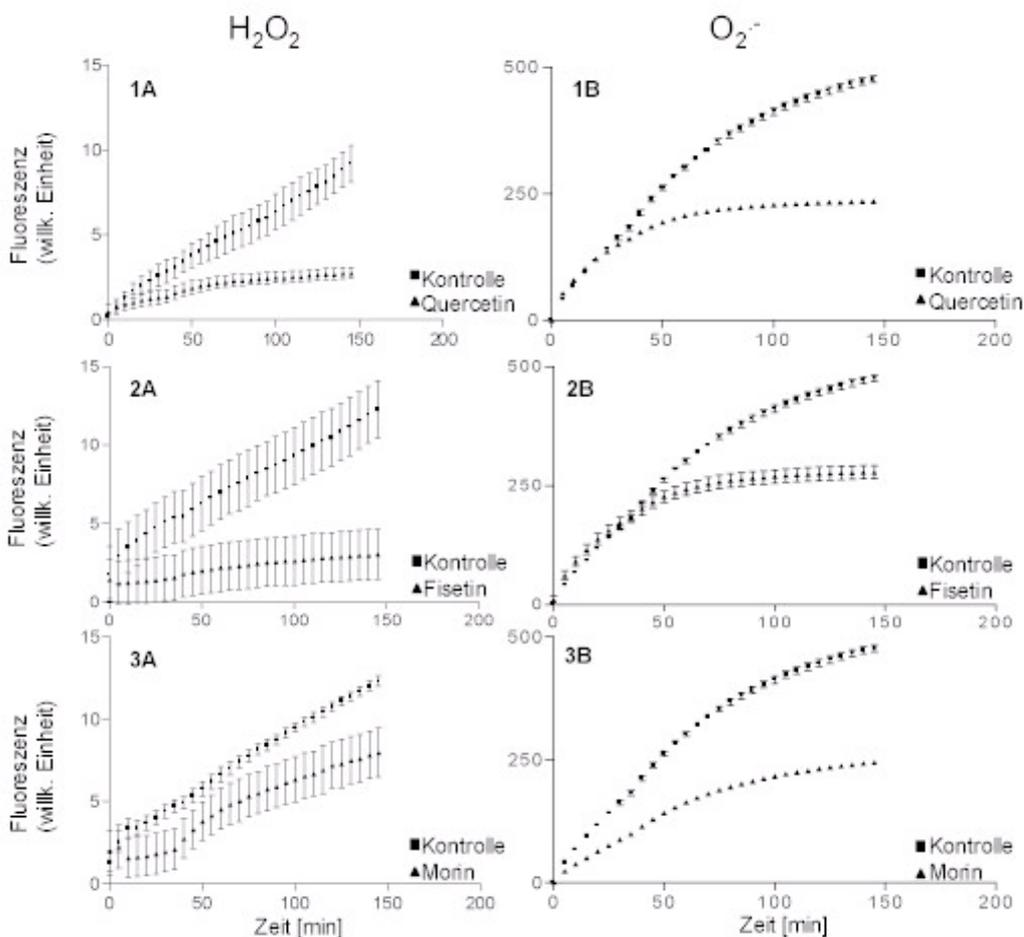
**Abbildung 8: Flavonoide, die bei einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  in HT-29 Zellen die Wasserstoffperoxid-Konzentration vermindern.**  
(Prozentuale Abnahme, siehe Tabelle 5)

12 weitere Flavonoide zeigten in HT-29 Zellen keine antioxidative Wirkung (Acacetin, Bavachanin A, Chrysin, Didymin, Diosmetin, Flavon, 5-Hydroxyflavon, 7-Hydroxyflavon, Genistein, Hesperidin, Naringenin, Tangeritin).

In Gegenwart von Apigenin, Daidzein und Diosmin konnte in HT-29 Zellen sogar ein Anstieg der Wasserstoffperoxid-Konzentration beobachtet werden (nicht gezeigt).

#### 4.1.2 Antioxidative Wirkung der Flavonoide in NCOL-1 Zellen

Die gleichen 27 Flavonoide wurden auch in nicht transformierten NCOL-1 Zellen auf ihre antioxidative Wirkung untersucht. Abbildung 9 zeigt, dass die Flavonoide Quercetin, Fisetin und Morin sowohl in der Lage waren Wasserstoffperoxid als auch Superoxidradikalanionen zu reduzieren. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration konnte durch diese 3 Flavonoide auf 20 % der Kontrollkonzentration reduziert werden (Abb. 9, 1A-3A), während die Konzentration der Superoxidradikalanionen um die Hälfte verringert wurde (Abb. 9, 1B-3B).



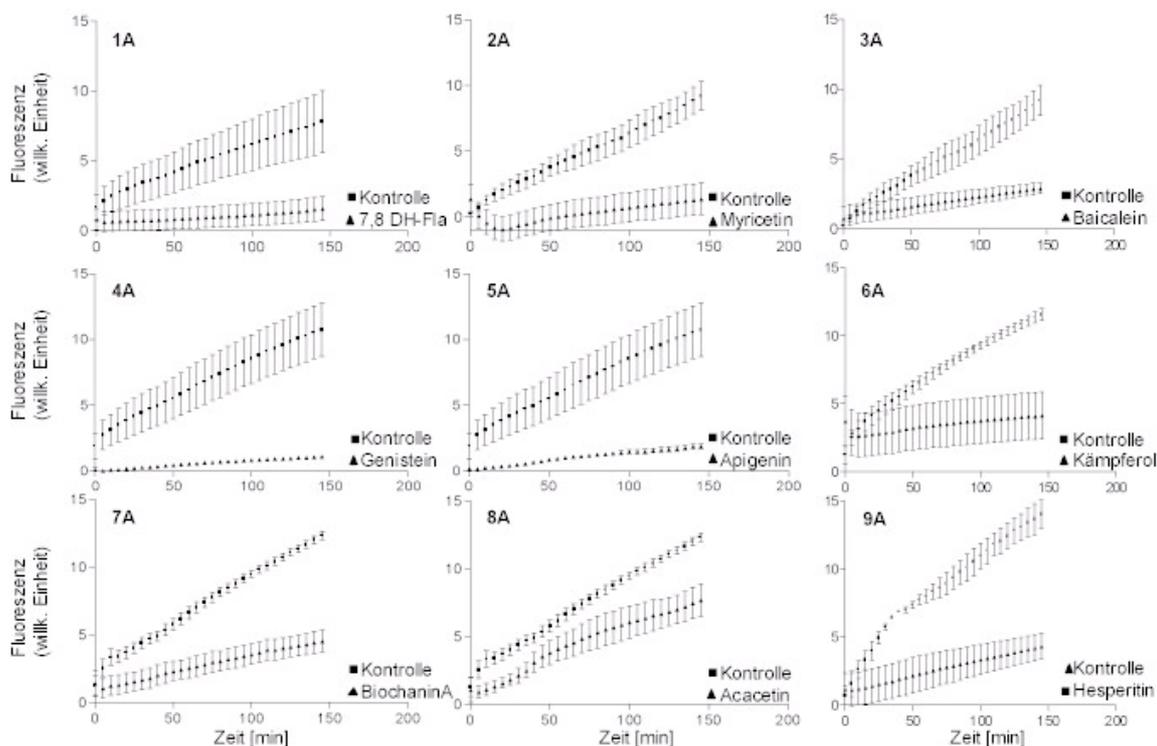
**Abbildung 9: Antioxidative Wirkung der Flavonoide Quercetin, Fisetin und Morin in NCOL-1 Zellen bei einer Konzentration von 150 µM.**

(A) Verminderung der Wasserstoffperoxid-Konzentration ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). (B) Verminderung der Superoxidradikalanionen-Konzentration ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). (Prozentuale Abnahme, siehe Tabelle 5)

Wie schon in HT-29 Zellen beobachtet, gab es auch in NCOL-1 Zellen eine Reihe von Flavonoiden, die ausschließlich in der Lage waren, die Wasserstoffperoxid-Konzentration in den Zellen zu verringern (Abb. 10, 1A-9A). Acacetin (8A) hatte den geringsten Effekt, da es die Konzentration des Wasserstoffperoxids nur auf 60 % zu reduzieren vermochte. Kämpferol, Baicalein, Hesperetin und Biochanin A verminderten die ROS-Konzentration auf ca. 30 % ihres Ausgangswertes, während Myricetin, 7,8 Dihydroxyflavon und Genistein sie um 80-90 % verminderten (siehe Abbildung 10).

Es wurden in Analogie zu den HT-29 Zellen keine Flavonoide gefunden, die spezifisch nur die Konzentration von Superoxidradikalanionen zu reduzieren vermochten. 9 der getesteten Flavonoide (Flavon, 3-Hydroxyflavon, 5-Hydroxyflavon,

7-Hydroxyflavon, Chrysin, Tangeritin, Bavachanin A, Didymin, Rutin) zeigten in NCOL-1 Zellen keine antioxidative Wirkung. Die Inkubation mit Apiin, Diosmin, Hesperidin, Naringenin und Daidzein führte in NCOL-1 Zellen zu einem Anstieg der Wasserstoffperoxidkonzentration (nicht gezeigt).



**Abbildung 10: Flavonoide, die bei einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  in NCOL-1 Zellen die Wasserstoffperoxid-Konzentration vermindern.**  
(Prozentuale Abnahme, siehe Tabelle 5)

Ziel der folgenden Untersuchungen zur Apoptose in transformierten und nicht transformierten Kolonozyten war es, die Wirkungen eines stark antioxidativen Flavonoids mit einem ohne antioxidativem Potential zu vergleichen. Da Quercetin, ein Flavanol, in beiden Zelllinien sowohl die Konzentration von Wasserstoffperoxid als auch die Superoxidradikalanionen reduzieren konnte, wurde es neben Flavon, das keinen reduzierenden Effekt auf die ROS zeigte, für die nach folgend beschrieben vergleichenden Studien eingesetzt.

**Tabelle 5: Antioxidative Kapazität von 27 Flavonoiden gegenüber Wasserstoffperoxid und Superoxidradikalanion bei einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  in HT-29 und NCOL-1 Zellen.** Angegeben ist der prozentuale Anteil der Wasserstoffperoxid- bzw.

Superoxidradikalanionen-Konzentration bezogen auf die jeweiligen ROS-Konzentrationen, die in Abwesenheit eines Flavonoids in den Zellen gebildet wurde. Ein Querstrich bedeutet, dass kein Effekt zu beobachten war.

	HT-29		NCOL-1	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>Flavone</b>				
Flavon	-	-	-	-
5-Hydroxyflavon	-	-	-	-
7-Hydroxyflavon	-	-	-	-
7.8-Dihydroxyflavon	20 %	-	20 %	-
Acacetin	-	-	60 %	-
Chrysin	-	-	-	-
Diosmin	140 %	-	200 %	-
Apiin	60 %	-	-	-
Baicalein	10 %	50 %	30 %	-
Apigenin	120 %	-	15 %	-
Diosmetin	-	-	160 %	-
Tangeritin	-	-	-	-
<b>Flavonole</b>				
Quercetin	10 %	30 %	20 %	50 %
Kämpferol	10 %	120 %	40 %	-
Fisetin	20 %	-	20 %	50 %
Morin	25 %	25 %	30 %	50 %
Myricetin	40 %	175 %	20 %	-
3-Hydroxyflavon	50 %	-	-	-
<b>Flavanone/ ole</b>				
Bavachanin A	-	-	-	-
Didymin	-	-	-	-
Hesperidin	-	-	-	-
Hesperetin	40 %	-	30 %	-
Naringenin	-	-	200 %	-
<b>Isoflavonoide</b>				
Biochanin A	60 %	-	30 %	-
Daidzein	130 %	-	200 %	-
Genistein	-	-	10 %	-
Rutin	50 %	-	-	-

## **4.2 Wirkung von Flavon und Quercetin auf die Apoptose in HT-29-und NCOL-1 Zellen**

### **4.2.1 Bestimmung der Caspase-3-aktivität als Indikator der Apoptoseinduktion**

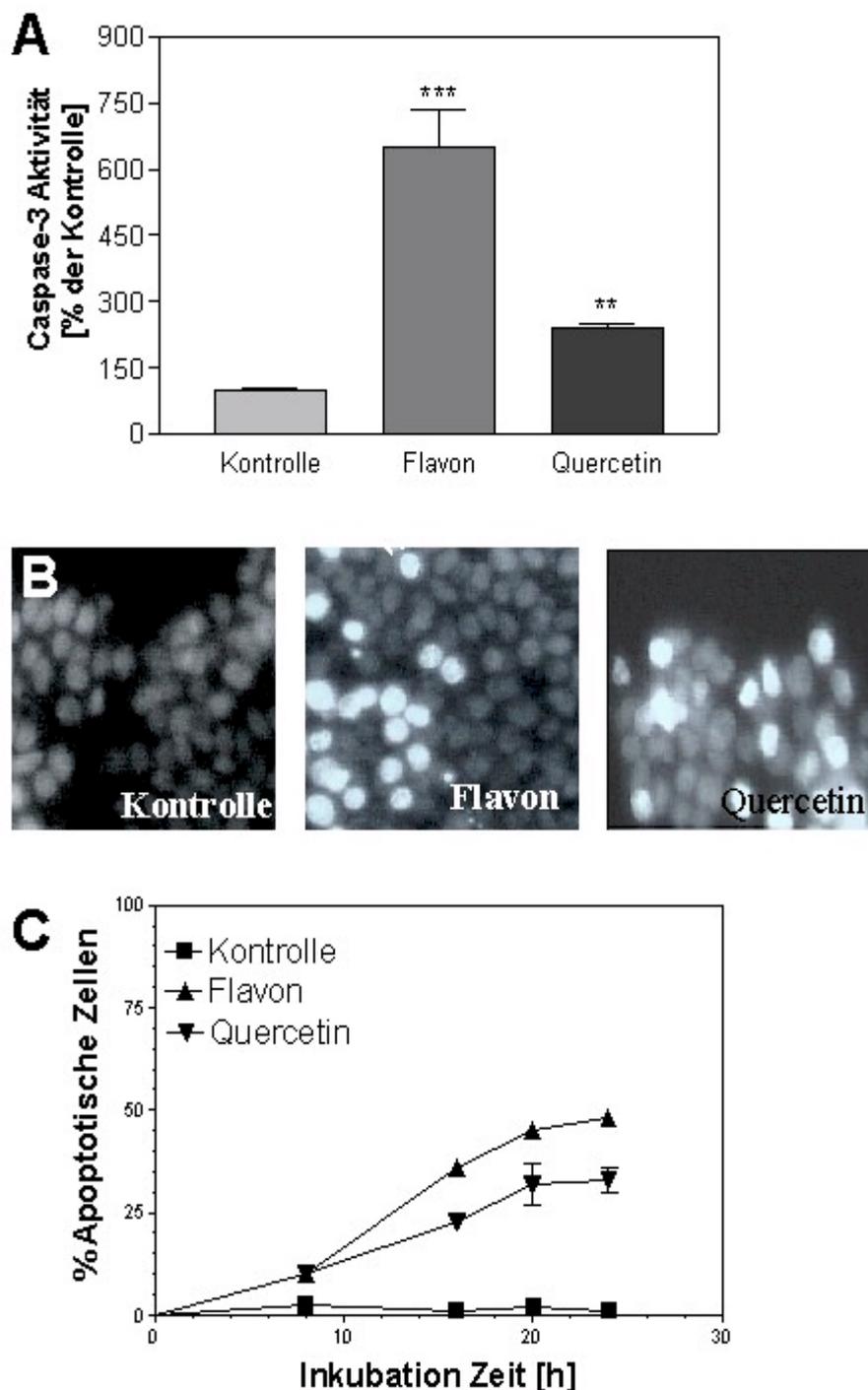
Die Aktivierung der intrazellulären Protease Caspase-3 (CPP32) dient als früher Indikator des Apoptosegeschehens und wurde nach 24 h Inkubation der Zellen mit 150  $\mu$ M Flavon bzw. 150  $\mu$ M Quercetin fluoreszenzoptisch gemessen. Frühere Messungen haben gezeigt, dass die durch Flavon vermittelte Caspase-3 Aktivierung nach 24 h am höchsten war. Während Flavon (Abb. 11 A) in HT-29 Zellen die Caspase-3-Aktivität 7-fach stimulierte, wurde nach 24 h Inkubation mit Quercetin (Abb. 11 A) eine 2-fache Steigerung der Caspase-3-Aktivität ermittelt.

In NCOL-1 Zellen hatte Flavon keinen Einfluss auf die Caspase-3 Aktivität (Abb. 12 A), jedoch konnte Quercetin in den nicht transformierten Zellen die Aktivität der Caspase sogar 6-fach erhöhen.

### **4.2.2 Membrandesintegration als früher Indikator der Apoptose in HT-29 und NCOL-1 Zellen**

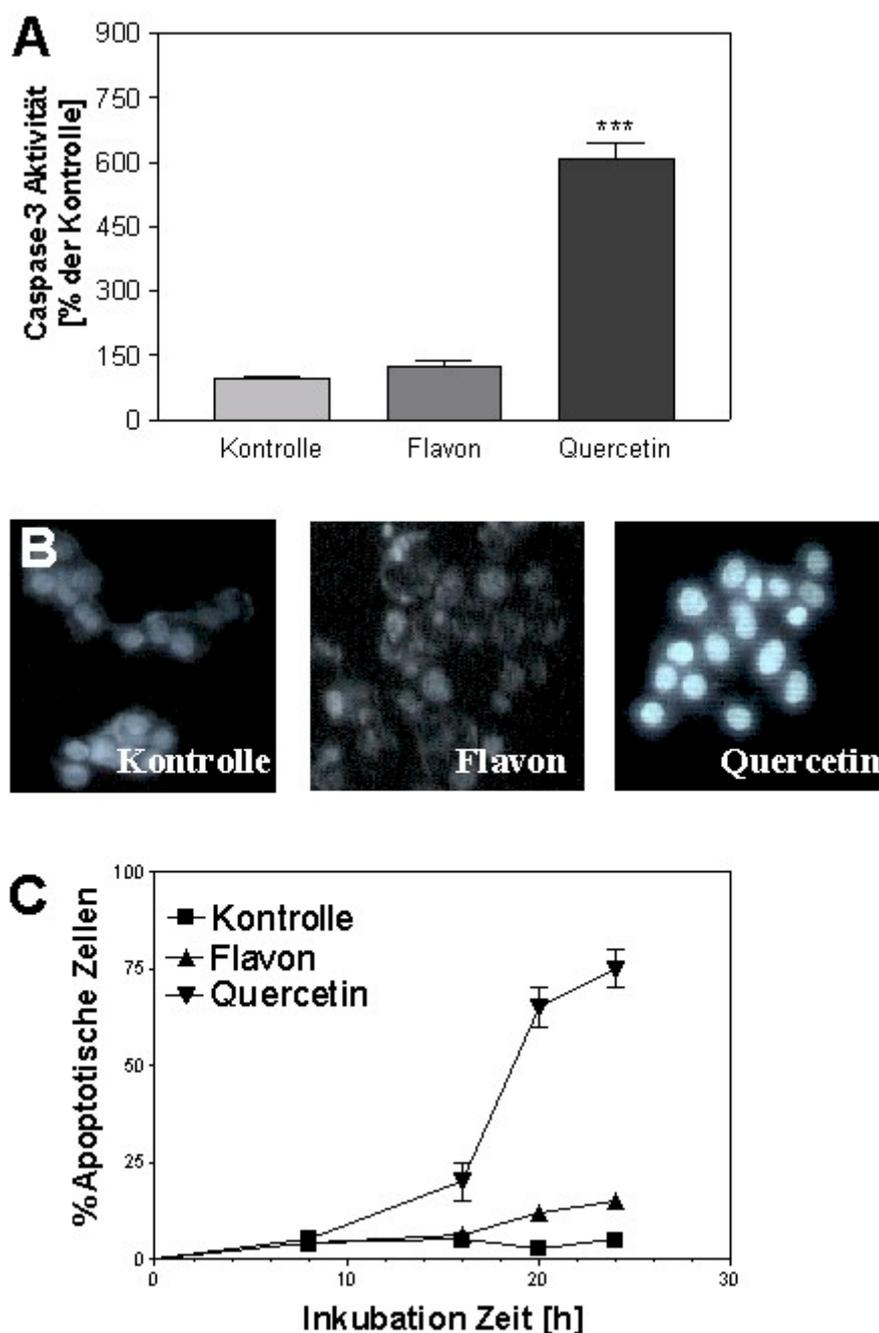
Ein weiterer Indikator einer frühen Apoptosephase ist die Membrandesintegration, die anhand der Aufnahme eines Fluoreszenzfarbstoffes (Hoechst 33342) beurteilt werden kann. In Abbildung 11 B sind die fluoreszierenden apoptotischen HT-29 Zellen nach 24 h Flavon- und Quercetinbehandlung zu erkennen. Nach Flavon-Exposition hatten ca. 50 % der HT-29 Zellen den Farbstoff aufgenommen, nach Quercetin-Gabe waren es ca. 35 %. In unbehandelten Zellen lässt sich nahezu keine Fluoreszenz nachweisen. Abb. 11 C zeigt den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mit den Flavonoiden.

In den NCOL-1 Zellen wurden nach 24 h Flavoninkubation <15 % apoptotische Zellen gefunden, während durch Quercetin bereits 75 % der Zellen im frühapoptotischen Stadium waren (Abbildung 12 B,C).



**Abbildung 11: Wirkung von Flavon und Quercetin auf das früh apoptotische Stadium der HT-29 Zellen.**

A) Flavon und Quercetin bewirken nach 24 h Inkubation eine signifikante Zunahme der Caspase-3 Aktivität. B) Flavon und Quercetin bewirken nach 24 h Inkubation eine Fluoreszenzfärbung der HT-29 Zellen, als Marker der Membrandesintegration der apoptotischen Zellen; die unbehandelten Zellen zeigen dagegen keine Fluoreszenz. C) Im Verlauf der 24 h Exposition mit Flavon und Quercetin ist eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen zu verzeichnen.

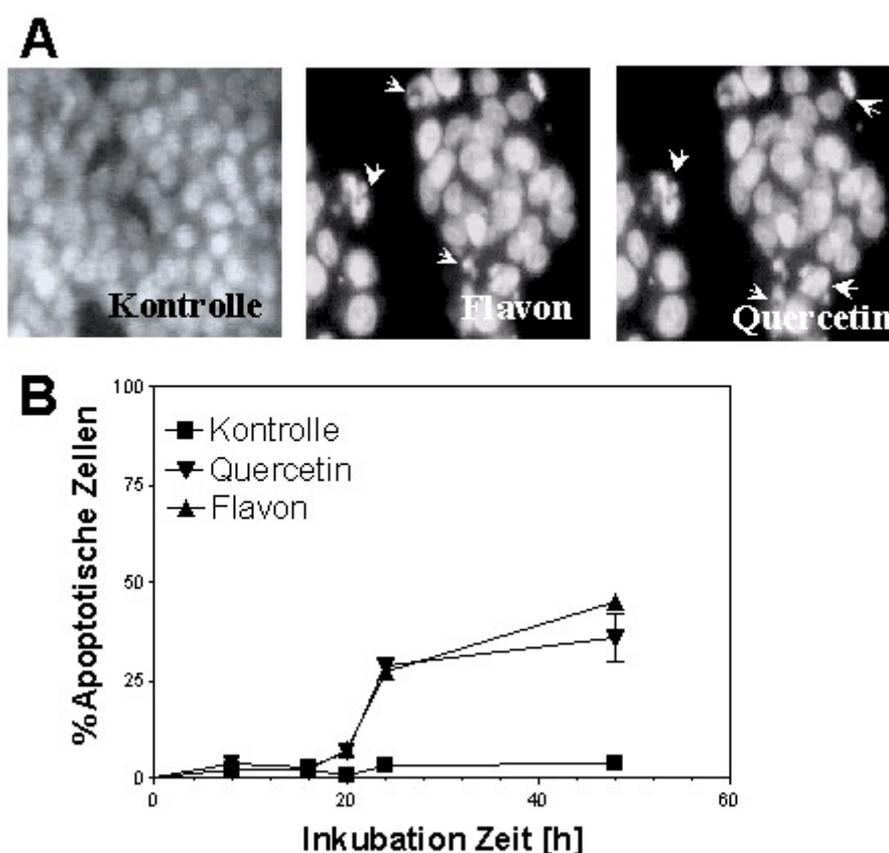


**Abbildung 12: Wirkung von Flavon und Quercetin auf das früh apoptotische Stadium der NCOL-1 Zellen.**

A) Nur Quercetin bewirkt nach 24 h eine signifikante Zunahme der Caspase-3 Aktivität, während Flavon die Aktivität nicht beeinflussen konnte. B) Nur Quercetin ruft eine Fluoreszenzfärbung der NCOL-1 Zellen hervor. C) Im Verlauf der 24 h Exposition mit Quercetin ist eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen zu verzeichnen, nicht aber durch Flavon.

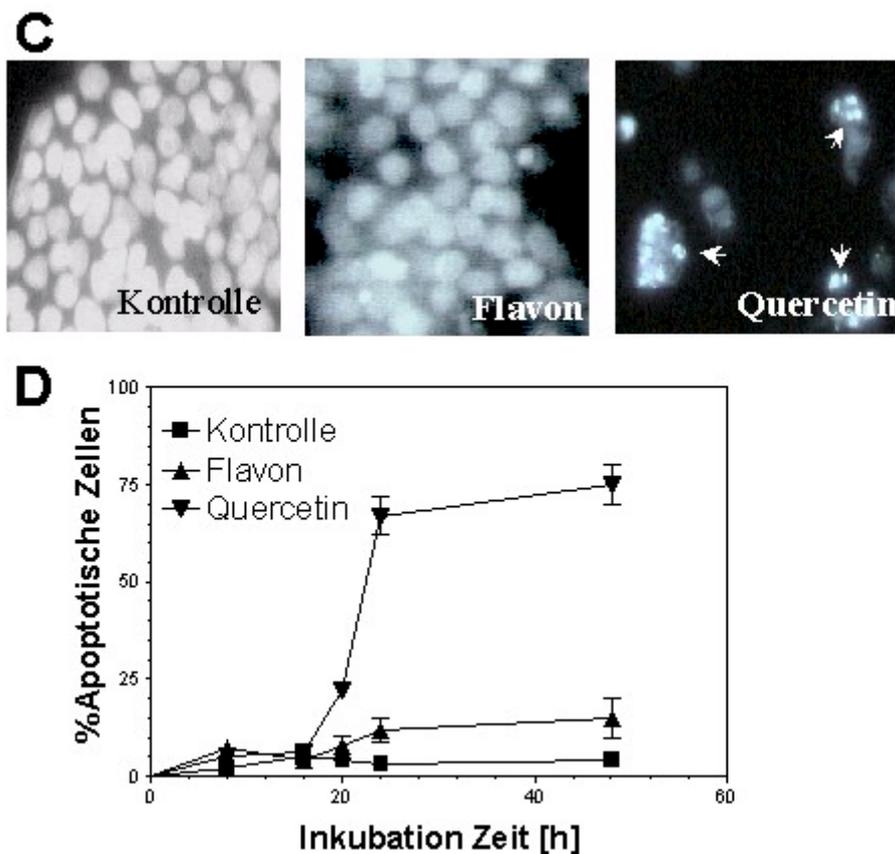
#### 4.2.3 DNA-Fragmentierung als später Indikator der Apoptose in HT-29 und NCOL-1 Zellen

Die DNA-Fragmentierung dient als Indikator des späten Apoptosegeschehens und konnte durch den Farbstoff Hoechst 33258 in den fixierten Zellen sichtbar gemacht werden. Die DNA-Fragmentierung nach 48 h Inkubation der Zellen mit Flavon bzw. Quercetin zeigt, dass die Apoptose in HT-29 Zellen nach ihrer Induktion bis zum Ende abläuft. Analog zu den Beobachtungen zum früh-apoptotischen Zeitpunkt, waren nach 48 h Flavonexposition ca. 50% der Zellen apoptotisch, nach Behandlung mit Quercetin ca. 35 % (siehe Abbildung 13 A,B).



**Abbildung 13: Wirkung von Flavon und Quercetin auf die DNA-Fragmentierung in HT-29 Zellen.**

A) In HT-29 Zellen sind nach Flavon- und Quercetininkubation (48 h) fluoreszenzgefärbte DNA-Fragmente als Marker der Apoptose zu erkennen. B) Im Verlauf der Flavon- und Quercetinexposition (48 h) ist die Zunahme der apoptotischen Zellen deutlich erkennbar.



**Abbildung 13 : Wirkung von Flavon und Quercetin auf die DNA-Fragmentierung in NCOL-1 Zellen.**

C) In NCOL-1 Zellen kann nur Quercetin eine DNA-Fragmentierung hervorrufen. D) Im Verlauf der Quercetinexposition (48 h) ist eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen zu erkennen, nicht so nach Flavonexposition.

Auch für die NCOL-1 Zellen bestätigte sich die pro-apoptotische Wirkung von Quercetin, während Flavon bei nur 10% der nicht-transformierten Zellen eine DNA-Fragmentierung auslöste. Quercetin bewirkte dagegen, dass bis zu 75 % der nicht-transformierten Zellen in den apoptotischen Zustand übergingen (Abb. 13 C). Die prozentualen Anteile der Zellen mit fragmentierter DNA sind zu verschiedenen Inkubationszeiten in Abbildung 13 D dargestellt.

Während Quercetin sowohl in HT-29 als auch in NCOL-1 Zellen als starkes Antioxidans wirkt und neben Wasserstoffperoxid auch Superoxidradikalanionen in beiden Zelllinien reduzieren konnte, zeigte Flavon keine antioxidative Aktivität. Beide Flavonoide unterscheiden sich also in Bezug auf ihre antioxidativen Eigenschaften und in Bezug auf ihre Apoptose-auslösenden Eigenschaften in NCOL-1 Zellen, während sowohl Quercetin als auch Flavon potent Apoptose in HT-29 Zellen auszulösen vermögen.

### 4.3 Etablierung der Methode der 2-DE

Für eine umfassende Analyse von Zielproteinen, die durch Flavon oder Quercetin in den beiden Zelllinien in ihrem Spiegel verändert werden, wurde die 2 D Gelelektrophorese gewählt.

Zunächst wurde die von Görg *et al*<sup>113</sup>. beschriebene Methode an die eigenen Bedürfnisse angepasst. Initial wurden die Gradientengele (pH 4-9) - wie in 3.4.1 ausführlich beschrieben- selbst gegossen, später wurden die Gradientenstreifen (pH 3-10) über Amersham Biosciences bezogen.

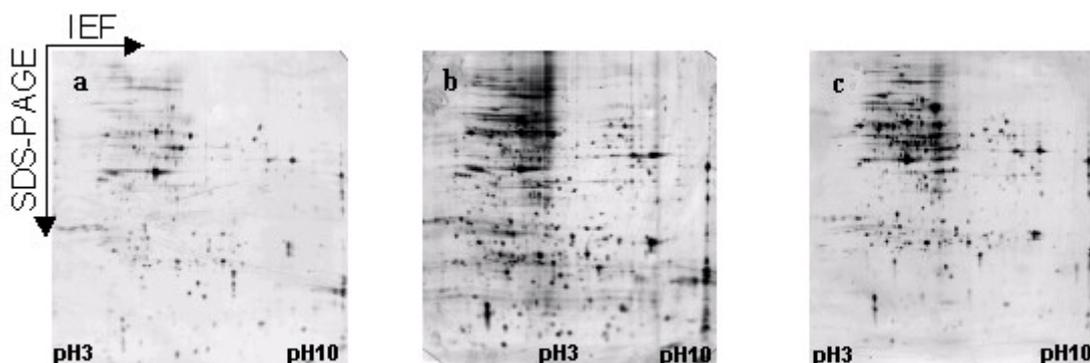
Als schwierig gestaltete sich die Wahl der geeigneten Gelfärbung, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

#### 4.3.1 Färbetechnik

Eine Limitierung der Proteomforschung liegt darin, dass nur ein geringer Teil des Proteoms eines Organismus im 2D-Gel sichtbar gemacht werden kann. Die sensitivste Färbung, die zur Zeit möglich ist, ist die Silberfärbung, die es ermöglicht, ca. 0,1 µg Protein pro Spot zu detektieren. Sie beruht auf der Reduktion von an Proteine bindenden Ag<sup>+</sup> Ionen zu metallischem Silber durch Formaldehyd. Durch Anwendung neuartiger Fluoreszenzfarbstoffe können 1-2 ng Protein pro Spot detektiert werden, wobei der Farbstoff nicht kovalent an die Proteine bindet, sondern nur an das SDS, das die Proteine umgibt. Am wenigsten sensitiv ist die Coomassiefärbung, bei der Spots ab 0,1-2 µg Protein nachgewiesen werden. Der Vorteil der Coomassiefärbung gegenüber der Silberfärbung besteht jedoch darin, dass zum einen die Proteine nicht modifiziert werden und zum anderen die Methodik sehr einfach und kostengünstig ist.

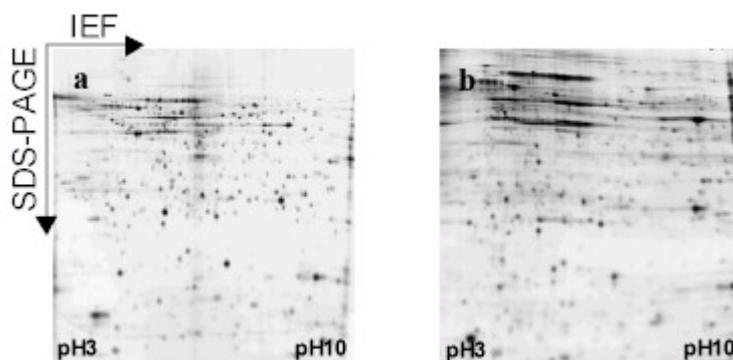
Einige Methoden zur Silberfärbung sind in 3.4.7.2 beschrieben. Für eine Identifizierung Silber-gefärbter Proteine mittels MALDI-TOF-MS bedarf es leichter Modifikationen der Färbemethode (siehe Abb. 14). Um eine Modifikation der Proteine während der Silberfärbung zu verhindern, wurde dem Sensibilisierungspuffer kein Glutardialdehyd zugesetzt, sowie Formaldehyd nur der Entwicklungslösung und nicht, wie in der Originalvorschrift vorgesehen, auch schon der Färbelösung zugefügt. Mit diesen Modifikationen ging jedoch ein Verlust an Sensitivität einher. Die Silberfärbung nach Blum *et al.* war, wie Abbildung 15 zeigt, vergleichbar mit der Sensitivität eines kommerziellen Färbekits, brachte aber keine zusätzlichen Vorteile. Es zeigte sich jedoch, dass Coomassie-gefärbte Spots einfacher durch MALDI-TOF-MS zu analysieren waren, als nach der modifizierten Silberfärbung. Abbildung 16

zeigt den Vergleich eines Silber-gefärbten Geles mit 100 µg Proteinauftrag im Vergleich zu einem Coomassie-gefärbten Gel mit 500 µg Proteinauftrag. Das Proteinmuster zeigt keine auffälligen Unterschiede. Da die Proteinmenge der Proben nicht limitiert war, wurden für die folgenden Analysen die Gele nur noch mittels Coomassie gefärbt.



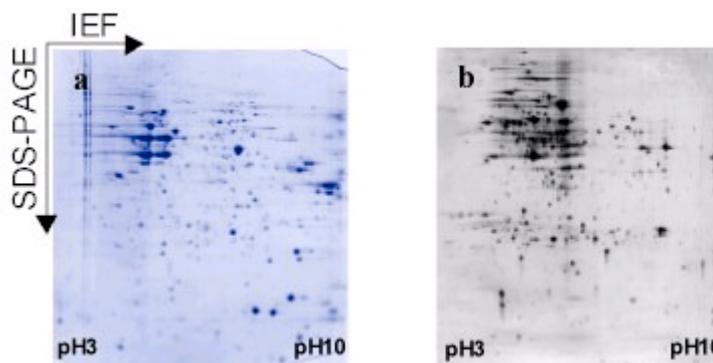
**Abbildung 14: Vergleich von 3 Silberfärbungen, im pH 3-10 Gradientengel (selbstgegossen) mit 100µg Proteinauftrag aus unbehandelten HT-29 Zellen.**

(a) Färbung nach Heukeshoven *et al.* (b) Färbung mit PlusOne Silver Staining Kit (Amersham Biosciences) (c) Färbung mit PlusOne Silver Staining Kit (Amersham Biosciences) MALDI-TOF-MS kompatibel. Die Abbildung zeigt eine deutliche Sensitivitätssteigerung von der Färbung nach Heukeshoven zur Kit-Färbung. Auch wenn die MALDI-kompatible Färbung weniger Spots zeigte, als die Originalfärbung, so war sie immer noch deutlich sensitiver als die Methode nach Heukeshoven *et al.*



**Abbildung 15: Vergleich zweier Silber gefärbter Gele, im pH 3-10 Gradientengel (selbstgegossen) mit 100 µg Proteinauftrag.**

Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte mittels IPGphor (Amersham, Biosciences, Freiburg). (a) Silberfärbung mit PlusOne Silver Staining Kit, MALDI-TOF-MS kompatibel (Amersham Biosciences) (b) Silberfärbung modifiziert nach Blum *et al.* Der Vergleich zeigt, dass die Färbemethode nach Blum *et al.* keine zusätzliche Steigerung in der Sensitivität gegenüber der Kitfärbung brachte.

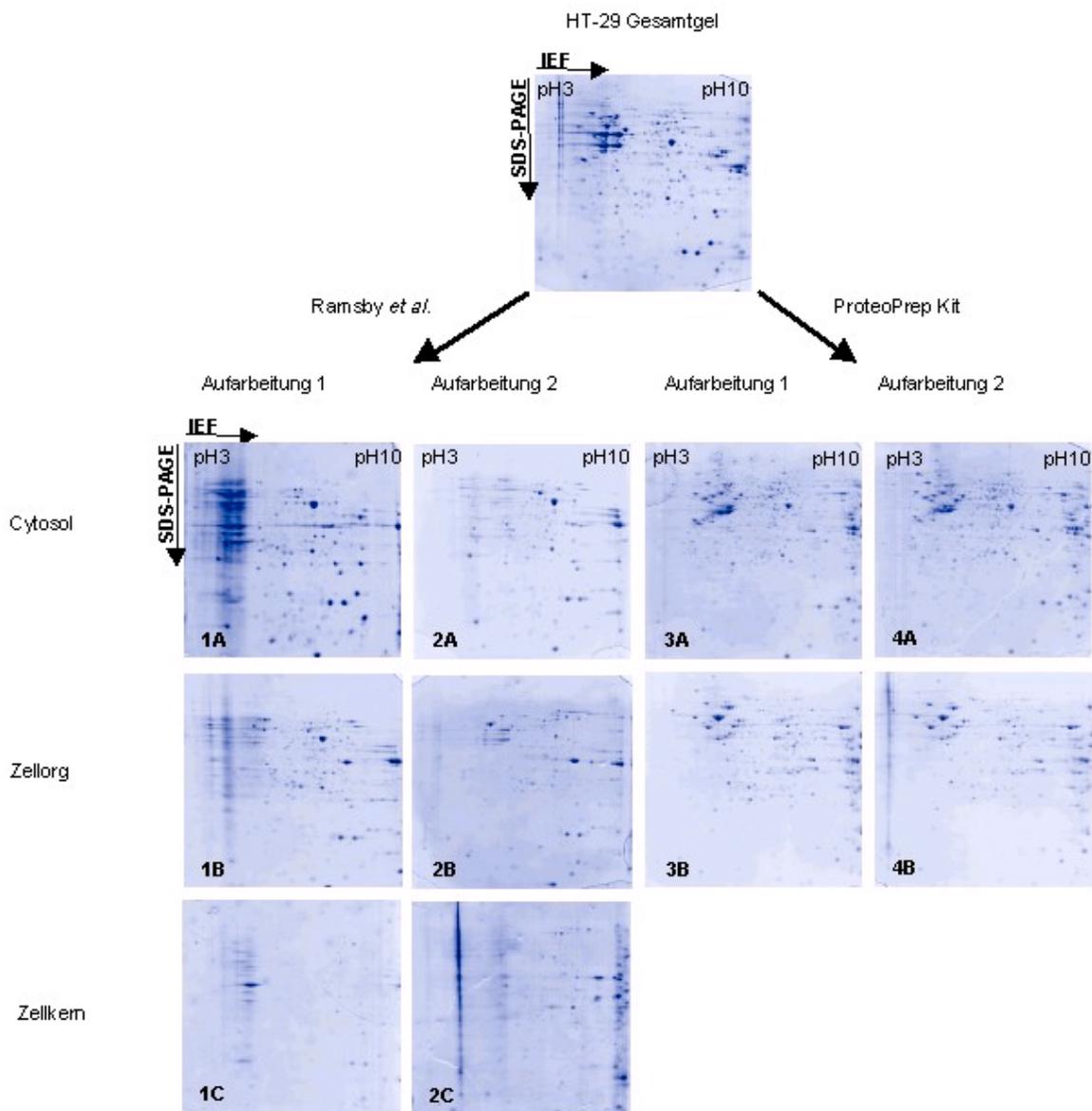


**Abbildung 16: Vergleich eines Silber-gefärbten Gels, pH 3-10 Gradientengel mit 100 µg Proteinauftrag, mit einem Coomassie-gefärbten Gel, pH 3-10 Gradientengel mit 500 µg Proteinauftrag.**

Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte mittels IPGphor (Amersham, Biosciences, Freiburg). (a) Coomassie-Färbung (kolloidal). (b) Silberfärbung mit PlusOne Silver Staining Kit, MALDI-TOF-MS kompatibel (Amersham Biosciences) Die Abbildung verdeutlicht, dass bei vermehrtem Proteinauftrag die Coomassiefärbung vergleichbar viele Proteinspots markieren konnte, wie nach der Silberfärbung.

#### 4.3.2 Fraktionierung des Gesamtproteins

Veränderungen im Proteinstatus eines Organismus, hervorgerufen durch verschiedene endogene oder exogene Faktoren, können mit Hilfe der 2 DE visualisiert werden. Proteinsynthese, Proteinabbau und posttranslationale Modifikationen werden in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen eines Organismus reguliert. Da einige regulatorische Proteine jedoch nur schwach exprimiert werden und die Proteinmenge, die auf einen Gelstreifen aufgetragen werden kann limitiert ist, ist die Aufkonzentrierung der Proteine eine Möglichkeit, um Minorproteine darzustellen. Dazu wurde zunächst eine Fraktionierung des Gesamtproteins der HT-29 Zellen nach der Methode von Ramsby *et al.*<sup>118</sup> durchgeführt. Wie in 3.4.3.2 beschrieben, wurde die cytosolische Proteinfraction von den Proteinen der Zellorganellen und anschließend von den Zellkernproteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeiten abgetrennt. In Abbildung 17 ist deutlich die Veränderung des Proteinmusters nach Fraktionierung der Proteine aus HT-29 Kontrollzellen (1A -1C) zu erkennen. Die Abbildungen 2A-2C zeigen eine weitere Fraktionierung nach Ramsby *et al.*, ebenfalls aus HT-29 Kontrollzellen. Vergleicht man die entsprechenden Fraktionen untereinander (z.B. 1A mit 2A), so sieht man deutliche Unterschiede im Proteinmuster, was auf eine schlechte Reproduzierbarkeit schließen lässt.



**Abbildung 17: Vergleich eines HT-29 Kontrollgels (Gesamtproteinlysat) mit den Proteinfraktionen.**

Zunächst erfolgte die Proteinfraktionierung aus unbehandelten HT-29 Zellen nach der Methode von Ramsby et al. (1A-1C). Um die Reproduzierbarkeit zu prüfen wurde analog eine zweite Fraktionierung durchgeführt (2A-3A). Aufgrund der schlechten Wiederholungen wurde die Fraktionierung mit Hilfe des ProteoPrep Kits (Sigma) in einer Doppelbestimmung durchgeführt (3 A,B, 4 A,B), die eine sehr gute Reproduzierbarkeit zeigten. Es wurden 400 µg Proteinlysat pro Gel aufgetragen und die Gele durch Coomassie gefärbt.

Eine Optimierung der Fraktionierung wurde mit Hilfe des *ProteoPrep™ universal extraction Kit* (Sigma, Deisenhofen) erreicht. Der Extraktions-Kit liefert nur 2 unterschiedliche Fraktionen, wobei die Trennung ebenfalls auf unterschiedlicher Löslichkeit der Proteine beruht. Abbildung 17 zeigt die cytosolische-(A) und Membranprotein-(B) Fraktion der HT-29 Kontrollzellen. Die entsprechenden Gele aus zwei unabhängigen Aufarbeitungen (3A und 4A) zeigen eine sehr gute Vergleichbarkeit und auch in den folgenden Versuchen konnten die Proteinmuster

gut reproduziert werden, so dass schließlich alle Proteinfractionierungen mit Hilfe der *ProteoPrep*<sup>TM</sup> Extraktion durchgeführt wurden.

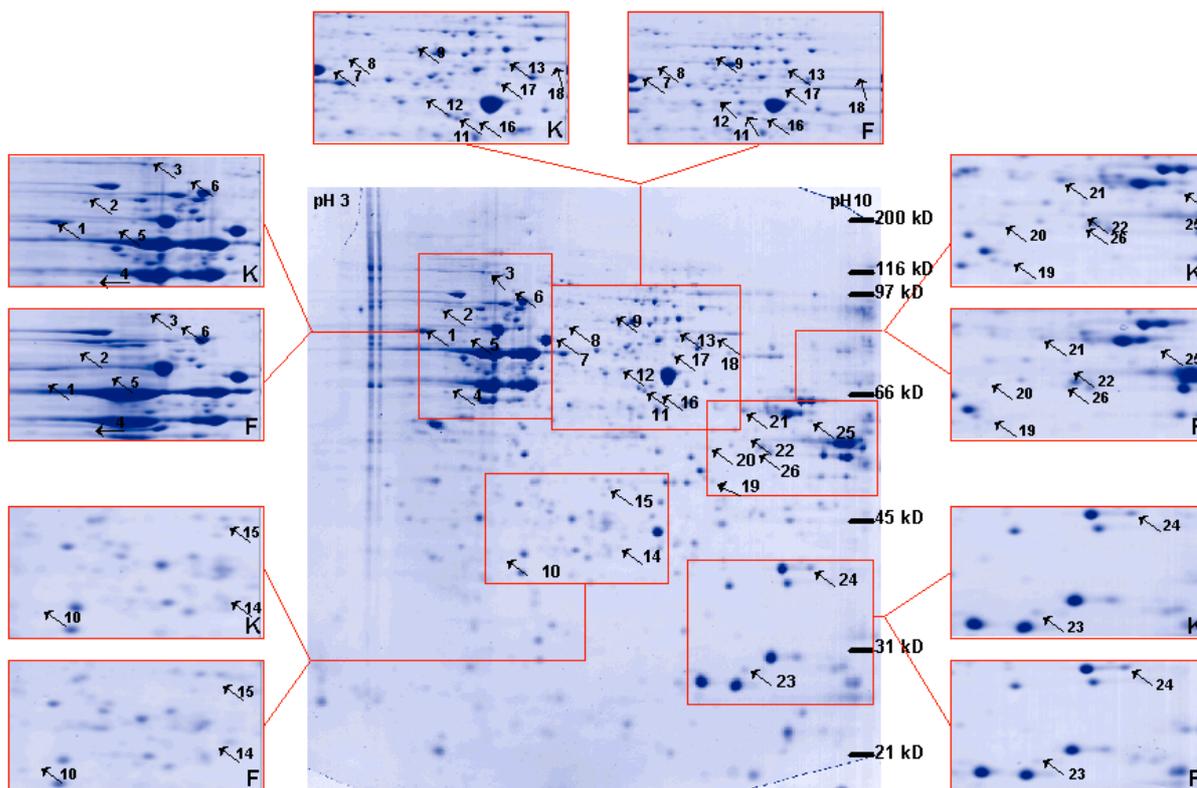
#### **4.4 2-DE zur Untersuchung der Wirkung von Flavon auf das Proteom von HT-29 Zellen**

Die Messung der Caspase-3 Aktivität und die Zellfärbung durch Hoechst 33342 ergaben, dass Flavon in HT-29 Zellen bereits nach 24 h die Apoptose effektiv induziert. Die DNA-Fragmentierung, als Merkmal der fortgeschrittenen Apoptose konnte nach 48 h durch Anfärbung der Fragmente mit Hoechst 33258 bestätigt werden. Um den Mechanismus der Wirkung von Flavon auf das Proteom detaillierter zu analysieren, wurden HT-29 Zellen sowohl für 24 h als auch für 48 h mit Flavon inkubiert und anschließend das Gesamtprotein der Zellen isoliert.

##### 4.4.1 Wirkung von Flavon nach 24 h Inkubation auf das Proteom von HT-29 Zellen

Nach 24 h Flavoninkubation wurden mehr als 600 Proteinspots im 2D-Gel voneinander getrennt. 27 der Proteine zeigten sich um mindestens den Faktor 2 gegenüber der Kontrollspots mit verändertem *stady state level*. Für die Auswertung wurden jeweils 4 Gele von unbehandelten Zellen bzw. 4 Gele von behandelten HT-29 Zellen zu Durchschnittsgelen zusammengefasst und die Proteinmuster unter Anwendung der ImageMaster Software (Amersham Biosciences, Freiburg) miteinander verglichen. Es wurden 8 durch Flavon hoch regulierte Proteine gefunden, 11 Proteinspots zeigten nach Flavonbehandlung eine vermindertes Spotvolumen und 8 Proteinspots traten nur in den Gelen von unbehandelten Zellen auf.

Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives analytisches Gel von HT-29 Kontrollzellen. Die veränderten Proteinspots sind mit Pfeilen markiert und numeriert. Die Ausschnitte erlauben den direkten Vergleich der Spots von Kontrollzellen mit denen aus Flavon-behandelten Zellen.



**Abbildung 18: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus HT-29 Zellen.**

Die Ausschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster aus unbehandelten HT-29 Kontrollzellen (K) sowie von HT-29 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert wurden (F). 500  $\mu$ g Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die numerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.

Die in ihrer Spotintensität veränderten Proteine wurden wie in 3.6.2 beschrieben aus dem Gel geschnitten, entfärbt, tryptisch verdaut und anschließend mit Hilfe der MALDI-TOF-MS analysiert. Die 20 identifizierten Proteine sind in Tabelle 6 aufgelistet. Auf Grund ihrer Eigenschaften bzw. physiologischen Bedeutung konnten die Proteine in Gruppen zusammengefasst werden. 7 Proteine konnten dem Metabolismus der Zelle zugeordnet werden und wurden bis auf 2 Proteine (Acyl-CoA-DH (Spot 16), Apolipoprotein A1 (Spot 23)) entweder in ihrer Intensität durch Flavon vermindert oder traten nur im Kontrollgel auf. Einer der Spots, der nur im Kontrollgel sichtbar war, wurde als Glutamat-DH (Spot 17) identifiziert. Ein weiterer Spot wurde als Plectin identifiziert (Spot 15), das als Protein des Cytoskeletts ein Substrat von Caspase 8<sup>125</sup> ist.

Annexine sind Proteine, die eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielen<sup>126</sup>. Spot 20 und Spot 1 wurden als Annexin II und Annexin VI identifiziert. Ihre Spotvolumina zeigen nach Flavonbehandlung eine deutliche Verminderung.

Weiterhin konnten zwei Chaperone identifiziert werden, so HSTCP1 (Spot 8). Ein Heatshock-Protein, das als Regulatorprotein in der Stress-induzierten Apoptose bekannt ist<sup>127,128</sup>, war nur in Kontrollzellen nachweisbar.

Weitere regulierte und identifizierte Proteine konnten der Genregulation oder Detoxifikation zugeordnet werden. Zwei Enzyme, die für die Detoxifikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlich sind, zum einen die Katalase und zum anderen die Thioredoxin Peroxidase, wurden durch Flavon unterschiedlich reguliert. Die Thioredoxin Peroxidase (Spot 24), die in ihrer Menge durch Flavon 3-fach erhöht wurde, dient dem Schutz gegenüber einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Apoptose, nicht aber einer Apoptose, die durch andere Faktoren ausgelöst wird<sup>129</sup>. Der Proteinspot der Katalase (Spot 13) wurde etwa 3-fach erniedrigt. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei zwei Proteinen gemacht werden, die bei der Translation eine wichtige Rolle spielen. Die translationale ER ATPase (Spot 3) wurde in ihrem Spotvolumen vermindert, während das 40S ribosomale Protein S12RS (Spot 27) eine Zunahme der Spotintensität zeigte, was auf unterschiedliche Regulationsmechanismen schließen lässt.

Besonders deutlich wurde der Einfluss von Flavon auf die Proteinkinase C-beta (PKC-beta). Da diese Kinase in der Lage ist, den Cyclooxygenase-2/Transforming-Wachstumsfaktor-beta in Darmepithelzellen zu aktivieren, gilt sie als „ultimatives prokarzinogenes Protein“<sup>130</sup>. Die PKC-beta (Spot 2) war nach Flavoninkubation im Gel nicht mehr zu detektieren, was vermuten lässt, dass sie ein primäres Zielprotein von Flavon darstellt.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse der durch Flavon regulierten Proteine sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6: Veränderung der zellulären Spiegel spezifischer Genprodukte nach Inkubation (24 h) von HT-29 Zellen mit Flavon.** Der Faktor der Regulation ergibt sich aus dem Quotienten von normalisiertem Spotvolumen aus dem Gel Flavon behandelter Zellen und normalisiertem Spotvolumen aus dem Kontrollgel (F/K). In der rechten Spalte sind Regulationen der mRNA mit der korrespondierenden Oligonukleotid Sequenz auf dem Array gezeigt. Die zur Identifizierung des Proteins herangezogenen Peptidfragmente sind im Anhang aufgelistet (siehe Anhang 8.3.2).

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)	DNA-Array (F/K)
	<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
15	Plectin	Nur K <sup>a</sup>	
	<b>Annexine</b>		
20	Annexin II	0,2	0,6
1	Annexin VI	0,5	
	<b>Chaperone</b>		
8	HSTCP1, similar to HSP60, chaperonin	Nur K	0,8
7	Protein disulfide-isomerase (PDI) precursor	2	1,3
	<b>Metabolismus</b>		
1	Human thyroid binding protein	Nur K	
17	Glutamate-DH	Nur K	1,9
22	3 alpha hydroxy steroid DH typ IIB	Nur K	0,9
9	Succinate-DH	0,2	0,7
11	Isocitrate-DH	0,4	1,6
6	NADH-DH (Ubiquinone)	0,3	0,5
16	Acyl-CoA-DH	2,4	0,7
23	Apolipoprotein A1	2,2	1,4
	<b>Detoxifikation</b>		
24	Peroxyredoxin I	3,1	0,8
13	Catalase	0,3	0,8
	<b>Kinasen/ Phosphatasen</b>		
2	Serine/threonine specific protein kinase	Nur K	
	<b>Genregulation</b>		
27	40S ribosomal protein S12 RS	2	0,8
3	Translational ER ATPase	0,5	
	<b>Weitere Proteine:</b>		
19	GTP binding protein homologe chicken	0,4	
12	BC001951	0,4	

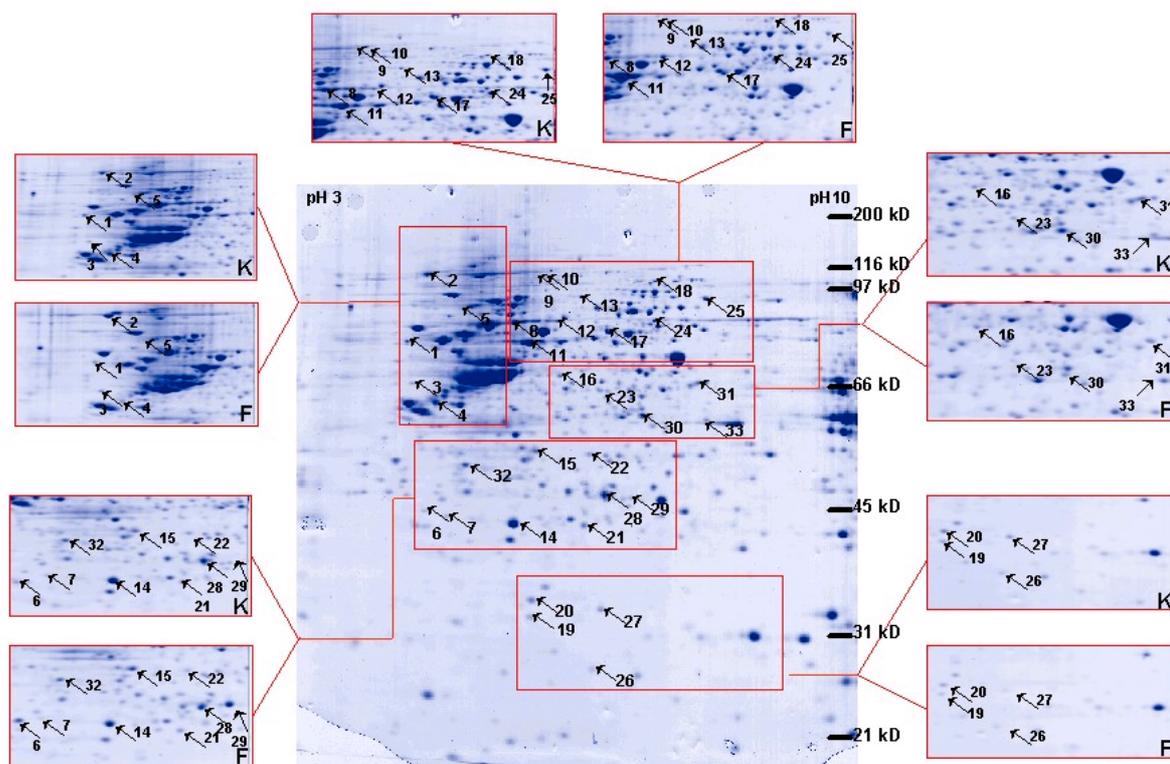
**Tabelle 7: Nicht identifizierte aber durch Flavon regulierte Proteine**

Spot-Nummer	Regulation (F/K)
10	3,9
14	2
26	3,3
21	0,2
25	0,2
4	Nur K
18	Nur K

<sup>a</sup> Proteinspot war nur im Gel der unbehandelten Zellen sichtbar

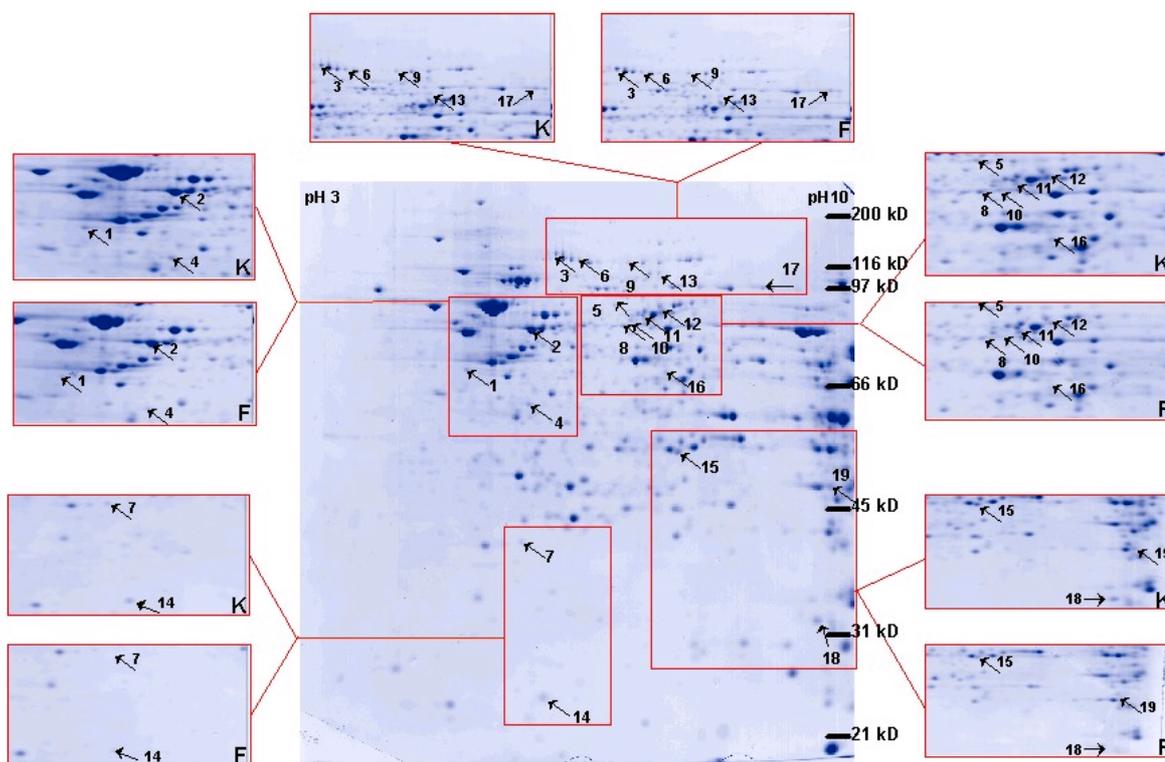
#### 4.4.2 Identifizierung Flavon-regulierter Proteine nach Fraktionierung der HT-29 Zellen

Um zusätzliche, durch Flavon regulierte Proteine, auf dem 2D-Gel zu identifizieren, wurde eine Fraktionierung der Proteine aus HT-29 Zellen durchgeführt. Zunächst wurden die cytosolischen Proteine abgetrennt, anschließend die Proteine der Membranfraktion isoliert. Beide Fraktionen wurden aus mit Flavon-behandelten und Kontrollzellen gewonnen, durch 2-DE aufgetrennt und anschließend analysiert. Auf diese Weise wurde eine Anreicherung der Proteine bewirkt. Es wurden in der cytosolischen Fraktion 32 weitere regulierte Proteine vorgefunden, die im Gesamtprotein nicht nachweisbar waren, in der Membranfraktion wurden 16 zusätzlich regulierte Proteine identifiziert.



**Abbildung 19: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus HT-29 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter HT-29 Zellen (**K**) sowie von HT-29 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert wurden (**F**). Die cytosolische Proteinfraction wurde mit Hilfe des SIGMA-ProteoPrep™ Universal Extraction Kit abgetrennt. 500  $\mu$ g Proteinlysate wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.



**Abbildung 20: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus HT-29 Zellen.**

Die Abschnitte A-E zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter HT-29 Kontrollzellen (K) sowie von HT-29 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert wurden (F). Die Membran-Proteinfraktion wurde mit Hilfe des SIGMA-ProteoPrep™ Universal Extraction Kit abgetrennt. 500  $\mu$ g Proteinlysate wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die numerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.

Die durch MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine der beiden Einzelfractionen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Proteine, die aus der cytosolischen Fraktion stammten, sind mit <sup>1</sup> markiert, die aus der Membranfraktion mit <sup>2</sup>. Die Gruppe der Cytoskelettproteine wurde um 10 Proteine ergänzt, wobei die Regulation der Proteine unterschiedlich war. So konnte eine Abnahme der Spotvolumina von Lamin A (Spot 20) und Lamin B1 (Spot 5), die während der Apoptose proteolytisch gespalten werden, nach Flavonbehandlung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden Annexin IV (Spot 15) im Cytosol und Annexin XI (Spot 12) in der Membranfraktion beide in ihrer Intensität durch Flavon verstärkt. Annexin IV ist in nicht-apoptotischen Zellen im Kern lokalisiert, wird jedoch als Folge der Apoptose in das Cytosol abgegeben<sup>131</sup>. Annexin XI bindet im Verlauf der Apoptose an das Apoptose-

assoziierte Protein ALG-2<sup>128,132</sup>, was seine Erhöhung in der Membranfraktion erklären mag.

Auch die Gruppe der Chaperone konnte durch 2 Proteine ergänzt werden. Der Endoplasmin Precursor GP96 (Spot 2) zählt zur Familie der HSP90 Proteine. Ihre Funktion während der Apoptose ist abhängig vom apoptotischen Stimulus, in erster Linie wirken HSP90 Proteine jedoch anti-apoptotisch<sup>127</sup>. Ihr verstärktes Vorkommen im Cytosol nach Flavonbehandlung ist möglicherweise Folge einer anti-apoptotischen Kompensation.

4 weitere Proteine des Metabolismus wurden in Zellen nach Flavoninkubation in ihrer Spotintensität als beeinflusst vorgefunden, wobei nur eines eine Volumenzunahme zeigte, während z.B. Stathmin (Spot 19), das bei vielen Tumorerkrankungen vermehrt exprimiert wird<sup>133</sup>, nach Flavonbehandlung ein geringeres Spotvolumen aufwies.

Verminderte Spotvolumina zeigten auch zwei zusätzliche Proteine der Detoxifikation, die Glutathion-S-transferase (Spot 14) und Antioxidant Protein 2 (Spot 28). In den Proteinfractionen wurden somit mehr Proteinspots in ihrer Intensität durch Flavoninkubation vermindert, als erhöht. Es konnten deutlich weniger Proteine aus der Membranfraktion mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden, als aus der cytosolischen Fraktion.

**Tabelle 8: Durch Flavon in ihrer Menge veränderte Genprodukte in HT-29 Zellen. Die Inkubation der HT-29 Zellen fand für 24 h statt.** Die Proteine aus der cytosolischen Fraktion sind mit <sup>1</sup>, die aus der Membranfraktion mit <sup>2</sup> gekennzeichnet. In der rechten Spalte sind Regulationen der mRNA mit der korrespondierenden Oligonukleotid Sequenz auf dem Array gezeigt. Die Peptidfragmente die zur Identifizierung herangezogen wurden, sind im Anhang aufgelistet (siehe Anhang 8.3.2)

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)	DNA-Array (F/K)
	<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
27	Cofilin <sup>1</sup>	0,4	0,9
30	CLP-36 protein (lim-protein) <sup>1</sup>	Nur K <sup>a</sup>	
20	Lamin A <sup>1</sup>	0,4	1,6
24	Lamin C <sup>1</sup>	2,3	1,6
5	Lamin B1 <sup>1</sup>	0,5	1,5
17,11	Desmoplakin I <sup>1,2</sup>	3 <sup>1</sup> , nur F <sup>2</sup>	0,9
11,2	HUMKER B typ II cytoskeletal 8 <sup>1,2</sup>	2,3 <sup>1</sup> 3,6 <sup>2</sup>	0,4
17	Radixin <sup>2</sup>	0,5	1,3
1	Keratin 19, typ I cytoskeletal <sup>2</sup>	0,4	0,2
3	Mitofilin <sup>2</sup>	Nur K	1,1
19	Stathmin <sup>1</sup>	0,4	0,6
	<b>Annexine</b>		

<sup>a</sup> Proteinspot war nur im Gel der unbehandelten Zellen sichtbar

15	Annexin 4 <sup>1</sup>	2	0,6
12	Annexin XI <sup>2</sup>	2	0,6
	<b>Chaperone</b>		
4	GrpE <sup>1</sup>	0,2	
2	Endoplasmin precursor GP 96 (heat shock family 90) <sup>1</sup>	3,4	1,2
	<b>Metabolismus</b>		
12	Methylcrotonyl-CoA-carboxylase 2 beta <sup>2</sup>	Nur K	1,7
14	Cytochrome- c oxidase <sup>2</sup>	0,5	
19	Electron transfer flavoprotein beta subunit (beta-ETF) <sup>2</sup>	0,4	1,2
	<b>Detoxifikation</b>		
14	Glutathione-S-transferase <sup>1</sup>	0,5	
28	Antioxidant protein 2 <sup>1</sup>	0,5	1,0
	<b>Kinasen/ Phosphatasen</b>		
23	Serine/threonine phosphatase 1 gamma <sup>1</sup>	Nur K	
22	MAP kinase 1 <sup>1</sup>	0,4	3,1
8	Pyruvate kinase <sup>1</sup>	0,4	
	<b>Genregulation</b>		
3	Ribosomal prot RS 40 k (Laminin receptor) <sup>1</sup>	2	
	<b>Zellzyklus</b>		
29	Growth arrest specific protein (GAS) 11 <sup>1</sup>	9,1	1,1
	<b>Weitere Proteine:</b>		
33	DJ694B14.1 <sup>1</sup>	0,5	
10	AC005185 <sup>1</sup>	0,3	
31	Marine transposase <sup>1</sup>	0,5	1,6
21	KIAA1751 protein <sup>1</sup>	0,5	
18	HSU 80458 <sup>2</sup>	0,5	
6	Hypothetical DKFZp434D0917.1 <sup>2</sup>	Nur K	

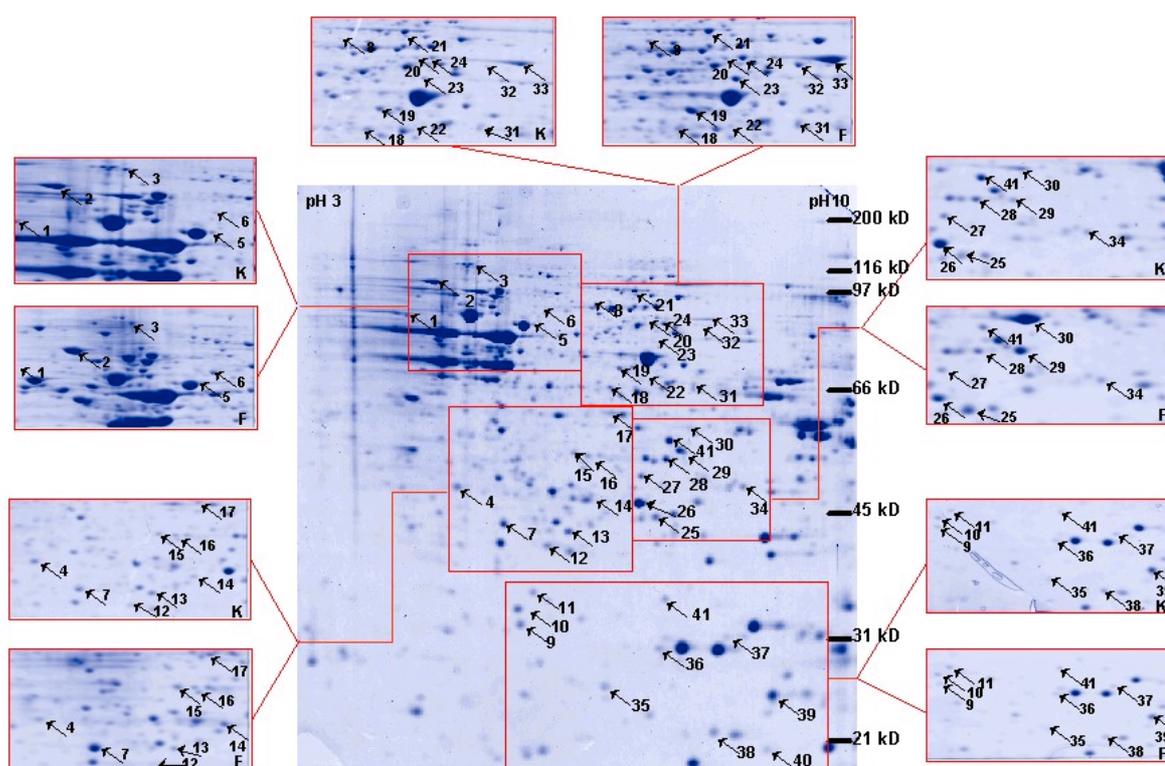
Tabelle 9: Nicht identifizierte aber durch Flavon regulierte Proteine

Spot-Nummer	Regulation (F/K)
6 <sup>1</sup>	2,6
33 <sup>1</sup>	2,9
34 <sup>1</sup>	0,2
26 <sup>1</sup>	0,4
25 <sup>1</sup>	0,4
1 <sup>1</sup>	0,5
12 <sup>1</sup>	0,3
18 <sup>1</sup>	0,4
16 <sup>1</sup>	0,3
9 <sup>1</sup>	Nur K <sup>α</sup>
4 <sup>2</sup>	0,4
15 <sup>2</sup>	2
7 <sup>2</sup>	0,3
8 <sup>2</sup>	0,5
16 <sup>2</sup>	0,4
5 <sup>2</sup>	Nur K
10 <sup>2</sup>	Nur K
13 <sup>2</sup>	Nur F <sup>β</sup>
9 <sup>2</sup>	Nur F
13 <sup>1</sup>	Nur K
7 <sup>1</sup>	Nur K

<sup>α</sup> Proteinspot war nur im Gel unbehandelter Zellen sichtbar.<sup>β</sup> Proteinspot war nur im Gel der Flavon-behandelten Zellen sichtbar

#### 4.4.3 Wirkung einer 48 h Flavon-Exposition auf das Proteom von HT-29 Zellen

Die 2-D-Muster der Kontrollgele von 48 h entsprachen den Kontrollgelen nach 24 h. Der Spotmustervergleich der Kontrollgele untereinander mittels ImageMaster Software zeigte keine in ihrer Intensität signifikant unterschiedlichen Spots. Im Gegensatz dazu wurden im Vergleich von 24 h-Inkubation und 48 h-Flavoninkubation deutlich mehr Proteine, in ihrer Menge bezogen auf die Kontrolle als verändert vorgefunden. Bei 19 Proteinen war nach 48 h ein erhöhtes Spotvolumen zu verzeichnen und 23 Proteine wiesen zu diesem Zeitpunkt ein vermindertes Spotvolumen auf (Abb. 21).



**Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus HT-29 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteilmuster unbehandelter HT-29 Zellen (K) sowie der HT-29 Zellen nach 48 h Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  Flavon (F). 500  $\mu\text{g}$  Proteinlysate wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.

Durch MALDI-TOF-MS Analyse konnten 35 der 42 regulierten Proteine identifiziert werden. Sie sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Anzahl der verstärkten und verminderten Spotvolumina war anders als nach 24 h hier annähernd gleichmäßig verteilt.

Unter den identifizierten Proteinen waren einige, die bereits nach 24 h Inkubation ein verändertes Spotvolumen zeigten und nach 48 h in die gleiche Richtung reguliert wurden. Zum Beispiel die Spots von Lamin A (Spot 10, verglichen mit Abb. 18 Spot 20) und Stathmin (Spot 9, verglichen mit Abb. 18 Spot 19) sind sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Flavoninkubation in ihrer Intensität vermindert. Acyl-CoA (Spot 22, verglichen mit Abb. 18 Spot 16) zeigte zu beiden Zeiten eine Spotzunahme. Es gab aber auch Proteine, die entgegengesetzt reguliert wurden. So zeigten sich die Glutathion-S-Transferase (Spot 7) und die Katalase (Spot 24), beides Proteine der Detoxifikation, ebenso wie Annexin II (Spot 30) zunächst nach 24 h in ihrer Intensität vermindert, nach 48 h Inkubation aber mit größerem Spotvolumen. Die zeitliche Veränderung des Glutamat-DH-Spiegels (23) ist besonders auffällig. Nach 24 h ist der Spot (Abb. 18 Spot 17) nur im Kontrollgel zu erkennen, nach 48 h ist das Volumen im Gel der behandelten Zellen deutlich größer als im Kontrollgel.

Die Thioredoxin Peroxidase ist ein Beispiel für ein Protein, dessen Spot nach 24 h zunächst verstärkt wird, nach 48 h Flavoninkubation jedoch vermindert wurde.

Es wurden auch Proteine gefunden, die zum Zeitpunkt der frühen Apoptose nach 24 h noch unverändert vorlagen. Zum Beispiel Annexin I (Spot 17), das promovierend auf die Apoptose wirkt<sup>134</sup>, wird nach 48 h um den Faktor 40 hochreguliert, liegt nach 24 h Flavoninkubation jedoch noch unverändert vor (Abb. 18 ).

**Tabelle 10: Unterschiedlich exprimierte Proteine, identifiziert durch MALDI-TOF-MS aus dem Gesamtlisat der HT-29 Zellen, nach 48 h Flavoninkubation.** In der rechten Spalte sind Regulationen der mRNA mit der korrespondierenden Oligonukleotid Sequenz auf dem Array gezeigt. (Identifizierte Peptide siehe 8.3.2)

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)	DNA-Array (F/K)
	<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
10	Lamin A	0,3	1,3
16	Plectin	2,1	
20	Desmoplakin I (plakin family)	2,6	0,9
9	Stathmin	0,1	0,6
	<b>Annexine</b>		
30	Annexin II	11,6	0,6
17	Annexin I	39,5	1,7
	<b>Chaperone</b>		
2	BIP	2,3	0,9
6	HSTCP1, similar to HSP60, chaperonin	14,0	0,8
5	Protein disulfid isomerase (PDI) precursor	4,7	1,3
	<b>Metabolismus</b>		
41	Glyceraldehyde-3-phosphate-DH (GAP-DH)	0,2	

23	Glutamatee-DH	13,6	1,9
8	Succinate-DH	83,7	0,8
22	Acyl-CoA-DH	5,5	0,7
26	Triosephosphate-isomerase	0,4	0,4
1	Human thyroid binding protein	17,2	
37	Apolipoprotein A1	0,5	1,4
	<b>Detoxifikation</b>		
36	Thioredoxin peroxidase	0,5	
7	Glutathione-S-Transferase	2	
24	Catalase	3,5	0,8
	<b>Kinasen / Phosphatasen</b>		
11	Nucleoside diphosphate kinase	0,5	1,4
33	Pyruvat kinase	17	
34	Adenylate kinase	0,4	
15	MAP kinase 1	0,5	3,1
27	Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)	0,5	2,1
	<b>Caspasen</b>		
38	Caspase recruitment domain protein 14	0,5	1,3
	<b>Genregulation</b>		
28	DNA methyltransferase1 associated protein 1 (DNMAP1)	0,4	0,6
35	40S ribosomal protein S12 RS	0,2	0,8
3	Probable transl. ER ATPase	11,6	
18	RNA binding motif 4	0,4	0,8
19	Translations elongations factor EF-Tu	2,9	
	<b>Zelloberflächenproteine</b>		
31	$\alpha$ -2 macroglobulin receptor-associated protein	2	2,5
21	Hyaluronan mediated motility receptor	0,2	
	<b>Weitere Proteine:</b>		
13	KIAA1751 protein	0,3	
25	Ran chain A	0,1	
29	GTP binding protein homologue chicken	10,8	

Tabelle 11: Nicht identifizierte aber durch Flavon regulierte Proteine

Spot-Nummer	Regulation (F/K)
32	12
42	0,5
14	0,2
40	0,3
12	0,4
39	0,2
4	0,4

#### 4.4.4 DNA-Array zur Untersuchung der Wirkung von Flavon auf das Transkriptom von HT-29 Zellen

Die Methode der cDNA-Arrays ermöglicht es, eine umfassende Analyse der Flavoneffekte auf mRNA-Ebene vorzunehmen. Die Array-Analyse wurde mit Chips durchgeführt, auf die ca. 10.000 cDNAs plaziert waren. Mit der aus Kontrollzellen und für 24 h mit Flavon behandelten Zellen isolierte mRNA wurde eine 3fach Bestimmung

durchgeführt. Neben dem Gewinn an Information bezüglich der Regulation des Transkriptoms durch Flavon, dienten die cDNA-Arrays dazu, Aussagen über die Regulation von mRNAs zu treffen, deren Proteinprodukte durch Flavon in der Quantität verändert wurden. Es wurden 488 mRNAs in allen drei Chips um mindestens den Faktor 2 verglichen mit der Kontrolle als reguliert identifiziert. Dazu kamen weitere 464 mRNAs, die eine zweifache Regulation in 2 von 3 Chips zeigten. Insgesamt bewirkte die Flavoninkubation der HT-29 Zellen (24 h) damit die Regulation von ca. 10% der untersuchten mRNAs. Die Liste aller regulierten Transkripte ist unter <http://www.nutrition.tum.de/flavongenes.index.html> einzusehen. Die 488 Gene, die durch Flavon in allen drei Chips reguliert wurden, wurden in 12 Gruppen eingeteilt, basierend auf der Funktion ihres Genproduktes. Die identifizierten Gengruppen kodierten für Proteine des Metabolismus (n=81), der Signaltransduktion (n=73), der Transkription (n=55), der Immunfunktion (n=31), der Tumorentwicklung (n=32), der Zell-Zell Interaktion (n=25), des Cytoskeletts (n=23), des Wachstums/ Differenzierung, der Zellzyklus-Kontrolle (n=25) und des vesikulären Transports (n=15). Diese Gruppen repräsentieren 72 % der identifizierten Gene, weitere 8 % der Gene kodierten für Proteine mit diversen Funktionen und konnten somit nicht eingeordnet werden. Abbildung 22 zeigt zusammenfassend die mRNAs, die in Zellen nach 24 h Inkubation mit Flavon mindestens 2-fach veränderte Spiegel im Vergleich zu denen in Kontrollzellen aufwiesen.

Von 51 Genen, die nach 24 h auf Proteomebene reguliert waren (Tabellen 6,8) wurden nur das Typ I Keratin 19 des Cytoskeletts (Tabelle 8) und die NADH-DH (Tabelle 6) auf mRNA-Ebene signifikant in die gleiche Richtung reguliert. Der Spot des Keratin 19 zeigte nach Flavoninkubation eine Verminderung um Faktor 3, auf mRNA-Ebene ließ sich eine Reduktion um den Faktor 5 nachweisen. Der Proteinspot die NADH-DH wurde durch Flavon auf ein Viertel seines Kontrollwertes vermindert, während auf mRNA-Ebene eine Reduktion auf die Hälfte vorlag. Einige andere Gene, wie z.B. das Annexin II, Apolipoprotein A1, HSTCP1, die Proteindisulfid-Isomerase, Succinat-DH, 3  $\alpha$ -Hydroxysteroid-DH und die Katalase wurden auf Transkriptebene zwar in die gleiche Richtung wie auf Proteomebene reguliert, jedoch weniger als um den Faktor 2 (Tabellen 6,8). Außerdem wurden Gene identifiziert, die nach 24 h Flavoninkubation auf mRNA-Ebene in die gegenläufige Richtung als auf Proteinebene reguliert wurden, so z.B. die Isocitrat-DH, Acyl-CoA-DH, Glutamat-DH, Thioredoxinperoxidase und 40S ribosomale Protein S12RS (Tabelle 6,8). Vergleicht

man die Flavoneffekte auf die mRNA-Spiegel nach 24 h mit den Effekten auf das Proteom nach 48 h, zeigt sich ein ähnliches Bild (Tabelle 10). Die Triosephosphatisomerase und das  $\alpha$ 2-Macroglobulinrezeptor-assoziierte Protein wurden auf mRNA-Ebene nach 24 h und Proteomebene nach 48 h als in die gleiche Richtung verändert nachgewiesen (Tabelle 10). MAP-Kinase 1 und Methylthioadenosin-Phosphorylase wurden durch Flavon auf mRNA-Ebene entgegengesetzt zur Proteinebene nach 48 h reguliert. Die meisten Proteine jedoch, die nach 48 h als reguliert identifiziert wurden, zeigten keine signifikante Veränderung auf mRNA-Ebene, auch wenn sie, wie z.B. die Glutamat-DH Tendenz zur Mengenveränderung in die gleiche Richtung annehmen lassen (Tabelle 10).

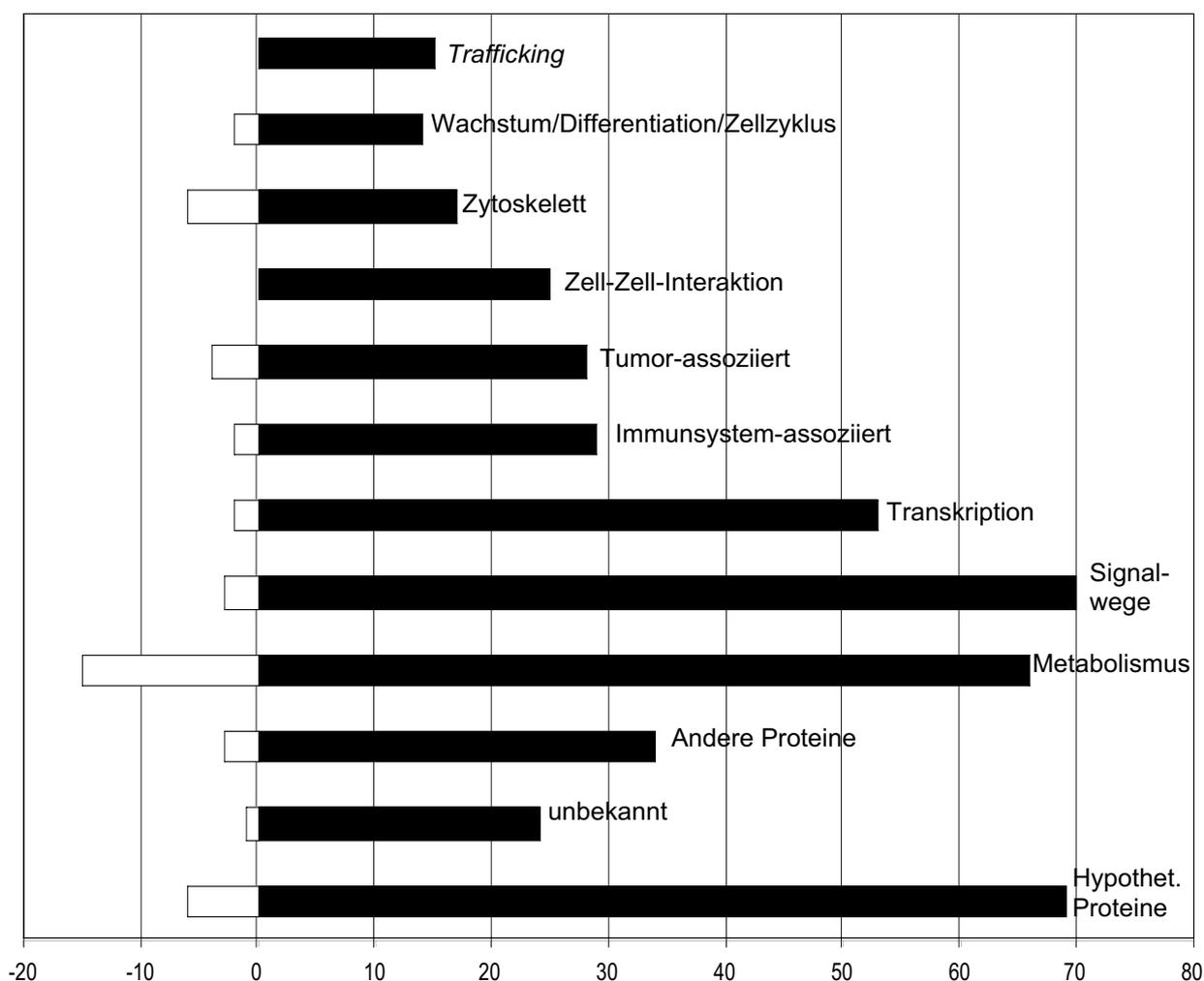


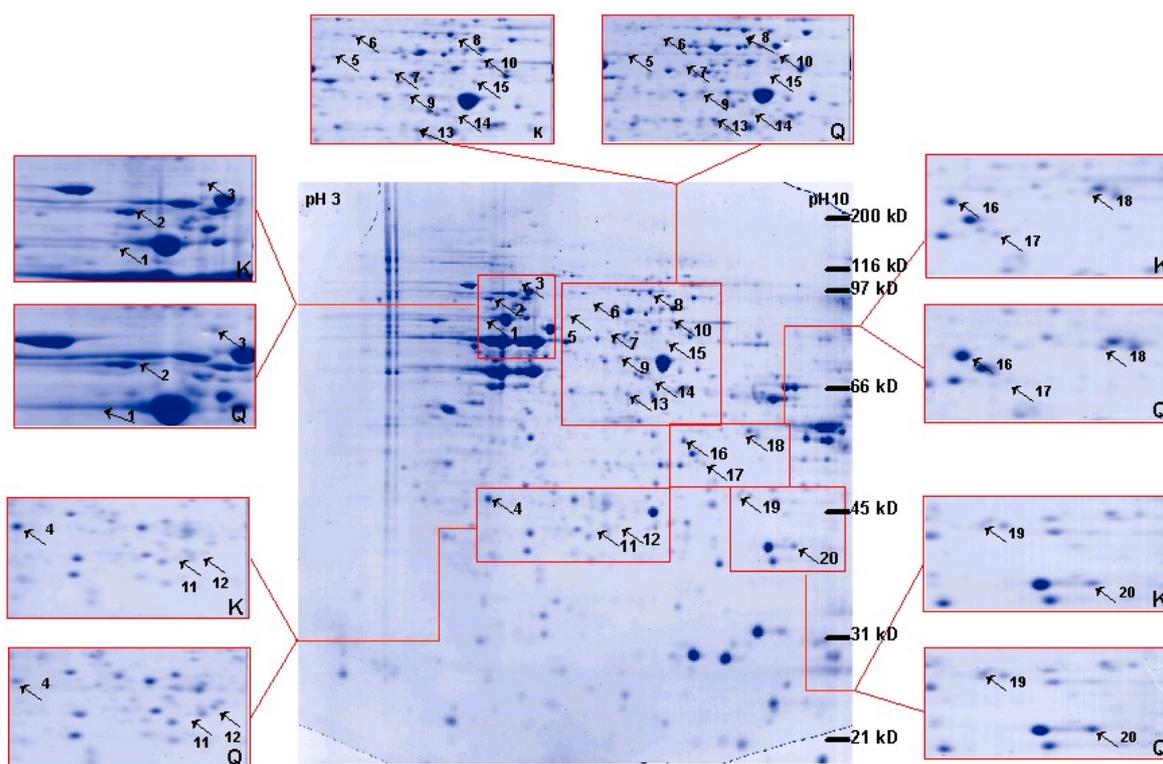
Abbildung 22: Zahl Transkripte mit reduziertem (□) bzw. erhöhtem (■) Spiegel geordnet nach funktionellen Genklassen.

#### 4.5 2-DE zur Untersuchung der Wirkung von Quercetin auf das Proteom von HT-29 Zellen

Die anti-karzinogene Wirkung der Flavonoide wird oftmals auf ihren antioxidativen Charakter zurückgeführt. Das im vorigen Kapitel untersuchte Flavon ist jedoch kein Antioxidanz und wirkt dennoch als Apoptoseinduktor. Um den Wirkmechanismus der Apoptoseinduktion des Flavons mit dem eines starken Antioxidant zu vergleichen, wurde im folgenden die Wirkung von Quercetin auf das Proteom von HT-29 Zellen untersucht.

##### 4.5.1 Wirkung von Quercetin nach 24 h Inkubation auf das Proteom von HT-29 Zellen

Nach 24 h Quercetininkubation wurden insgesamt 20 Proteinspots in ihrer Intensität als reguliert vorgefunden. Die Spotvolumina von 7 Proteinen wurden durch Quercetin vergrößert, 11 wurden vermindert und 2 Spots waren nur in Gelen von unbehandelten Zellen detektierbar.



**Abbildung 23: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen HT-29 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter HT-29 Zellen (K) sowie von HT-29 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Quercetin inkubiert wurden (F). 500  $\mu$ g Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.

Die 14 identifizierten Proteine wurden den Flavon-Untersuchungen entsprechend in Proteingruppen eingeordnet. Viele der Proteine waren auch schon durch 24 h Flavoninkubation auf die gleiche Weise reguliert. Zum Beispiel wurden die Glutamat-DH (Abb. 23, Spot 15; Abb. 18, Spot 17), die NADH-DH (Abb. 23, Spot 3; Abb. 18, Spot 6) und die Succinat-DH (Abb. 23, Spot 6; Abb. 18, Spot 9) sowohl nach Flavon- als auch nach Quercetininkubation in ihren Spotvolumina vermindert, während die Acyl-CoA-DH (Abb. 23, Spot 14; Abb. 18, Spot 16) in beiden Versuchen ein vergrößertes Spotvolumen zeigte.

Auch aus der Gruppe der Detoxifikationsproteine wurden sowohl die Thioredoxin Peroxidase (Abb. 23, Spot 20; Abb. 18, Spot 24) als auch die Katalase (Abb. 23, Spot 10; Abb. 18, Spot 13) gleichartig wie nach Flavoninkubation reguliert.

Ein zusätzlich reguliertes und identifiziertes Protein ist das Ninein (Spot 1). Es trat nach 24 h Quercetininkubation nur im Kontrollgel auf. Ninein ist ein dem Centrosom zugeordnetes Protein und spielt somit bei der Formation des Spindelapparates eine entscheidende Rolle<sup>135</sup>.

Ein genregulatorisches Protein, das proliferationsassoziierte Protein 2G4 wurde durch Quercetin in seinem Spotvolumen um den Faktor 2 verringert. Der genaue Wirkmechanismus dieses Protein ist noch nicht geklärt, es besteht jedoch die Annahme, dass es sowohl die Zellreplikation als auch die Zellproliferation fördert und gleichzeitig die Differenzierung unterdrückt<sup>136</sup>.

**Tabelle 12: Unterschiedlich exprimierte Proteine, identifiziert durch MALDI-TOF-MS aus dem Gesamtprotein der HT-29 Zellen, nach 24 h Quercetininkubation.**

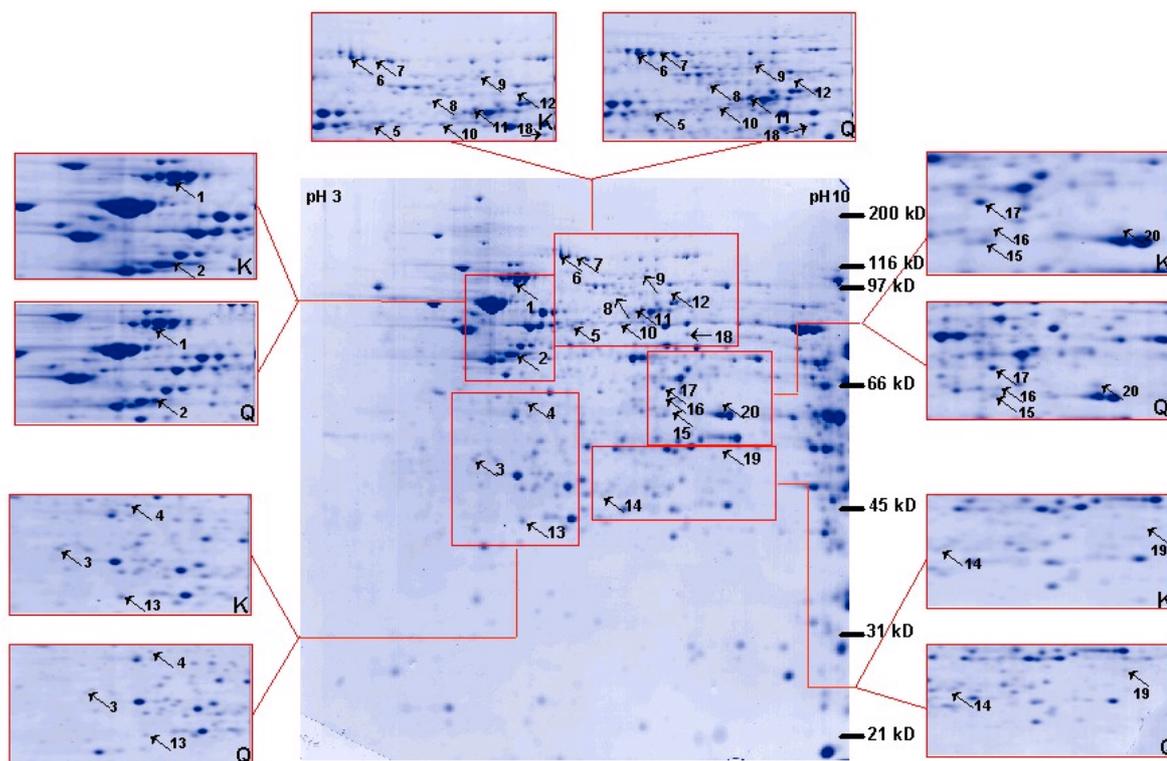
Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (Q/K)	DNA-Array (F/K)
	<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
2	Lamin B1	Nur K <sup>α</sup>	1,5
	<b>Chaperone</b>		
5	HSTCP1	0,5	0,8
	<b>Metabolismus</b>		
1	Ninein	Nur K	2,2
14	Acyl-CoA-DH	3,9	0,7
16	Glyceraldehyde-3-phosphate-DH	3,1	0,5
15	Glutamate-DH	0,3	1,9
3	NADH-DH(ubiquinone)	0,5	0,5
6	Succinate-DH	0,4	0,7
	<b>Detoxifikation</b>		
20	Thioredoxin peroxidase	2,7	0,8
10	Catalase	0,4	0,8
	<b>Genregulation</b>		
13	RNA binding motif protein 4	0,5	0,8
9	Proliferation associated 2G4	0,5	
	<b>Weitere Proteine:</b>		
8	Weakly similar to hyaluronan mediated motility receptor	0,5	
17	GTP-binding protein homolog chicken	0,5	

**Tabelle 13: Nicht identifizierte aber durch Quercetin regulierte Proteine**

Spot-Nummer	Regulation (Q/K)
12	2,5
19	2,5
11	2
18	3,1
4	0,5
7	0,3

<sup>α</sup> Proteinspot war nur im Gel unbehandelter Zellen sichtbar.





**Abbildung 25: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus HT-29.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter HT-29 Zellen (K) sowie HT-29 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Quercetin inkubiert wurden (F). Die Membran-Proteinfraktion wurde mit Hilfe des SIGMA-ProteoPrep™ Universal Extraction Kit abgetrennt. 500  $\mu$ g Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die numerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.

Tabelle 14 führt die identifizierten Proteine auf. Die mit <sup>1</sup> markierten Proteine stammen aus der cytosolischen Fraktion, die mit <sup>2</sup> gekennzeichneten Proteine aus der Membranfraktion. Nach der Fraktionierung konnten einige Proteine identifiziert werden, die auch durch Flavoninkubation beeinflusst wurden. Abbildung 24 zeigt, dass z.B. das Spotvolumen von Annexin II (Spot 14) nach 24 h Quercetininkubation zunimmt. Das steht im Gegensatz zur Flavonbehandlung, da Annexin II (Abb. 18, Spot 20) durch Flavon eine deutliche Abnahme um den Faktor –6,5 zeigte. Unter Quercetinexposition wurden auch 4 Proteine der Chaperon-Familie als reguliert identifiziert, wobei die in Abbildung 24 gezeigten GrpE (Spot 5), der Endoplasmic precursor GP 96 (Spot 1) und das BiP-Protein (Spot 2) bereits nach Flavoninkubation als reguliert vorgefunden wurden und damit auch nach

Quercetinbehandlung entsprechend reguliert wurden. Das Heat-shock Protein HSP70-1 (Spot 1) wurde zusätzlich identifiziert. HSP70-1, bekannt als Apoptoseinhibitor<sup>127</sup>, wurde in seinem Spotvolumen vermindert.

4 der 6 regulierten Proteine des Cytoskeletts waren ebenso bereits in den Flavon behandelten Zellen als reguliert identifiziert worden. Während Lamin A (Abb. 24, Spot 19) und B1 (Abb. 24, Spot 3) analog zur Flavoninkubation auch durch Quercetin in ihrem Volumen vermindert wurden, wurde Desmoplakin I (Abb. 24, Spot 9) sowohl nach Quercetin-, als auch nach Flavoninkubation verstärkt vorgefunden. Desmoplakin I zählt zu den *Plaque-Proteinen*, die durch Caspasen gespalten werden und dadurch die Spaltung der Desmosomen bewirken, was zum Zusammenbruch des Keratincytoskeletts führt<sup>137</sup>. Das Mitofilin (Abb. 25, Spot 6) trat nach Flavonbehandlung nur noch im Kontrollgel auf, während durch Quercetin eine 2fache Vergrößerung seines Spotvolumens herbeigeführt wurde.

Es wurden auch Proteine identifiziert, die spezifisch nur durch Quercetin verändert wurden. Zum Beispiel das dem Metabolismus zugeordnete Protein Aconitat-Hydratase (Abb. 23, Spot 17) die durch Quercetin vermindert wurde. Als Katalysator der Umwandlung von Citrat in cis-Aconitat während des Citratzyklus wird die Aconitat-Hydratase als mitochondriales Schlüsselenzym für die Überlebensfähigkeit z.B. von Neuronen bei oxidativem Stress diskutiert<sup>138</sup>. Der Spot der Peptidyl-Prolyl-Isomerase Cyclophilin A (Abb. 24, Spot 20) trat nur im Kontrollgel auf. Cyclophilin A spielt als Bindungspartner des Retinoblastom-Proteins eine Rolle bei der Regulation der von Cyclosporin A abhängigen T-Zellaktivierung<sup>139</sup>. Cyclophilin A wird auch bei oxidativem Stress *in vivo* vermehrt gebildet und spielt vermutlich eine wichtige Aufgabe in der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen hat<sup>140</sup>.

**Tabelle 14: Unterschiedlich exprimierte Proteine, identifiziert durch MALDI-TOF-MS aus den Proteinfractionen der HT-29 Zellen, nach 24 h Quercetininkubation. Proteine des Cytosols sind mit <sup>1</sup> gekennzeichnet, Proteine aus der Membranfraktion mit <sup>2</sup>.**

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)	DNA-Array (F/K)
	<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
19	Lamin A <sup>1</sup>	0,4	1,6
3	Lamin B1 <sup>1</sup>	0,5	1,5
9	Desmoplakin I <sup>1</sup>	3	0,9
6	Mitofilin <sup>2</sup>	2	1,1
7	Myosin heavy chain 12 <sup>2</sup>	2,3	
18	Myosin-IXA <sup>2</sup>	2,1	
	<b>Annexine</b>		
14	Annexin II <sup>1</sup>	2,9	0,6
	<b>Chaperone</b>		
5	GrpE <sup>1</sup>	0,4	
1	Endoplasmin precursor GP 96 (heat shock family 90) <sup>1</sup>	2,9	1,2
2	BIP <sup>1</sup>	2	0,9
1	HSP70-1 <sup>1</sup> Chaperone	0,3	0,9
	<b>Metabolismus</b>		
20	Peptidyl prolyl isomerase <sup>1</sup> , Cyclophilin A	Nur K <sup>α</sup>	0,7
5	Putative acetyl-transferase <sup>2</sup>	0,4	
17	Aconitate hydratase, iron dependent	0,5	
	<b>Detoxifikation</b>		
13	Glutathione-S-transferase <sup>2</sup>	0,4	
	<b>Kinasen/ Phosphatasen</b>		
20	Serine/threonine- specific protein kinase <sup>2</sup>	5	
12	MAP kinase 1 <sup>1</sup>	Nur K <sup>1</sup>	3,1
6	Pyruvate kinase <sup>1</sup> M1 isoenzyme	0,5	
	<b>Genregulation</b>		
4	Ribosomal prot RS 40 k (Laminin receptor) <sup>1</sup>	Nur K	
17	KIAA1349 <sup>2</sup> , zinc finger protein	2	
16	DEAD box protein RB human <sup>1</sup>	0,5	
19	Polybromo-1 <sup>2</sup>	4	
15	HSPC017 <sup>2</sup>	2,4	
	<b>Weitere Proteine:</b>		
16	Unknown protein for MGC8882 <sup>2</sup>	2	
21	KIAA1751 <sup>1</sup>	0,2	
15	Platelet activating factor acetyl hydrolase IB alpha (LIS1) <sup>1</sup>	2,9	
13	NIT protein 2 <sup>1</sup>	2,2	
19	Sequence 135 from patent EP 1067182 <sup>1</sup>	Nur K	
11	D50929 <sup>1</sup>	Nur K	

<sup>α</sup> Proteinspot war nur im Gel unbehandelter Zellen sichtbar.

**Tabelle 15: Nicht identifizierte aber durch Quercetin regulierte Proteine**

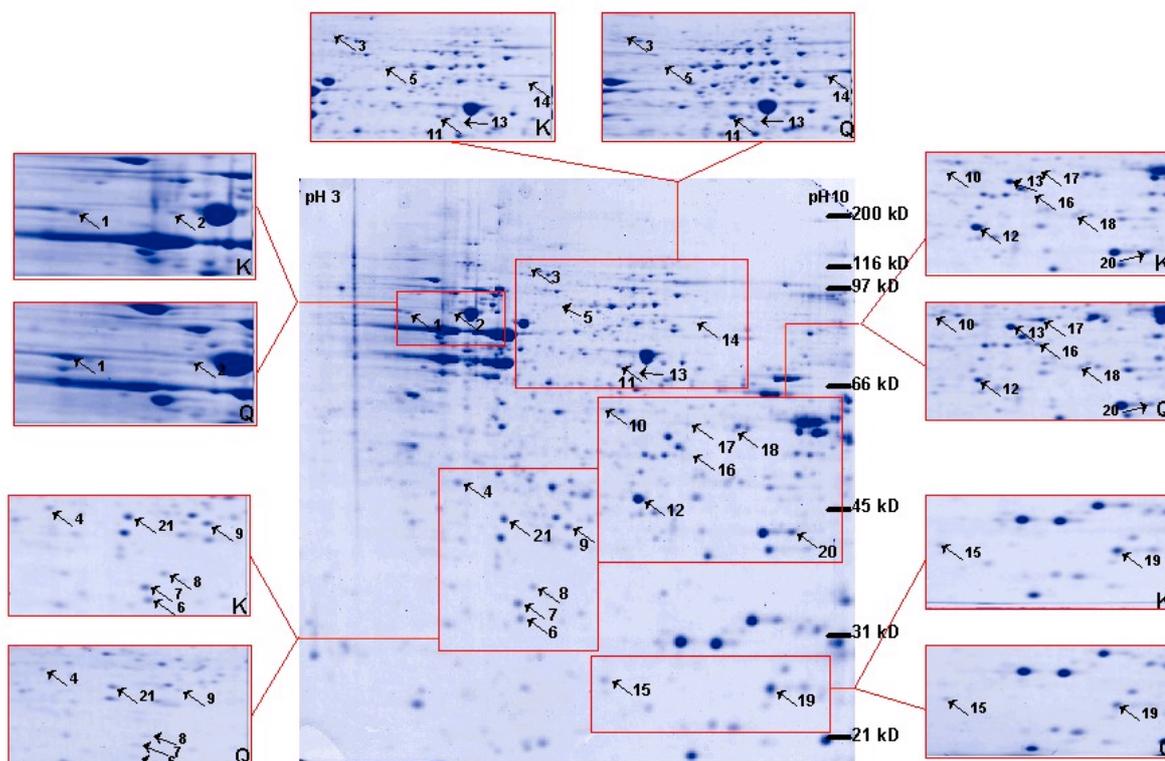
Spot-Nummer	Regulation (Q/K)
8 <sup>1</sup>	2,1
7 <sup>1</sup>	0,3
18 <sup>1</sup>	Nur K
4 <sup>2</sup>	0,4
14 <sup>2</sup>	0,5
3 <sup>2</sup>	0,5
12 <sup>2</sup>	0,2
10 <sup>2</sup>	0,3
2 <sup>2</sup>	0,3
8 <sup>2</sup>	3,5
11 <sup>2</sup>	4,7
9 <sup>2</sup>	2,4

#### 4.5.3 Wirkung einer 48 h Inkubation mit Quercetin auf das Proteom von HT-29 Zellen

Um die Veränderung des Proteoms auch nach Quercetingabe zeitabhängig zu untersuchen, wurde auch nach 48 h Quercetininkubation das Gesamtlysat der HT-29 Zellen analysiert. Im Gegensatz zur Flavoninkubation stieg die Anzahl der durch Quercetin veränderten Proteine nach 48 h im Vergleich zu 24 h-Inkubation nicht an. Wie Tabelle 16 zeigt, wurden bezogen auf ihr Spotvolumen im 2D-Gel 9 Proteine mit erhöhtem und 11 Proteine mit vermindertem Spiegel vorgefunden, 1 Protein trat nur im Kontrollgel auf.

Nach 48 h Quercetininkubation konnten einige Proteine identifiziert werden, die auch schon nach 24 h als in gleicher Weise reguliert vorgefunden worden waren. So z.B. das Annexin II (Abb. 26, Spot 17 verglichen mit Abb. 24, Spot 14) und die Acyl-CoA-DH (Abb. 26, Spot 13 verglichen mit Abb. 23, Spot 14) die durch Quercetin verstärkt, während Lamin A (Abb. 26, Spot 7 verglichen mit Abb. 23, Spot 19) und die Glutathion-S-transferase (Abb. 26, Spot 21 verglichen mit Abb. 23, Spot 13) in ihren Spotvolumina vermindert wurden.

Ein Beispiel für eine unterschiedliche Regulation in Abhängigkeit der Inkubationszeit bietet Ninein (Abb. 26, Spot 2 verglichen mit Abb. 23, Spot 1), das nach 24 h nur im Kontrollgel sichtbar war, nach 48 h Quercetininkubation jedoch auch im Gel der behandelten Zellen auftrat, im Vergleich zum Kontrollgel aber um den Faktor 2 vermindert.



**Abbildung 26: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus HT-29 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter HT-29 Zellen (F) sowie von HT-29 Zellen, die 48 h mit 150 µM Quercetin inkubiert wurden (K). 500 µg Proteinlysate wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH 3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der ImageMaster Software.

Die Triosephosphatisomerase zeigte nach 24 h Quercetinexposition noch keine Veränderung, erst nach 48 h wurde ihr Protein-Spiegel deutlich vermindert. Im Falle der Flavonexposition zeigte sich ebenfalls nach 48 h eine Abnahme der Spotintensität (Abb. 26, Spot 12 verglichen mit Abb. 21, Spot 26). Das ribosomale Protein L13 (Abb. 26, Spot 15) war das einzige Protein, das nur nach 48 h Quercetinbehandlung als zusätzlich reguliert identifiziert wurde.

**Tabelle 16: Unterschiedlich exprimierte Proteine, identifiziert durch MALDI-TOF-MS aus dem Gesamtprotein der HT-29 Zellen, nach 48 h Quercetininkubation.**

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)	DNA-Array (F/K)
	<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
7	Lamin A	0,2	1,6
3	Mitofilin	Nur K <sup>α</sup>	1,1
6	Stathmin	0,2	0,6
	<b>Annexine</b>		
17	Annexin II	2	0,6
10	Annexin I	2,1	1,7
	<b>Metabolismus</b>		
1	Human thyroid binding protein	0,5	
12	Triosephosphate-isomerase	0,3	0,4
13	Acyl-CoA-DH	4,3	0,7
2	Ninein	0,5	2,2
	<b>Chaperone</b>		
5	HSTCP1, similar to HSP60, Chaperonin	5,6	0,8
	<b>Detoxifikation</b>		
21	Glutathione-S-transferase	0,5	
20	Probable thioredoxin peroxidase	7	0,8
	<b>Kinasen/ Phosphatasen</b>		
8	Nucleoside diphosphate kinase	0,4	1,4
	<b>Genregulation</b>		
15	Ribosomal protein L13	0,4	
11	Translations elongations factor EF-Tu	2	
	<b>Noch Weitere Proteine:</b>		
16	GTP binding protein homolog chicken	2,6	
9	KIAA1751	0,5	

**Tabelle 17: Nicht identifizierte aber durch Quercetin regulierte Proteine**

Spot-Nummer	Regulation (Q/K)
18	2
14	6,7
19	0,4
4	0,2

<sup>α</sup> Proteinspot war nur im Gel unbehandelter Zellen sichtbar

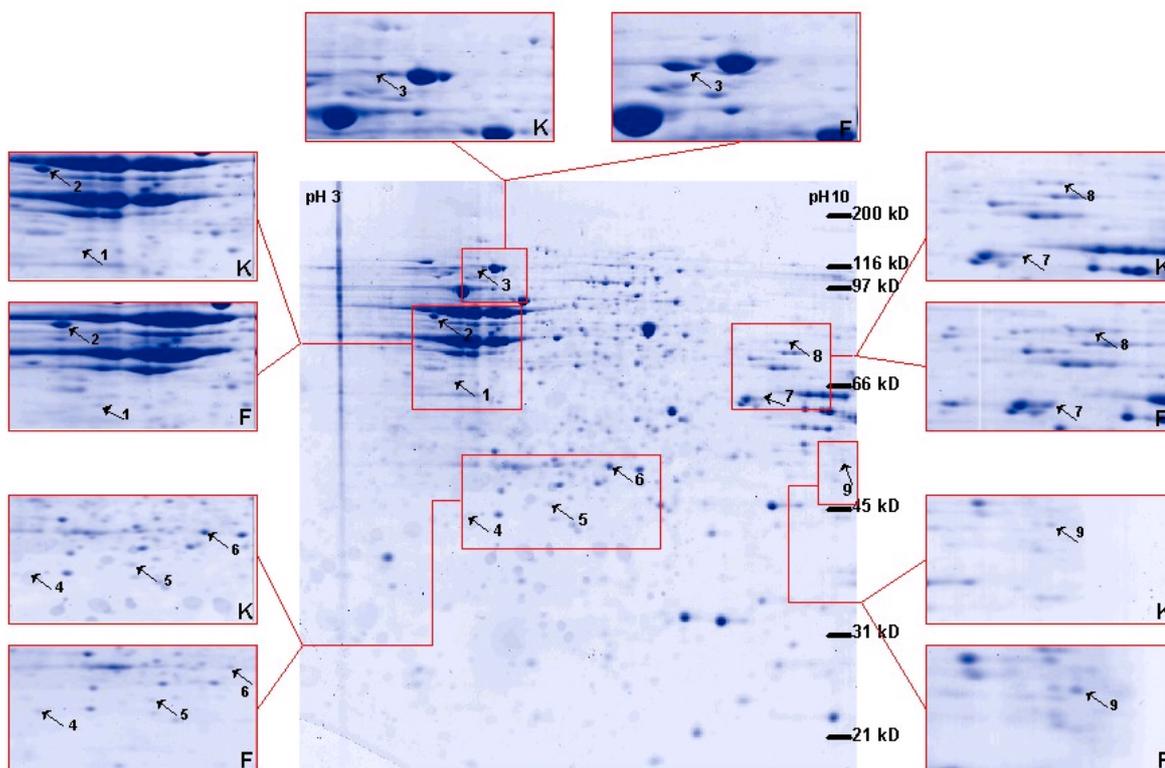
#### **4.6 Wirkung von Flavon nach 24 h Inkubation auf das Proteom der NCOL-1 Zellen**

Da Flavon in NCOL-1 Zellen im Gegensatz zu HT-29 Zellen weder eine apoptotische noch eine antioxidative Wirkung zeigte, sollte auch dessen Wirkung auf das Proteom in dieser nicht-transformierten Zelllinie untersucht werden. Die NCOL-1 Zellen wurden dazu analog den HT-29 Zellen für 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert. Zunächst wurde das Gesamtproteinlysate durch 2-DE aufgetrennt, im Anschluss wurde vor der 2-DE eine Fraktionierung des Proteinlysats in eine cytosolische Fraktion und eine Membranprotein-Fraktion durchgeführt. Verglichen mit dem Flavoneffekt auf HT-29 Zellen, wurden in NCOL-1 Zellen nach 24 h Flavoninkubation deutlich weniger Proteine als reguliert vorgefunden. Sowohl aus Gesamtlysate als auch nach Fraktionierung, wurden insgesamt nur 22 Proteine durch Flavon in ihrer Spotintensität verstärkt und nur 9 Proteine in ihrer Dichte vermindert. Tabelle 18 führt die in ihrer Expressionshöhe veränderten und mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine auf.

Es wurden zum Beispiel 2 Proteine identifiziert, die zur Chaperon-Familie gehören. Sowohl das Chaperone HSP-70-1 (Spot 3, Abb. 27) als auch das Chaperonin (Spot 1, Abb. 29) wurden nach Flavoninkubation in ihrer Intensität vermindert vorgefunden. Das pro-apoptotische Chaperonin<sup>127</sup> wurde bereits auch in HT-29 Zellen als reguliert identifiziert. In den transformierten Kolonozyten war es jedoch nach Flavonbehandlung praktisch nicht mehr nachweisbar noch in der Kontrolle sichtbar. Die HSP 70 Familie der Chaperone stellt die am besten untersuchte Klasse der Heat-shock Proteine dar<sup>127</sup>. HSP 70 schützt Zellen vor Stress-induzierter Apoptose und seine hohe Expression fördert damit die Überlebensfähigkeit von Zellen, die dem Zelltod zugeführt werden sollen<sup>141,142</sup>. In der Gruppe der Proteine des Cytoskeletts wurde das humane Cytokeratin 8 (Spot 3, Abb. 29) identifiziert, das ebenso wie in HT-29 Zellen durch Flavon einen erhöhten *steady state level* zeigte. Cytokeratin 18 (Spot 6, Abb. 28), Lamin B2 (Spot 1, Abb. 28) und Fascin (Spot 7, Abb. 28) wurden durch Flavonexposition der Zellen in ihren Spotvolumina verringert. Cytokeratin 18 ist als Substrat von Caspasen beschrieben und wird während der Apoptose proteolytisch gespalten<sup>143</sup>. Caspase 6 ist verantwortlich für die Spaltung der B-Typ Lamine –also auch von Lamin B2–während der Apoptose<sup>144</sup>. Fascin wird ubiquitär im Organismus exprimiert und zählt zur Familie der Aktin-bindenden Proteine<sup>145</sup>.

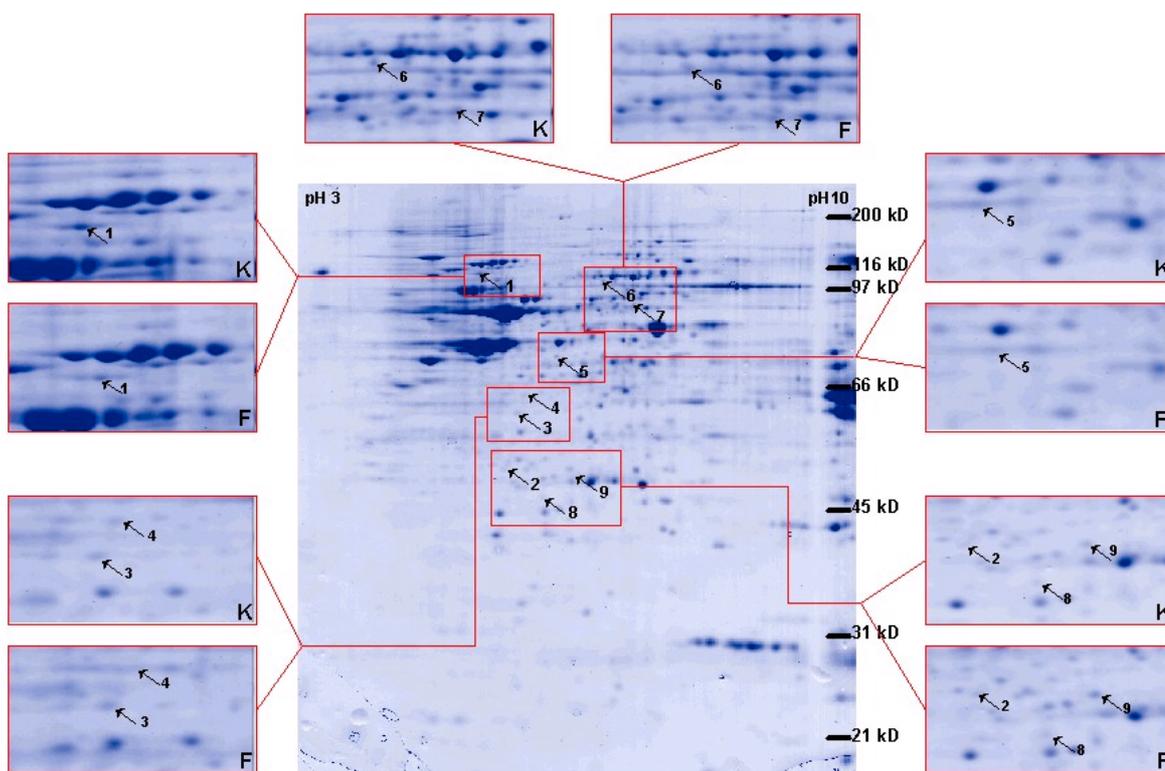
Obwohl Flavon in NCOL-1 Zellen nachweislich keine Apoptose auslöste, wurde nach Flavongabe der Proteinspot (Spot 7, Abb. 27) des Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktors (Apaf-1) als verstärkt detektiert. Apaf-1 bildet zusammen mit Cytochrom C und Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, das Caspase-3 direkt aktiviert und somit die Apoptose-Kaskade aktiviert<sup>146</sup>. Ein Proteinspot des Proteasoms (Spot 2, Abb. 27) wurde ebenfalls erhöht vorgefunden. Es ist bekannt, dass die Inhibierung des Proteasoms in Darmkrebszellen die Aktivierung des NF-kappa B verhindert und somit indirekt die Apoptose stimuliert<sup>147</sup>. Prohibitin (Spot 12, Abb. 29), ein negativer Regulator der Zellproliferation und somit als ein potentielles Tumor-Suppressor Protein zu werten, wurde nach Flavoninkubation der Zellen in seiner Spotintensität vermindert<sup>148</sup>.

Zusätzlich wurden 5 Proteine identifiziert, die durch Flavon in ihrer Spotintensität verstärkt wurden, die jedoch keiner der Proteingruppen zugeordnet werden konnten und die auch in keinen Zusammenhang mit dem Apoptosegeschehen gebracht werden können.



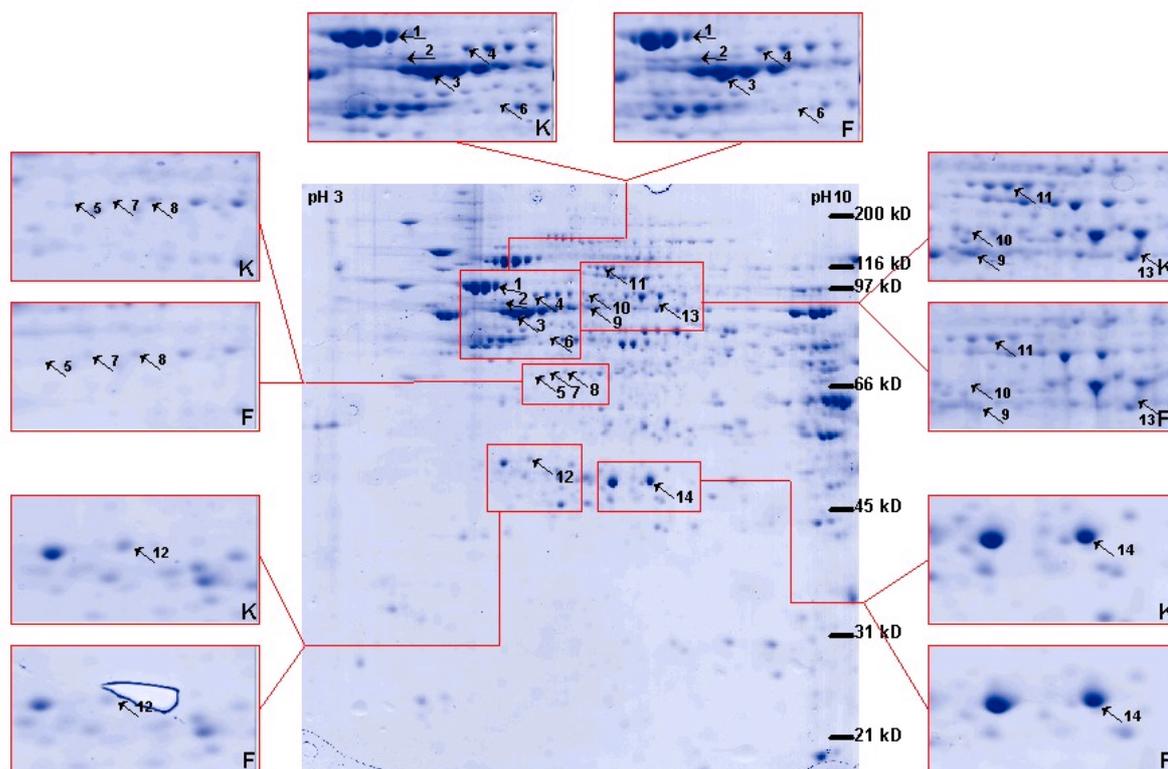
**Abbildung 27: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus NCOL-1 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter NCOL-1 Zellen (K) sowie von NCOL-1 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert wurden. 500  $\mu$ g Proteinlysate wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die numerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Proteom-Weaver Software.



**Abbildung 28: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus NCOL-1 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter NCOL-1 Zellen (K) sowie von NCOL-1 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert wurden. Die cytosolischen Proteine wurden mit Hilfe des SIGMA-PreoPrep™ Kit abgetrennt. 500  $\mu$ g Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Proteom-Weaver Software.



**Abbildung 29: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus NCOL-1 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter NCOL-1 Zellen (K) sowie von NCOL-1 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Flavon inkubiert wurden. Die Membran-Proteinfraktion wurde mit Hilfe des SIGMA-PreoPrep™ Kit abgetrennt. 500  $\mu$ g Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die numerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Proteom-Weaver Software.

**Tabelle 18: Unterschiedlich exprimierte Proteine, identifiziert durch MALDI-TOF-MS aus den Einzelfractionen und Gesamtproteinfraktion der NCOL-1 Zellen, nach 24 h Flavoninkubation.** Die Proteine aus der cytosolischen Fraktion sind mit <sup>1</sup>, die aus der Membranfraktion mit <sup>2</sup> gekennzeichnet, Proteine aus dem Gesamtlysat sind nicht markiert. Die Peptidfragmente die zur Identifizierung herangezogen wurden, sind aufgelistet, die Accession number stammt aus der Mascot-Datenbank.

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)
<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
6	Cytokeratin 18	0,5
1	Lamin B2 <sup>1</sup>	0,5
7	Fascin (actin binding protein) <sup>1</sup>	0,4
3	HUMKER B typ II cytoskeletal 8 <sup>2</sup>	2,0
6	Myosin heavy chain VA <sup>2</sup>	1,8
<b>Chaperone</b>		
3	Dnak type molecular chaperone HSP 70-1	0,6
1	Heat shock 60kDa protein 1 (Chaperonin) <sup>2</sup>	0,5
<b>Metabolismus</b>		
8	3-oxo-thiolase	2,0

	<b>Genregulation</b>	
12	Prohibitin <sup>2</sup>	0,6
4	CTCL tumor antigen SE2-1 <sup>2</sup>	2,0
	<b>Apoptose</b>	
7	Apototic protease activating factor 1 (Apaf-1)	2,3
2	ATPase homolog (proteasom, Prosome, Macropain) 26 S subunit	2,4
	<b>Weitere Proteine</b>	
5	Lyst interacting Prot LIP7	0,6
5	Elastone inhibitor <sup>1</sup>	1,8
2	Truncated rad50 protein <sup>1</sup>	1,9
6	NY-REN-58 antigen <sup>1</sup>	1,8
14	Golgin like protein <sup>2</sup>	2,0
9	BAC 33152 chromosome 19 (AAB94784) <sup>1</sup>	Nur F,Q <sup>x</sup>

#### 4.7 Wirkung von Quercetin auf das Proteom von NCOL-1 Zellen

Quercetin zeigte sowohl in transformierten HT-29 Zellen als auch in nicht transformierten NCOL-1 Zellen eine starke antioxidative Wirkung. Apoptose wurde durch Quercetin auch in NCOL-1 Zellen induziert, d.h. Quercetin ist im Gegensatz zu Flavon kein spezifischer Apoptoseinduktor in transformierten Zellen. Die Quercetininkubation zeigte bei NCOL-1 Zellen einen stärkeren Effekt auf das Proteom, als die Flavoninkubation. Es wurden insgesamt 50 Proteine analysiert, die durch Quercetin in ihren Spotvolumina verstärkt wurden. Dazu kamen 35 verminderte Spots und 2 Proteine, die nur im Gel der mit Quercetin behandelten Zellen auftraten. Die durch MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine sind in Tabelle 19 gelistet.

Einige der hier veränderten und identifizierten Proteine wurden bereits in HT-29 Zellen nach Quercetinbehandlung als reguliert vorgefunden, so z.B. die beiden Chaperone Chaperonin (Spot 4, Abb. 32 verglichen mit Spot 5, Abb. 26) und HSP 70-1 (Spot 6, Abb. 30 verglichen mit Spot 1, Abb. 24) Auch nach 24 h Flavoninkubation der NCOL-1 Zellen wurden diese beiden Proteine als in ihrem Spotvolumen reduziert identifiziert. Während das pro-apoptotische Chaperonin auch nach Quercetinbehandlung in NCOL-1 Zellen vermindert auftrat, zeigte das anti-apoptotisch wirkende HSP 70-1 im Gegensatz zu HT-29 Zellen in NCOL-1 Zellen eine Spotvolumenzunahme.

Das HSP A5 (Spot 4, Abb. 30) und das HSP-verwandte Protein 54 (HSC 54) (Spot 5, Abb. 30) sind weitere Beispiele für als reguliert identifizierte Chaperone. Beide Proteine wurden durch Quercetininkubation in ihrem Spotvolumen vergrößert. HSC

<sup>x</sup> Proteinspot war nur im Gel Flavon- und Quercetin behandelter Zellen sichtbar

54 zählt zur Familie der HSP 70 Proteine<sup>149</sup> und wird konstitutiv im Zellkern und Cytosol exprimiert und dient wie andere Chaperone primär der richtigen Proteinfaltung. HSC 70 ist außerdem eine Komponente des BAG-1 Multiproteinkomplexes, der Zellen vor verschiedenen Apoptoseinduktoren zu schützen vermag und diverse Proteine der Zellproliferation aktiviert<sup>150</sup>.

Lamin A (Spot 20, Abb. 30), ein Vertreter der Gruppe der Cytoskelettproteine, wurde analog zur Regulation in HT-29 Zellen (Spot 19, Abb. 24), auch in NCOL-1 Zellen durch Quercetinexposition im Spiegel reduziert. Auch die Spotintensität des Lamin C (Spot 19, Abb. 30), das durch *alternatives Splicing* entsteht, reduzierte sich.

Eine gegenläufige Veränderung zeigte sich beim mitochondrialen Protein Mitofilin (Spot 7, Abb. 32)<sup>151</sup>. Während es in NCOL-1 Zellen unter Quercetingabe in seinem Spotvolumen vermindert wurde, zeigte sich unter den gleichen Bedingungen in HT-29 Zellen eine Zunahme seiner Spotintensität (Spot 6, Abb. 25).

Nucleoporin (Spot 16, Abb. 31) und Profilin (Spot 30, Abb. 30) sind Proteine, die zuvor in keinem anderen Experiment als reguliert identifiziert wurden. Beide wurden nach Quercetininkubation der Zellen in ihrem Spotvolumen verstärkt. Nucleoporine sind Bestandteile des Kernporenkomplexes (NPC), als Regulator des Transportes zwischen Kern und Cytoplasma<sup>152</sup>. Während der Apoptose werden auch Nucleoporine durch Caspasen gespalten<sup>153</sup>. Profilin bildet als Protein des Cytoskeletts einen Komplex mit G-Aktin und wird durch PIP2 reguliert<sup>154</sup>. Profilin dient mit seiner Fähigkeit, Actin zu binden, möglicherweise als Bindeglied in der Kommunikation zwischen Membranrezeptoren, Cytoskelett und Kern und kann somit in die Zellproliferation eingreifen<sup>155,156</sup>. Es wurden auch 3 Cytokeratine identifiziert, die einheitlich nach Quercetininkubation eine Zunahme im Spotvolumen zeigten. Cytokeratin 18 und 19 wurden aus dem Gesamtproteinlysate identifiziert, Cytokeratin 8 aus der Membranfraktion. Diese Regulation steht im Kontrast zu der Beobachtung, dass Cytokeratine als Stabilisatoren des Zellgerüsts während der Fas- und TNF induzierten Apoptose durch Caspasen gespalten werden<sup>157</sup>.

Unter den Proteinen des Metabolismus wurden 2 Proteine, die zuvor nach Quercetininkubation in HT-29 Zellen als reguliert identifiziert wurden, auch hier in den nicht-transformierten Zellen identifiziert. Während jedoch die Succinat-DH (Spot 9, Abb. 32 verglichen mit Spot 6, Abb. 23) sowohl in HT-29 Zellen als auch in NCOL-1 Zellen in ihrem Spotvolumen verringert wurde, zeigt die putative Acetyltransferase

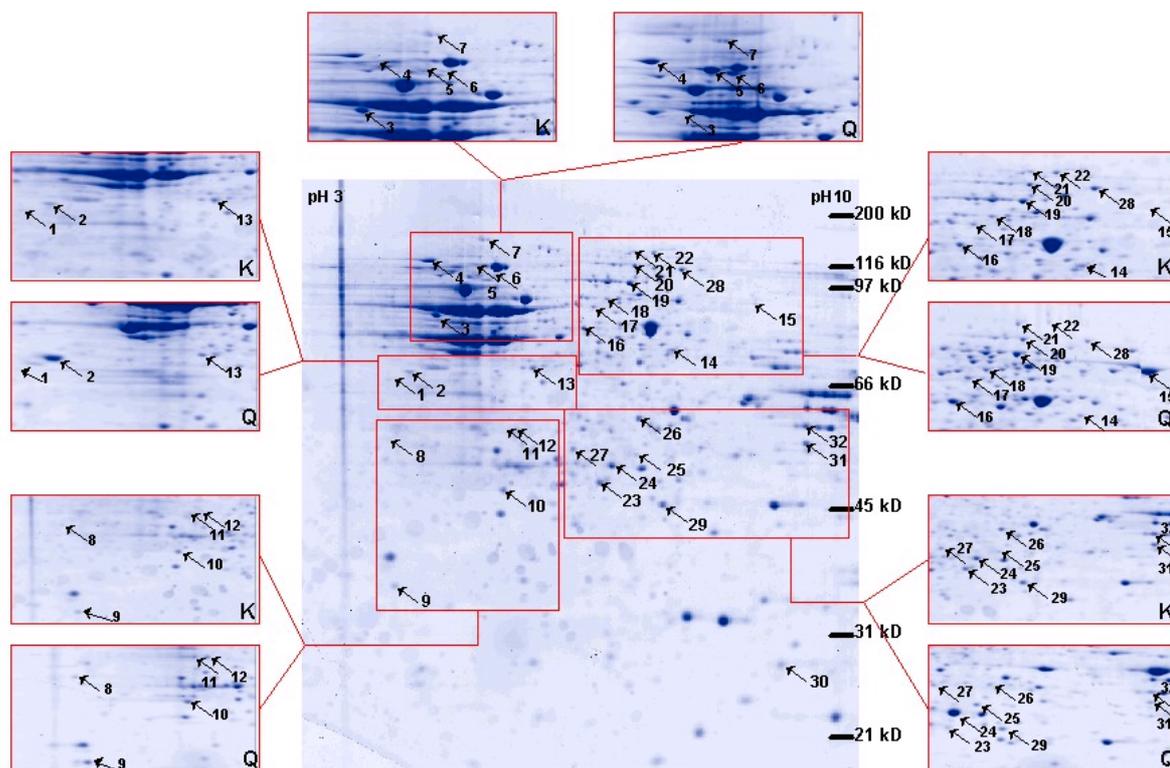
(Spot 2, Abb. 30 verglichen mit Spot 5, Abb. 25) in NCOL-1 eine 5 fache Volumenzunahme, in HT-29 Zellen jedoch eine Verminderung der Spotintensität.

Die beiden Kinasen Pyruvatkinase (Spot 15, Abb. 30 verglichen mit Spot 6, Abb. 24) und die Serin/Threonin spezifische Proteinkinase (Spot 12, Abb. 32 verglichen mit Spot 20, Abb. 25) wurden durch Quercetin in den NCOL-1 Zellen entgegengesetzt ihrem Verhalten in den HT-29 Zellen reguliert.

Der pro-apoptotische Protease-Aktivierungs-Faktor (APAF-1) (Spot 10, Abb. 31) wurde wie bereits nach Flavoninkubation beobachtet auch durch Quercetin in NCOL-1 Zellen verstärkt vorgefunden.

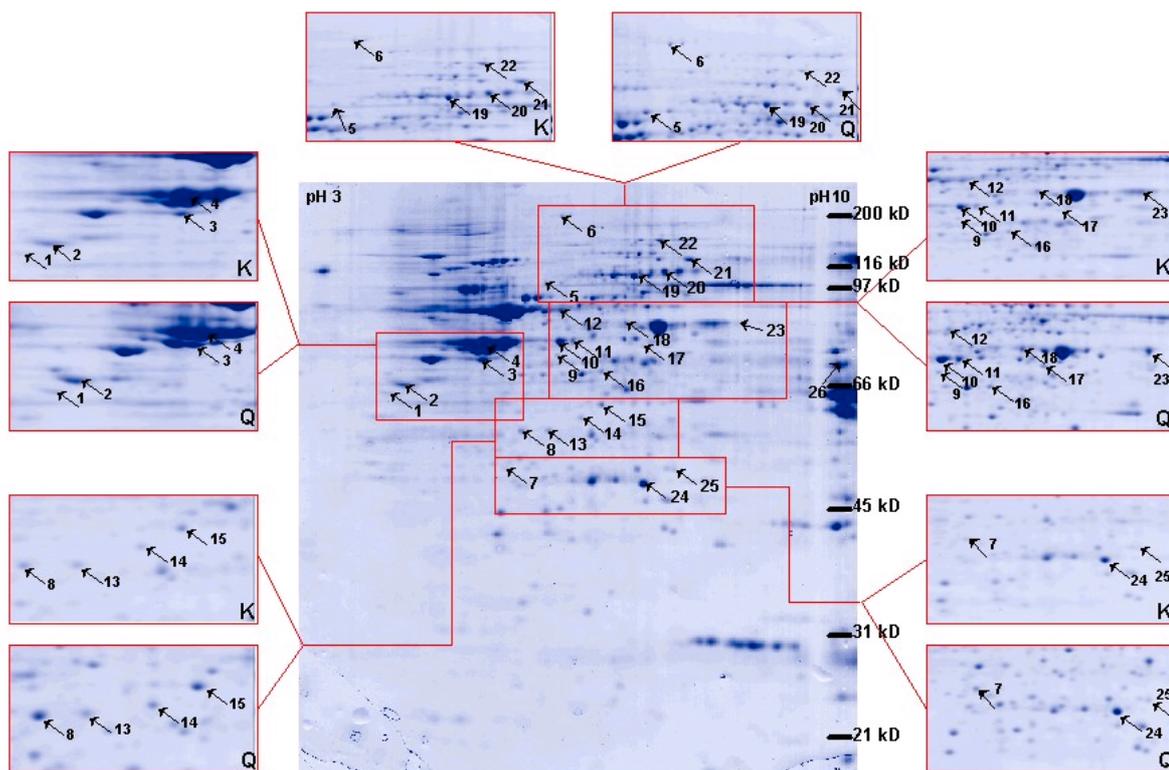
Auch zwei antioxidative Enzyme, die Superoxid-Dismutase (Spot 29, Abb. 30) und Glutathion-S-Transferase (Spot 10, Abb. 30) wurden nach Quercetininkubation der Zellen als regulierte Proteine identifiziert. Die Superoxid-Dismutase wurde in ihrer Spotintensität geschwächt, die Glutathion-S-Transferase dagegen um den Faktor 2 verstärkt. Beide Enzyme dienen der Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und verhindern so, den Angriff der ROS an die DNA<sup>158,159</sup>.

In der Gruppe der genregulatorischen Proteine wurde unter anderem das regulatorische KH-Typ splicing Protein (KRSP) (Spot 21 und 22, Abb. 30) identifiziert. Das Protein wurde in 2 nebeneinanderliegenden Spots identifiziert, wobei aber beide Spots eine durch Quercetin hervorgerufene Volumenverkleinerung zeigten. KRSP wird als Substrat der Caspase 3 und Caspase 7 während der Apoptose gespalten<sup>160 2002</sup>. Das epitheliale Zellmarker-Protein 1 (Stratifin) ist ein weiteres Beispiel eines identifizierten Proteins der Genregulation. Es zeigte durch Quercetininkubation eine Zunahme des Spotvolumens (Spot 8, Abb. 30). Stratifin ist als Tumorsuppressor-Gen bekannt und kann durch Methylierung in epithelialen Tumorzellen inaktiviert werden<sup>161</sup>.



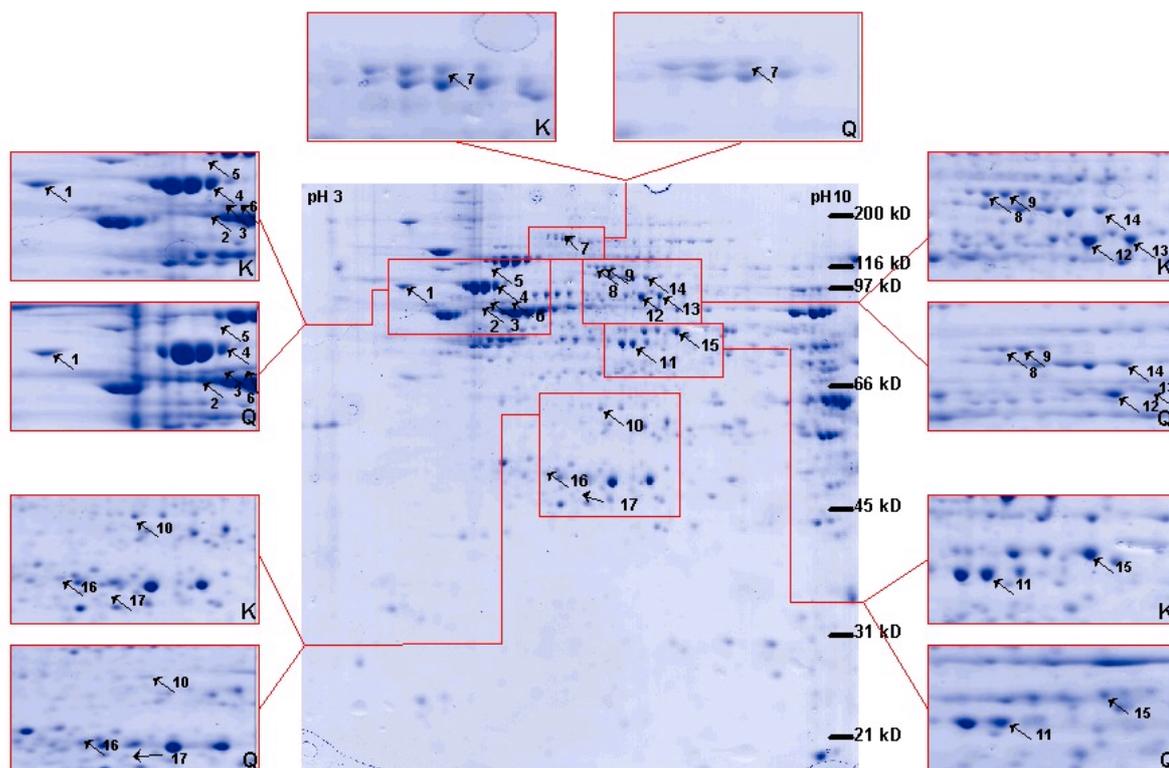
**Abbildung 30: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen aus NCOL-1 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter NCOL-1 Zellen (K) sowie von NCOL-1 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Quercetin inkubiert wurden. 500  $\mu$ g Proteinlysate wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Proteom-Weaver Software.



**Abbildung 31: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit cytosolischen Proteinen aus NCOL-1 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter NCOL-1 Zellen (K) sowie von NCOL-1 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu\text{M}$  Quercetin inkubiert wurden. Die cytosolischen Proteine wurden mit Hilfe des SIGMA-PreoPrep™ Kit abgetrennt. 500  $\mu\text{g}$  Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Proteom-Weaver Software.



**Abbildung 32: Coomassie-gefärbtes 2-DE Gel mit Proteinen der Membranfraktion aus NCOL-1 Zellen.**

Die Abschnitte zeigen die Gegenüberstellung der Proteinmuster unbehandelter NCOL-1 Zellen (K) sowie von NCOL-1 Zellen, die 24 h mit 150  $\mu$ M Quercetin inkubiert wurden. Die Proteine der Membranfraktion wurden mit Hilfe des SIGMA-PreoPrep™ Kit abgetrennt. 500  $\mu$ g Proteinlysat wurden in einem linearen Gradientenstreifen (pH3-10) fokussiert und anschließend in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die nummerierten Spots zeigen im Vergleich zwischen Kontrolle und behandelten Zellen unterschiedliche Intensitäten im normalisierten Spotvolumen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Proteom-Weaver Software.

**Tabelle 19: Unterschiedlich exprimierte Proteine, identifiziert durch MALDI-TOF-MS aus den Einzelfractionen und Gesamtproteinfraktion der NCOL-1 Zellen, nach 24 h Quercetininkubation.** Die Proteine aus der cytosolischen Fraktion sind mit <sup>1</sup>, die aus der Membranfraktion mit <sup>2</sup> gekennzeichnet, Proteine aus dem Gesamtlysat sind nicht markiert. Die Peptidfragmente die zur Identifizierung herangezogen wurden, sind aufgelistet, die Accession number stammt aus der Mascot-Datenbank.

Spot-Nr.	Protein Name	2-DE (F/K)
<b>Proteine des Cytoskeletts</b>		
20	Lamin A	0,5
19	Lamin C	0,6
9	Keratin 19,typ I cytoskeletal	2,0
24	Cytokeratin 18	2,1
23	Desmoplakin I	0,4
2	HUMKER B typ II cytoskeletal 8 <sup>2</sup>	2,3
3	HUMKER B typ II cytoskeletal 8 <sup>2</sup>	2,1
6	HUMKER B typ II cytoskeletal 8 <sup>2</sup>	1,9
7	Mitofilin (HMP) <sup>2</sup>	0,5

1	Plectin <sup>1</sup>	2,3
16	Nucleoporin <sup>1</sup>	2,1
7	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	2,6
30	Profilin	2,3
	<b>Annexine</b>	
11	Annexin 4	2,2
8	Annexin IV <sup>1</sup>	2,0
13	Annexin IV <sup>1</sup>	2,0
	<b>Chaperone</b>	
6	Dnak type molekular chaperone HSP 70-1	3,1
5	Heat shock cognate protein (HSC) 54	4,0
4	HSPA5 chaperone	2,0
4	Heat shock 60kDa protein 1 (Chaperonin) <sup>2</sup>	0,5
1	Protein disulfid isomerase (PDI) precursor <sup>2</sup>	0,5
5	HSTCP1 <sup>1</sup>	2,2
27	ER lumenal protein 28	0,6
	<b>Metabolismus</b>	
13	Isocitrate-DH	0,6
26	Mitochondrial porin	0,5
32	H <sup>+</sup> transporting ATP synthase	0,6
2	Putative acetyltransferase	5,4
18	Phosphoglycerate-DH	2,1
9	Succinate-DH <sup>2</sup>	0,4
11	Ornithin amino transferase (OAT) <sup>1</sup>	2,6
24	Triosephosphate-isomerase <sup>1</sup>	1,9
26	Fructose-biphosphat aldolase <sup>1</sup>	1,8
	<b>Detoxifikation</b>	
29	Superoxide dismutase (SOD)	0,6
10	Glutathione-S-Transferase	2,0
	<b>Kinasen/Phosphatasen</b>	
15	Pyruvate kinase	2,3
12	Serine/threonine specific protein kinase <sup>2</sup>	0,3
	<b>Genregulation</b>	
1	Mitotic checkpoint protein isoform MAD1A	3,8
16	Cell cycle dependent 350 K nuclear protein	1,9
17	Gonadotropin inducible transcription repressor-4 <sup>2</sup>	Nur F und Q
11	Translations elongations factor EF-Tu <sup>2</sup>	0,4
25	Translation initiation factor eIF-3 Prt 1-chain <sup>1</sup>	1,9
21	Fuse binding protein 2 (KRSP)	0,6
22	KSRP	0,3
8	Stratifin	2,1
	<b>Apoptose</b>	
10	Apototic protease activating factor 1 <sup>1</sup>	2,1
	<b>Weitere Proteine</b>	
17	Unknown protein for MGC 15366	Nur Quer
31	Galectin-3 carbohydrate recognition domaine	0,6
25	Phosphoglycerate mutase brain form	1,9
17	NMP 238	1,9
8	KIF 1 B (kinesin superfamily) <sup>2</sup>	0,5
14	Dynamin 1-like protein <sup>2</sup>	0,4
13	GCP 170 <sup>2</sup>	0,4
16	BB152015.1 putat. Mitoch. Outer membrane protein import receptor <sup>2</sup>	3,0
6	KIAA0912 protein <sup>1</sup>	1,8
14	CDNA FLJ 31569 FIS (Transposase) <sup>1</sup>	0,6
7	Truncated rad50 protein <sup>1</sup>	1,9
9	Elastone inhibitor <sup>1</sup>	2,0

## 5 Diskussion

### 5.1 Proteomanalyse zur Identifizierung der Zielproteine von Flavon und Quercetin

Mit Hilfe der Proteomanalyse soll festgestellt werden, welche Proteine von einem gegebenen Genom unter definierten Bedingungen in welcher Quantität exprimiert werden, um auf diese Weise ein besseres Verständnis für die komplexen biologischen Regulationsvorgänge einer Zelle oder eines Organismus zu erhalten. Die 2-DE ermöglicht es dabei, mit einer hohen Auflösung mehrere hundert Proteine parallel zu trennen. Die anschließende Identifizierung der Proteine erfolgt gegenwärtig zumeist durch MALDI-TOF-MS-Analyse.

Die experimentell belegte anti-karzinogene Wirkung vieler sekundärer Pflanzenstoffe, wie z.B. der Flavonoide, wird oft auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt. Die in dieser Arbeit erfolgte Untersuchung der antioxidativen Fähigkeiten ausgewählter Flavonoide in humanen transformierten Kolonozyten (HT-29) und humanen nicht transformierten Kolonozyten (NCOL-1) zeigte, dass nicht alle Polyphenole in der Lage sind, in Zellen als Antioxidans zu wirken. Meist wird die antioxidative Kapazität von Substanzen in zellfreien Systemen nach der TEAC-Methode bestimmt. Mit dieser Methode werden aber nicht das komplexe zelluläre Gleichgewicht von pro- und antioxidativen Systemen und der Metabolismus berücksichtigt<sup>162</sup>. Hier wurde dagegen der antioxidative Effekt der Flavonoide *in vivo* nach der Methode von Mayer *et al.*<sup>124</sup> nach ihrer Aufnahme in die Zellen gemessen, d.h. zellspezifische Mechanismen der ROS Reduktion wurden gleichermaßen miterfasst.

Dabei zeigte sich u.a., dass Quercetin in beiden Zelllinien sowohl Superoxidanionen als auch Wasserstoffperoxid reduzieren konnte, während Flavon keinerlei antioxidative Wirkungen zeigte. Dennoch waren beide Flavonoide in der Lage, Apoptose in HT-29 Kolonkarzinomzellen auszulösen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Induktion der Apoptose durch die Flavonoide in diesen Zellen unabhängig von ihren antioxidativen Eigenschaften verlaufen muss.

In nicht-transformierten NCOL-1 Zellen vermochte nur Quercetin Apoptose auszulösen. Um die Apoptose-induzierenden und zellspezifischen Wirkungen der beiden Flavonoide auf molekularer Ebene zu beschreiben, wurde eine Proteomanalyse von HT-29 und NCOL-1 Zellen nach Exposition gegenüber Flavon bzw. Quercetin durchgeführt.

Einige der durch Flavon und Quercetin in HT-29 regulierten Proteine, die massenspektrometrisch identifiziert wurden, konnten mit den pro-apoptotischen und anti-karzinogenen Wirkungen der Flavonoide in direkten Zusammenhang gebracht werden. Die in ihrem *steady state level* veränderten Proteine wurden zunächst nach ihren Funktionen gruppiert.

#### *Proteine des Cytoskeletts*

Nukleare **Lamine** sind als intermediäre Filamentproteine (IF) die Hauptkomponenten der Kernlamina<sup>163,164</sup>. Während der Apoptose werden die Lamine proteolytisch durch die Caspase-6 gespalten<sup>165-167</sup>. Die deutliche Abnahme der Lamin A und Lamin B1 Spots in der cytosolischen Fraktion der HT-29 Zellen nach Flavon- bzw. Quercetininkubation (24 h) kann auf diese Spaltung zurückgeführt werden. Auch nach 48 h Inkubation konnte bei beiden Flavonoiden noch eine Verringerung der Proteinspots im Gesamtproteinlysate nachgewiesen werden. In den nicht-transformierten NCOL-1 Zellen induziert Quercetin Apoptose, nicht aber Flavon. Entsprechend wurde auch nur nach Quercetinbehandlung eine Abnahme der Lamin A und C Spots beobachtet. Nach Rao *et al.* 1996 ist die Apoptoseinitiation abhängig von der Laminspaltung. In Zellen, die unspaltbare Lamine exprimierten, wurde die Apoptose trotz Aktivierung der Caspasen, um 12-16 h verzögert. Badock *et al.* haben ebenfalls mittels Proteomanalyse gezeigt, dass in apoptotischen humanen Brustepithelzellen (H184A1) Lamin A, B1 und C verglichen zu nicht-apoptotischen Zellen vermindert vorliegen. Die anschließende MS/MS Analyse bestätigte, dass die Lamine A und C durch Caspase-6 an der Linkerregion der alpha-helikalen Domäne in der Sequenz VEID/N<sup>91</sup> bzw. Lamin B1 in der Sequenz VEVD/S<sup>166</sup> während der Apoptose gespalten wurden<sup>168</sup>.

Auch **Keratine** zählen zu den intermediären Filamentproteinen (IF) und sind bereits als Apoptose-assoziierte Proteine beschrieben<sup>169</sup>. Typ I-IF sind die sauren Keratine (K 10-K 20) und zu den Typ II-IF zählen die basischen Keratine (K 1-K 9). Keratin 8 (K 8) und Keratin 18 (K 18) sind die Hauptkomponenten der IF von einfachem Epithelgewebe und kommen stets in gleicher Menge vor<sup>170</sup>. Während der Apoptose werden Typ I-Keratine (z.B. K 18 und K 19) zunächst phosphoryliert und anschließend durch Caspasen an der gleichen Erkennungssequenz wie Lamin B1 gespalten. Typ II-Keratine (z.B. K 8 durch c-Jun N-terminale Kinase JNK) werden im Verlauf der Apoptose ebenfalls phosphoryliert<sup>171</sup>, können durch Caspasen aber nicht

gespalten werden<sup>169</sup>. Ihre Phosphorylierung bedingt die Auflösung des Keratins und die Neuordnung des Filaments bzw. den Zusammenbruch des epithelialen Gewebes, der jedoch reversibel sein kann. MCF7 Brustkrebszellen exprimieren sowohl K 8 als auch K 18. Wird in diesen Zellen Apoptose induziert, so zeigte sich K 8 resistent gegen Caspasespaltung, während K 18 durch die Caspase-6 gespalten wurde<sup>172</sup>. Die Beobachtung der Spaltung von Typ I-Keratinen während der Apoptose konnte auch hier gemacht werden. Nach Flavoninkubation der HT-29 Zellen war eine Abnahme der Spotintensität von Keratin 19 nachweisbar, die durch eine Spaltung durch Caspase-6 erklärt werden könnte. Darüberhinaus zeigten die apoptotischen Zellen auch eine Zunahme des Spotvolumens des Typ II-Keratin 8. Für K 8 und K 18 (anstelle von K 19) war dies auch nach Flavoninkubation in NCOL-1 Zellen zu beobachten, obwohl Flavon in diesen Zellen keine Apoptose auslösen kann. Da Flavon damit in NCOL-1 Zellen die Keratine in gleicher Art und Weise beeinflusste, jedoch die Effekte weniger stark waren als in HT-29 Zellen, scheint diese Wirkung nicht ausreichend zu sein, um auch NCOL-1 Zellen in die Apoptose zu überführen. Auch Quercetin bewirkte in den NCOL-1 Zellen eine Zunahme von K 8, K 18 und K 19, sodass die Keratinexpression folglich keine Bedeutung für die Apoptoseinduktion durch Quercetin in NCOL-1 Zellen zu haben scheint. Möglicherweise resultierten die erhöhten Proteinspiegel aus dem Abbau des Cytoskeletts während der Apoptose, bevor die Keratine vollständig proteolytisch abgebaut werden und für die Analyse leichter zugänglich werden. Eine spezifisch erhöhte Expression scheint somit eher unwahrscheinlich.

**Plectin** gehört zur Familie der Plakine, die eine wichtige Rolle bei der Quervernetzung verschiedener Bestandteile des Cytoskeletts, wie z.B. von Myosin II, Actin oder der Cytokeratine, spielen<sup>173</sup>. In MCF7-Zellen wurde erstmals die Plectinspaltung nach TNF- $\alpha$  induzierter Apoptose durch Caspase-8 beschrieben<sup>125</sup>. Die Flavoninkubation bewirkte in HT-29 Zellen, dass das Plectin nicht mehr nachweisbar war und damit mit der Beobachtung der frühen Spaltung des Plectins in apoptotischen MCF7 Zellen im Einklang steht. Die Studie von Stegh *et al.* zeigt, dass Plectin bereits 4 h vor K 18 und 20 h vor Lamin B gespalten wurde<sup>125</sup>. Die Substratspezifität der Caspasen und ihre unterschiedlichen Aktivierungszeiten während der Apoptose bewirken eine streng hierarchische Spaltung der Cytoskelett-Proteine. Nach 48 h trat der Plectin spot im Gel der mit Flavon behandelten Zellen jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verstärkt auf und auch die

Quercetinbehandlung der NCOL-1 Zellen (24 h) bewirkte einen Anstieg des Plectins. Da Plectin ein aktiver Regulator der Aktincytoskelettdynamik ist<sup>174</sup>, könnte dies ein Zeichen für die kompensatorische Reorganisation des Mikrofilament-Systems von Zellen sein, die der Apoptose entgangen sind.

**Desmoplakin I** gehört ebenfalls zur Plakinfamilie und verbindet Desmosomen mit dem intermediären Filament (z.B. mit K 18). Auch wenn es im Gegensatz zu Plectin keine Caspase-8 Spaltstelle besitzt, wurde es als Caspasesubstrat beschrieben<sup>137,175</sup>. Unter der Annahme einer Caspase vermittelten Spaltung wäre eine Abnahme der Desmoplakin-Spotintensität zu erwarten gewesen, sie stieg jedoch nach Flavoninkubation der HT-29 Zellen nach 24 h in der cytosolischen und Membranfraktion, als auch nach 48 h im Gesamtproteinlysat an. Auch die Quercetininkubation (24 h) bewirkte in HT-29 Zellen einen Anstieg. Nur in NCOL-1 Zellen nahm nach Quercetininkubation der Desmoplakinspiegel ab. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte in der Methode der Proteinaufarbeitung liegen. Während der Apoptose wird Desmoplakin aus dem Cytoskelett vermehrt freigesetzt und ist somit für die Proteinextraktion leichter zugänglich. Nur wenn diese Proteine durch die Caspasen vollständig verdaut werden, kann eine verminderte Spotintensität beobachtet werden. Die MALDI-TOF-MS Analyse erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob die Proteine bereits teilweise gespalten vorgelegen haben, oder noch intakt waren.

Im Gegensatz zu Desmoplakin I gab es in NCOL-1 Zellen zwei Proteine des Cytoskeletts, die nach Quercetininkubation (24 h) eine Zunahme des Spotvolumens zeigten. Zum einen **Profilin**, das als Regulator der Aktinpolymerisation gilt und in intakten Zellen mit dem Aktinbindungspartner Annexin II interagiert<sup>176</sup> und zum anderen **Nucleoporin**, das als Bestandteil des Kernporenkomplexes (NCP) in die Kontrolle der Zellzyklus-Progression, der Genexpression und der Onkogenese involviert ist<sup>177</sup>. Ferrando-May *et al.* haben gezeigt, dass Nucleoporine zu einem späten Zeitpunkt der Apoptosekaskade durch Caspasen gespalten werden<sup>153</sup>. Bei diesen beiden Proteinen ist es naheliegend zu vermuten, dass ihre erhöhten Spiegel nicht durch eine verstärkte Expression, sondern auf die verbesserte Zugänglichkeit der Proteine zurückzuführen sind.

**Cofilin**, **CLP-36** und **Radixin** sind weitere Markerproteine, die den apoptotischen Abbau der Proteine des Cytoskeletts markieren. Sie zeigten nach Flavoninkubation in

HT-29 Zellen bereits nach 24 h eine verminderte Spotintensität, bzw. waren wie im Fall des CLP-36 nicht mehr nachweisbar.

Stathmin, ein cytosolisches Phosphoprotein spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der zellulären Proliferation. Seine Hauptfunktion ist die Promotion der Depolymerisation der Mikrotubuli, die den mitotischen Spindelapparat ausbilden<sup>178</sup>. Stathmin wird in einer Vielzahl humaner Tumoren vermehrt exprimiert, besonders in Lymphomen und bei Leukämie<sup>179</sup>. Eine Hemmung der Stathminexpression revertiert den transformierten Phänotyp von Zellen dadurch, dass es zu Veränderungen in der Zellzyklusprogression kommt<sup>133</sup>. In HT-29 Zellen wurde Stathmin durch Flavon sowohl nach 24 h als auch nach 48 h vermindert vorgefunden, während Quercetin erst nach 48 h eine Reduktion des Stathminspiegels bewirkte. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Flavon und Quercetin durch die Hemmung der Stathminexpression in die Progression des Zellzyklus eingreifen.

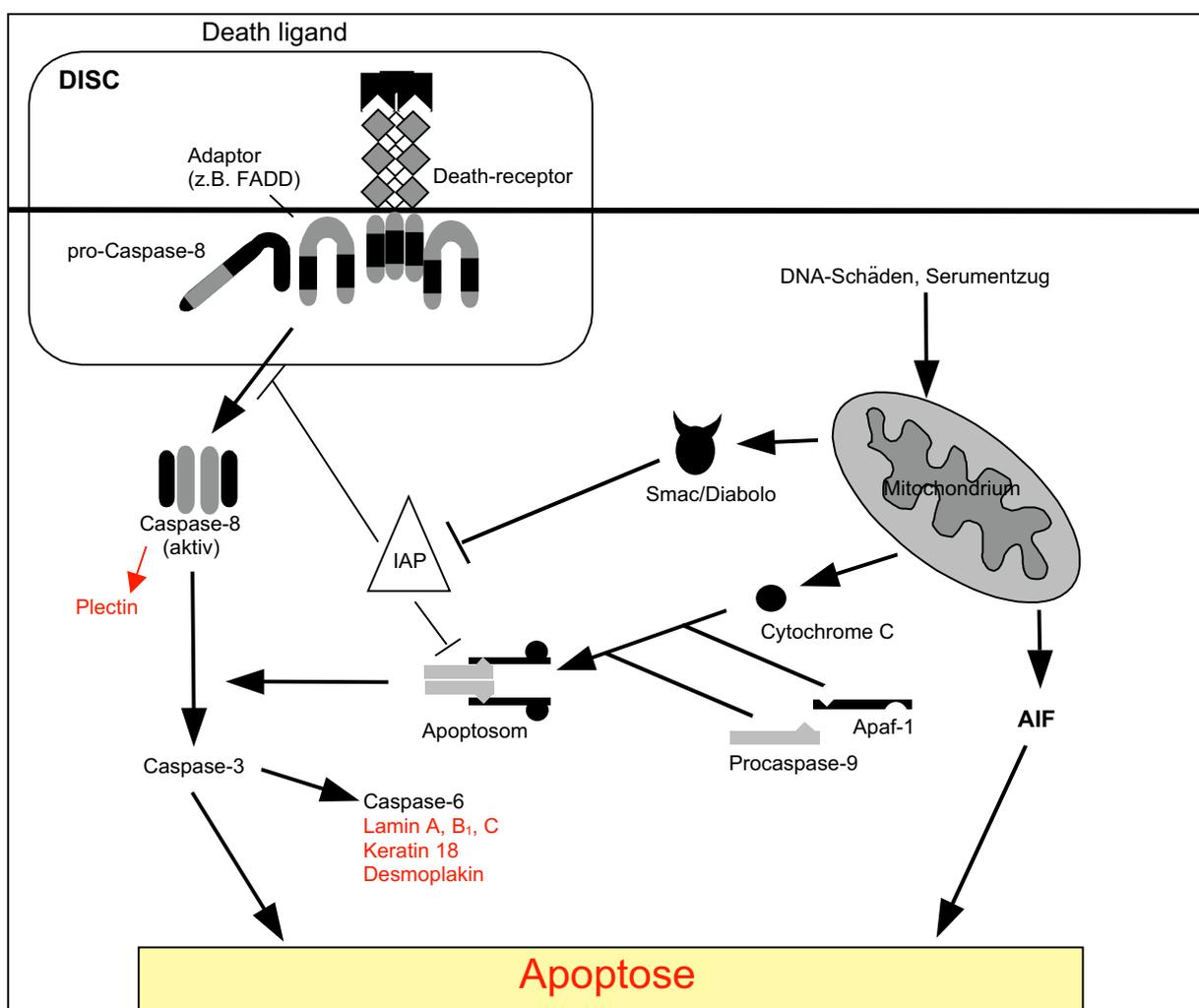


Abbildung 33: Spaltung der Proteine des Cytoskeletts durch aktivierte Caspasen im Verlauf der Apoptose.

### *Annexine*

Annexine sind eine Familie von löslichen, hydrophilen Proteinen, die in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  an negativ geladene Phospholipide binden. Auffällige Unterschiede bestehen in ihrer Lokalisation. Während Annexin I hauptsächlich in Endosomen vorkommt, assoziiert Annexin IV mit Plasmamembranen und Annexin II ist im Cytosol verteilt<sup>180</sup>. Annexine wie z.B. Annexin I, II und IV regulieren die Aggregation von Membranvesikeln<sup>181</sup>.

Der Proteinmustervergleich von normalen und apoptotischen HT-29 Zellen hat eine deutliche Zunahme des **Annexin I** Spots unter Flavonwirkung (48 h) gezeigt und auch nach Quercetininkubation (48 h) war eine leichte Zunahme des Annexin I-Spots zu verzeichnen. Annexin I wurde bereits in Studien von Solito *et al.* und Canaider *et al.* in Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspase-3 und somit als Promotor der Apoptose beschrieben<sup>182</sup>. Dies lässt vermuten, dass auch hier in HT-29 Zellen Annexin I unter der Wirkung beider Flavonoide an der Auslösung der Apoptose beteiligt ist und vermehrt exprimiert wurde.

**Annexin II** liegt in humanen Kolonkarzinomzellen verglichen mit nicht transformierten Zellen stärker exprimiert vor<sup>183</sup> und ist vermutlich mit der Progression des Tumors und dessen metastatischer Ausbreitung verknüpft<sup>184</sup>. Die Reduktion des Annexin II Spiegels geht daher unter Flavongabe mit der Einleitung der Apoptose in HT-29 einher. Nach 48 h steigt jedoch die Konzentration an Annexin II in den Flavon exponierten Zellen verglichen mit den Kontrollzellen deutlich an und auch die Quercetininkubation bewirkt sowohl nach 24 h als auch nach 48 h in HT-29 Zellen eine Spotvergrößerung. Annexin II liegt in Gegenwart von Calcium fast ausschließlich an die Zellmembran mit Aktin gebunden vor. Nur bei Calcium-Entzug wird es freigesetzt und wandert zum Zellkern<sup>185</sup>. Im Verlauf der Apoptose wird das Aktingerüst abgebaut und so könnte die Freisetzung des Annexin II erleichtert werden. Analog zu den zuvor diskutierten Proteinen des Cytoskeletts, könnte die Spotvergrößerung damit auf der Tatsache beruhen, dass Annexin II im Verlauf der Apoptose nicht mehr fest gebunden an die Membranen vorliegt und für die 2-DE Analyse leichter zugänglich wird.

Der Proteinspot des **Annexin IV** wurde in HT-29 Zellen durch Flavon und in NCOL-1 Zellen durch Quercetin in der cytosolischen Fraktion bereits nach 24 h erhöht. Die Bedeutung von Annexin IV in der Apoptose wurde von Sohma *et al.* bei der Untersuchung des Effektes von Ethanol auf humane Adenokarzinomzellen A 549

aufgezeigt, wonach vor dem Auslösen der Apoptose und vor dem damit verbundenen Anstieg der Caspase-3 Aktivität eine erhöhte Expression des Annexin IV zu verzeichnen ist<sup>186</sup>.

**Annexin VI** dient als Bindungspartner des Aktins der Verbindung von Membrancytoskelett und hat als weiteren Bindungspartner das Spektrin<sup>187</sup>. Annexin VI zeigte nach 24 h Flavoninkubation eine Verminderung des Proteinspots in HT-29 Zellen, was auf den Abbau des Cytoskeletts während der Apoptose zurückzuführen sein mag.

### *Chaperone*

Die hochkonservierten Hitze-Schock Proteine (HSP) werden vermehrt in Zellen exprimiert, die durch Hitze oder andere Faktoren gestresst werden. HSPs reagieren hauptsächlich wie Chaperone, d.h. sie sind für den Import von Proteinen in zelluläre Kompartimente, die korrekte Proteinfaltung, den Abbau instabiler Proteine, die Prävention von Proteinaggregation und die Kontrolle regulatorischer Proteine verantwortlich. HSPs werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte in Gruppen eingeteilt. HSP27 und HSP70 haben überwiegend einen anti-apoptotischen Effekt, während HSP60 und HSP10 hauptsächlich stimulierend auf die Apoptose wirken<sup>127</sup>.

Das **HSP60** der Säugetiere wird auch **Chaperonin** genannt und tritt hauptsächlich in der mitochondrialen Matrix auf. Es ist zuständig für die korrekte Faltung der mitochondrialen Proteine in Abhängigkeit von ATP. Die pro-apoptotische Wirkung des Chaperonins wurde von 2 unabhängigen Gruppen aufgezeigt. Sowohl in Jurkat- als auch in Hela-Zellen war die Aktivierung von Caspase-3 durch Camptothecin zum einen mit der Freisetzung von HSP60 aus den Mitochondrien verknüpft, zum anderen wurde die Caspase-3 Aktivität durch HSP60 erhöht<sup>188,189</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Lin *et al.*, dass HSP60 zusammen mit HSP10 in Herzmyozyten die Freilassung von Cytochrom C aus den Mitochondrien vermindern kann und somit einen anti-apoptotischen Effekt besitzt<sup>190</sup>. In HT-29 Zellen, wo die Apoptose nach 24 h durch Flavon maximal stimuliert ist, war zu diesem Zeitpunkt HSP60 fast nicht mehr nachweisbar und erst nach 48 h Inkubation, zu einem Zeitpunkt, an dem die Caspase-3 Aktivität schon wieder reduziert ist<sup>191</sup>, wurde eine deutliche Zunahme des HSP60 Spiegels beobachtet. Auch nach Quercetin ließ sich ein ähnlicher Verlauf des Chaperonin-Spiegels zeigen. Wenn HSP60 einen Einfluss auf die Apoptose in HT-29

Zellen haben sollte, dann vermutlich nur zu einem späteren Zeitpunkt und nicht in der Initiationsphase. Es bleibt jedoch unbeantwortet, ob die vermehrte Expression von HSP60 nach 48 h eine Kompensationsreaktion in HT-29 Zellen darstellt, um durch Hemmung der Cytochrom C Freisetzung die Apoptose zu stoppen, oder ob Flavon zu diesem Zeitpunkt die Expression von HSP60 stimuliert, um durch die mögliche Aktivitätssteigerung der Caspase-3, den Zelltod voranzutreiben.

In den nicht-transformierten NCOL-1 Zellen konnte nach Quercetinbehandlung (24 h) eine zelluläre Umverteilung des HSP60 beobachtet werden. Während der Spot in der Kernfraktion verglichen zur Kontrolle vermindert wurde, war in der cytosolischen Fraktion eine deutliche Zunahme des Spots zu erkennen. In Analogie zu den Befunden von Smamli *et al.* und Xanthoudakis *et al.* kann vermutet werden, dass Quercetin in NCOL-1 Zellen den HSP60-Release aus den Mitochondrien ins Cytosol schneller stimuliert, als in den HT-29 Zellen und somit die Apoptose durch Aktivierung der Caspase-3 fördert. Nach Lin *et al.*, könnte die vermehrte HSP60 Expression aber auch als Schutzreaktion der Zelle vor dem Zelltod gewertet werden. Durch Flavon wurde nach 24 h Inkubation in NCOL-1 Zellen wie in HT-29 Zellen eine Verminderung des HSP60 Spots beobachtet, obwohl in NCOL-1 Zellen Flavon keine Apoptose auslöst. Dies lässt annehmen, dass HSP60 einen anti-apoptotischen Effekt haben kann bzw. dass HSP60 zumindest in der Initiationsphase der Apoptose keine pro-apoptotische Funktion besitzt.

Menschliche Zellen enthalten verschiedene Proteine der **HSP70** Familie. Dazu gehören u.a. die durch Stress induzierbaren HSP70 Proteine und die konstitutiv exprimierten HSC70 Proteine. Unter normalen Bedingungen wirken auch die HSP70 Proteine als Chaperone<sup>192</sup>. Außerdem haben Proteine der HSP70 Familie die Fähigkeit, Apoptose zu verhindern, die durch anti-kanzerogene Substanzen induziert wurde<sup>141,142</sup>. Li *et al.* beschreiben, dass HSP70 Apoptose inhibiert, indem es einerseits auch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und andererseits durch Bindung an APAF-1 die Bildung des Apoptosoms verhindert<sup>193</sup>. Außerdem besitzt HSP70 die Fähigkeit, Caspase-unabhängig, die Apoptose zu verhindern, indem es an den Apoptose-induzierenden Faktor AIF bindet und so die Chromatinkondensation hemmt<sup>194</sup>.

In vielen hochgradig malignen Tumoren wurden erhöhte Spiegel des HSP70 Proteins gefunden, und hohe HSP70 Konzentrationen scheinen mit der Malignität von z.B. Nierentumoren zu korrelieren<sup>195</sup>. In HT-29 Zellen wurde nach 24 h Inkubation mit

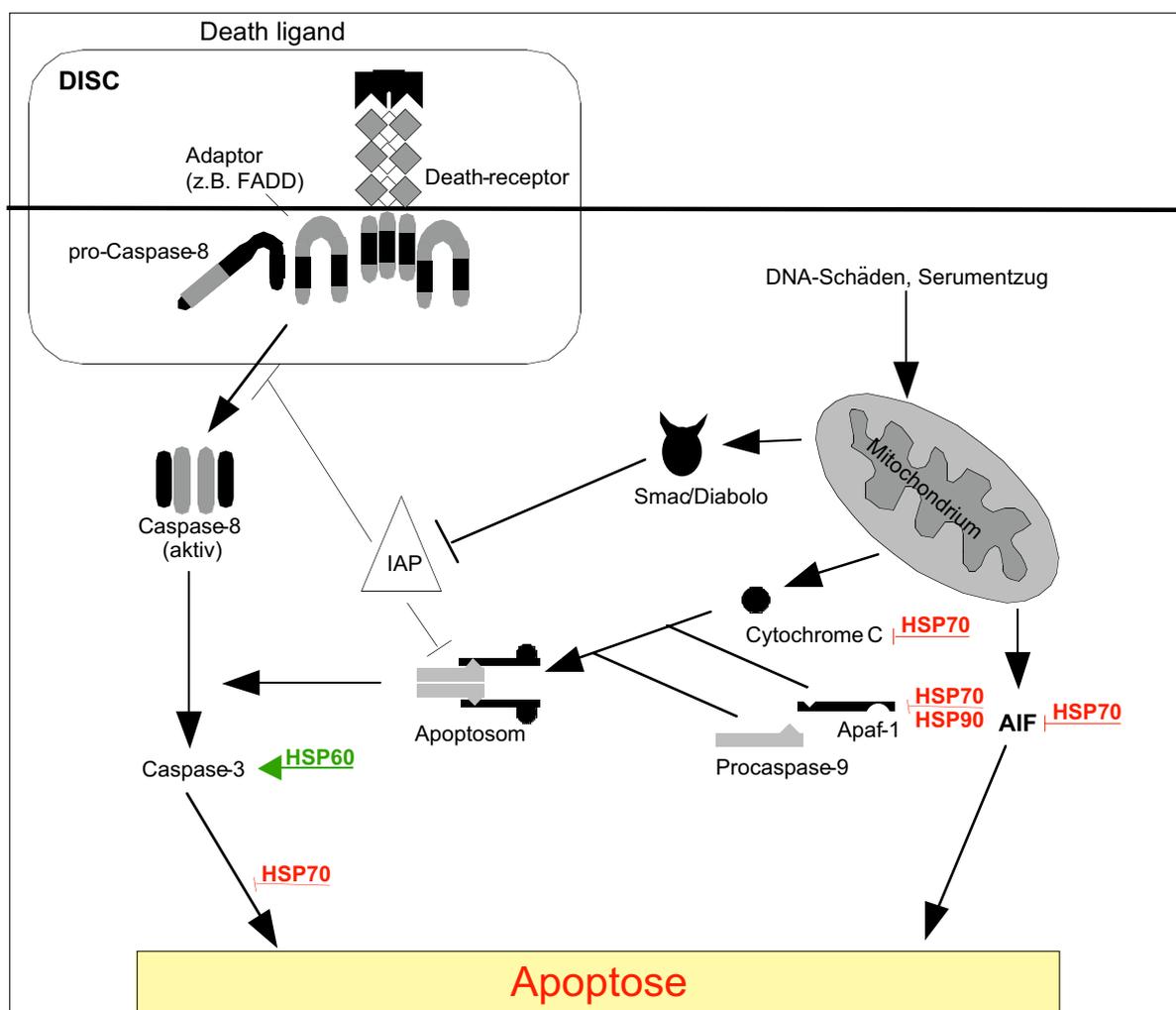
Quercetin eine Abnahme der HSP70-1 Konzentration beobachtet, was für den apoptotischen und anti-karzinogenen Effekt von Quercetin spricht. Obwohl Quercetin auch in NCOL-1 Zellen apoptotisch wirkt, ist beim HSP70 Spiegel nach 24 h ein Anstieg zu beobachten und nach Flavoninkubation eine Verminderung, obwohl Flavon keine Apoptose vermittelt. Dies zeigt, dass HSP70 als ein wichtiger Tumormarker in HT-29 Zellen durch Quercetin reduziert wird, HSP70 aber in NCOL-1 Zellen keine Rolle für die Apoptose spielen kann.

Das Protein HSC54 ist eine Variante des HSC70 Proteins und hat unter normalen Bedingungen im endoplasmatischen Retikulum (ER) eine wichtige Aufgabe bei der Faltung und Stabilisierung neu synthetisierter Polypeptide<sup>196</sup>. Seine Synthese kann durch die Aktivität der Superoxid Dismutase (SOD) unterdrückt und entsprechend durch SOD-Inhibitoren verstärkt werden<sup>197</sup>. Eine nukleäre Translokation von HSC70 findet vor allem bei oxidativem Stress statt, kann aber auch bei Apoptose beobachtet werden. Beim oxidativen Stress werden Kernproteine durch Radikale zerstört und HSC70 wird folglich zum Kern transportiert, um die Proteinfaltung zu katalysieren. Eine verstärkte Expression von HSC70 dient damit dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress<sup>198</sup>. In NCOL-1 Zellen wurde nach Inkubation mit Quercetin (24 h) eine Zunahme des HSC70-Spiegels beobachtet, was eventuell auf den Versuch der Zelle zurückzuführen ist, die Proteinfaltung der durch oxidativen Stress veränderten Proteine durch HSC70 zu katalysieren, damit sie wieder ihre entsprechende Konformation erhalten<sup>199</sup>.

Ein weiteres Protein der HSP70-Gruppe ist das BiP oder auch GRP78 (Glukose-reguliertes Protein 78). Das BiP-Protein wirkt hauptsächlich im ER als Chaperon, um neu synthetisierte Proteine zu stabilisieren, sie durch die ER-Membran zu transportieren und fehlgefaltete Proteine abzubauen<sup>200</sup>. Nach Rao *et al.* soll BiP regulatorisch in die Apoptose eingreifen, indem es die Zelle gegen den vom ER ausgehenden Zelltod schützt. Im zellfreien System hemmt GRP78 die Cytochrom C regulierte Caspase-Aktivierung, in der Zelle blockiert die GRP78 Expression die Caspaseaktivität und folglich die Apoptose<sup>201</sup>. Der BiP-Spiegel wurde nach Flavoninkubation (48 h) in HT-29 Zellen erhöht und auch nach Quercetinbehandlung (24 h) in der cytosolischen Fraktion verstärkt vorgefunden. Diese Zunahme könnte als kompensatorischer Mechanismus der Zellen zur Induktion der Apoptose gewertet werden. Auch GrpE zählt zur Gruppe der HSP70-Proteine und zeigt eine anti-apoptotische Wirkung. Die Reduktion seines Spiegels nach Quercetininkubation

deutet darauf hin, dass Quercetin unter anderem durch Angriff auf diese anti-apoptotischen Faktoren die Apoptose in Zellen fördern kann.

Die **Protein Disulfid-Isomerase** (PDI) wird analog zu den Chaperonen durch Stress in Zellen überexprimiert. Speziell als Antwort auf Blutarmut in Astrocyten wurde die verstärkte Expression der PDI beobachtet. Ihre Überexpression in Neuronen schützt diese bei geringer Durchblutungsrate des Gehirns vor Apoptose<sup>202</sup>. In HT-29 Zellen wurde der Spiegel der PDI durch Flavon sowohl nach 24 h als auch nach 48 h erhöht. Analog zur Hochregulierung des BiP-Proteins könnte dies als eine Gegenregulation der Zelle zum weiteren Schutz vor Apoptose gedeutet werden. Quercetin (24 h) bewirkte dagegen in der Kernfraktion der HT-29 Zellen eine Abnahme der PDI. Da jedoch keine Zunahme an PDI in der cytosolischen Fraktion zu erkennen war, handelte es sich sehr wahrscheinlich nicht um eine Translokation sondern eher um den Abbau des Proteins.



**Abbildung 34: Interaktion der Chaperone mit Reaktionsketten der Apoptose.**

Pfeile bedeuten eine Aktivierung der jeweiligen Apoptosefaktoren, eine T-Linie eine Hemmung.

### *Proteine der Detoxifikation*

Die Regulation der durch Stress provozierten Apoptose wird durch die Katalase auf zwei Wegen beeinflusst; einerseits durch eine direkte anti-apoptotische Wirkung der Katalase als antioxidatives System und andererseits durch einen indirekten pro-apoptotischen Effekt, indem sie als Suppressor von protektiven Proteinen, wie HSP70 und HSP27, bereits zu einem frühen apoptotischen Zeitpunkt wirkt. Auch die Stimulierung der Caspase-3 und -9 Aktivitäten bzw. die Verstärkung des Ausstroms von Cytochrom C aus den Mitochondrien durch die Katalase wirken promovierend auf die Apoptose<sup>203</sup>. In HT-29 Zellen wurde der Katalasespiegel sowohl durch Quercetin als auch durch Flavon nach 24 h Inkubation erniedrigt, wodurch die mögliche anti-apoptotische Wirkung der Katalase minimiert und die pro-apoptotischen Effekte der beiden Flavonoide verstärkt wird. Die Langzeitexposition gegenüber Flavon bewirkte jedoch eine vermehrte Expression der Katalase, wodurch die Aktivierung der Caspasen bzw. die Freilassung von Cytochrom C aus Mitochondrien gefördert werden könnte.

Die Superoxid-Dismutase (SOD) wurde bereits im Zusammenhang mit der Regulation des HSC70 angesprochen, da das anti-apoptotisch wirkende HSC70 in seiner Expression durch SOD gehemmt wird<sup>197</sup>. Obwohl Quercetin auch in NCOL-1 Zellen Apoptose auslösen konnte, wurde nach 24 h Quercetininkubation in den Zellen eine Abnahme des SOD-Spiegels beobachtet, der gleichzeitig mit einem Anstieg der HSC70 Expression assoziiert war. Daraus kann abgeleitet werden, dass Apoptose in NCOL-1 Zellen vermutlich nicht durch die Verminderung des HSC70-Spiegels vermittelt wird.

Die Glutathion-S-Transferase kann chemische Kanzerogene in weniger toxische oder inaktive Metabolite umwandeln und dadurch die DNA-Adduktbildung, den initialen Schritt der chemischen Kanzerogenese, reduzieren<sup>159</sup>. Ein hoher Spiegel der Glutathion-S-Transferase im Blut oder Plasma dient als früher Biomarker der Krebsentstehung in verschiedenen Organen. Durch die verminderte Spotintensität nach Flavoninkubation (24 h) in HT-29 Zellen lässt sich Flavon damit auch eine anti-kanzerogene Wirkung zuschreiben. Nach 48 h war in HT-29 Zellen die Konzentration der Glutathion-S-Transferase jedoch erhöht. Nach Quercetininkubation (24 h) wurde auch in NCOL-1 Zellen eine Zunahme des Proteinspots beobachtet. Diese Enzymzunahme könnte damit ein Versuch der Zelle sein, eine Resistenz gegenüber den Flavonoiden auszubilden.

Die Thioredoxin Peroxidase wurde durch Flavon nach 24 h und 48 h und durch Quercetin nach 24 h Inkubation in HT-29 Zellen vermehrt vorgefunden. Experimentell wurde gezeigt, dass Thioredoxine Zellen vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Apoptose schützen können, jedoch nicht vor Apoptose, die durch andere Faktoren ausgelöst wird<sup>189</sup>. Da die durch Flavon und Quercetin ausgelöste Apoptose in HT-29 Zellen jedoch nicht durch die vermehrt exprimierte Thioredoxin Peroxidase zu verhindern war, ist zu vermuten, dass die Apoptoseinduktion in diesen Zellen nicht mit der Bildung von Wasserstoffperoxid assoziiert ist. Die Versuche zur antioxidativen Kapazität der Flavonoide haben zudem gezeigt, dass Quercetin selbst Wasserstoffperoxid reduziert.

#### *Proteine des Metabolismus*

Eine Reihe von Proteinen des intermediären Stoffwechsels wurden ebenfalls als reguliert identifiziert. Enzyme, die Produkte für den Krebs-Zyklus bereitstellen oder selbst Teil von ihm wurden und Proteine der Atmungskette sind nach Flavon- bzw. Quercetininkubation in HT-29 Zellen fast alle vermindert vorgefunden. Dazu zählen die Glutamat-Dehydrogenase (DH), Succinat-DH, Isocitrat-DH, NADH-DH und die Aconitat-DH. Die Succinat-DH und die Isocitrat-DH zeigten auch in NCOL-1 Zellen nach 24 h Quercetininkubation einen reduzierten Spiegel.

Nach 48 h wurden die Succinat-DH, die Glutamat-DH und die Acyl-CoA-DH in HT-29 Zellen jedoch stark hochreguliert. Diese Veränderungen können auf eine Umstellung des Energiestoffwechsels der Zellen zurückzuführen sein. Neuere Studien haben gezeigt, dass in den ersten 6 Stunden der Flavoninkubation ein verstärkter Laktat influx in die Mitochondrien auftritt und damit ein verstärkter Flux von Substraten durch die Atmungskette ermöglicht wird, der zu einer vermehrten Produktion von Superoxidanionen beiträgt, die ihrerseits die Apoptose fördern [Wenzel, IJC, in press]. Die verminderten Spiegel der metabolischen Enzyme die hier nach 24 h beobachtet wurde, könnten eine negative Rückkopplung auf diesen erhöhten Substratflux sein.

#### *Kinasen und Phosphatasen*

Weitere interessante Proteine, deren Regulation eine Erklärung für die Wirkung von Flavon und Quercetin sein könnte, sind die Kinasen und Phosphatasen. Die MAP-Kinase liegt beispielsweise in HT-29 Zellen nach 24 h und 48 h Flavonbehandlung

vermindert vor und ist nach Quercetinbehandlung (24 h) nur noch in den Kontrollzellen detektierbar. In einem *in vivo* Rattenmodell für das CRC wurde gezeigt, dass die MAP-Kinase in fortgeschrittenem CRC Stadium vermehrt exprimiert wird<sup>204</sup>. Als primäres Zielprotein des Flavons wurde die PKC-beta identifiziert, die nach 24 h Flavoninkubation nicht mehr nachweisbar war. Erhöhte Expressionslevel der PKC-beta gelten als Marker in Initiation und Progression des CRC<sup>205</sup>. Es ist außerdem belegt, dass die PKC-beta den Darmkrebszellen eine Resistenz gegenüber Apoptose-auslösenden Antitumoragentien verleiht<sup>206</sup>.

#### *Proteine der Genregulation und des Zellzyklus*

Scott *et al.* haben das bei Brust- und Prostata-Karzinomen fehlerhafte Tumor Suppressor Gen *Growth arrest specific protein 11* (GAS 11) charakterisiert. In beiden Karzinomen fehlt eine Region (16q24.3) des Chromosoms 16 vollständig, sodass eine Fehlfunktion des GAS 11 anzunehmen ist<sup>207</sup>. Expressionsstudien des homologen Gens in der Maus haben gezeigt, dass es spezifisch während des Zellzyklusarrest exprimiert wird<sup>208</sup>. In der vorliegenden Studie konnte nach Flavongabe (24 h) ebenfalls ein Anstieg des Proteinspots beobachtet werden, was mit der Wirkung des Flavons auf den Zellzyklus und Apoptose in Einklang zu bringen ist.

Seok *et al.* haben das KRSP/ FUSE 2 (Far upstream element binding protein 2) als Substrat der Caspasen 3 und 7 identifiziert<sup>160</sup>. Diesen Befund konnte auch die Proteom-Studie an Jurkat T Zellen bestätigen, in der durch subtraktive Analyse apoptotische und nicht apoptotische Zellen verglichen wurden und ein regulierter Spot als KRSP identifiziert wurde. Die Spotverkleinerung in NCOL-1 Zellen nach 24 h Quercetininkubation des als KRSP identifizierten Proteins, kann folglich auf die proteolytische Spaltung während der Apoptose zurückgeführt werden.

#### *Apoptose*

Mehrere Proteine, der Apoptose-Kaskade wurden nach Flavoninkubation der NCOL-1 Zellen als reguliert vorgefunden. Apaf-1, das zusammen mit Caspase-9 und Cytochrom C in Anwesenheit von ATP das Proteasom bildet, das wiederum direkt die Aktivität von Caspase-3 induzieren kann, wurde durch die Flavoninkubation verstärkt und auch der Proteinspot des Proteasoms konnte als verstärkt identifiziert werden. Obwohl Flavon in NCOL-1 Zellen keine Apoptose auslöst, wurden die Proteinspots

der beiden pro-apoptischen Proteine vergrößert, was folglich keine Bedeutung für die Aktivierung der Caspase-3 haben kann.

### *Schlussfolgerung*

Die Methodik der 2-DE ermöglichte es, durch den subtraktiven Vergleich der 2-D Gele Proteine in Kolonozyten zu identifizieren, die unter Einwirkung von zwei Flavonoiden mit unterschiedlichem antioxidativen Potential, eine Änderung ihrer Expressionshöhe in Folge veränderter Transkription oder Änderungen der Stabilität erfuhren. Durch den Vergleich des Proteoms von HT-29 und NCOL-1 Zellen nach Exposition gegenüber Flavon, konnten Proteine identifiziert werden, die eindeutig der Apoptoseregulation zuzuordnen waren und damit - da Flavon spezifisch nur in HT-29 Zellen Apoptose auslöst - auch als spezifische Marker verstanden werden können. So wurden z.B. die Spiegel der anti-apoptischen Proteine Stathmin und die beiden Enzyme Katalase und MAP-Kinase als Zeichen für die eingeleitete Apoptose in HT-29 erniedrigt, bzw. die der pro-apoptischen Proteine Annexin I und in der spät-apoptischen Phase auch des HSP60 in HT-29 erhöht. Auch die durch Flavon in ihrer Expression verminderte PKC-beta, die aktivierend auf die Tumorentstehung und -promotion wirkt, kann als Markerprotein für das Apoptosegeschehen angesehen werden. Diese Proteine wurden unter Flavonwirkung in NCOL-1 Zellen nicht reguliert (siehe Tabelle 20). Quercetin bewirkte in HT-29 Zellen die Regulation einiger Proteine, die auch durch Flavon in ihrer Expression verändert wurden. So wurden auch durch Quercetin die Spiegel von Stathmin, Katalase und MAP-Kinase vermindert und von Annexin I bzw. HSP60 erhöht. Sie können daher auch als generelle Apoptosemarker in den transformierten Kolonozyten angesehen werden (siehe Tabelle 20).

Im Falle des Flavons wurden allerdings zusätzliche, für die Apoptose relevante Proteine als reguliert vorgefunden, was möglicherweise die drastisch erhöhte Caspase-3 Aktivität nach Flavoninkubation erklären mag. Zum einen konnte zusätzlich die Abnahme der Cytoskelettproteine Cofilin, CLP-36 und Radixin beobachtet werden, zum anderen wurde ein Protein das den Zellzyklusarrest fördert (GAS 11) nach Flavoninkubation verstärkt exprimiert.

In NCOL-1 Zellen wurde nur durch Quercetin die Apoptose ausgelöst, verbunden mit der Verminderung der anti-apoptotischen Proteine Desmoplakin und KRSP und erhöhtem Vorkommen des pro-apoptotischen Annexins IV und HSP60. Diese Proteine wurden in NCOL-1 Zellen durch Flavon nicht reguliert.

Neben Proteinen, die selbst eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung aufweisen, können auch solche Proteine als Marker der Apoptose dienen, die als Folge der Apoptose in ihrem Spiegel beeinflusst werden. So ist u.a. der Abbau des Cytoskeletts durch aktivierte Caspasen in apoptotischen Zellen mit der Verminderung der Spiegel verschiedener Cytoskelettproteine verbunden, so dass z.B. die Lamine als eindeutige Marker von apoptotischen Zellen angesehen werden können.

**Tabelle 20: Potentielle Markerproteine der Apoptose in HT-29 Zellen hervorgerufen durch Flavon-bzw. Quercetin-Exposition.**

	Flavon	Quercetin
Pro-apoptotische Proteine ↑	Annexin I Chaperonin (HSP60)	Annexin I Chaperonin (HSP60)
Zellzyklusarrest ↑	GAS 11	
Anti-apoptotische Proteine ↓	Stathmin Catalase MAP-Kinase Proteinkinase C beta	Stathmin Catalase MAP-Kinase
Caspase-Substrate ↓	Cofilin CLP-36 Radixin Lamin A,B	Lamin A,B

**Tabelle 21: Potentielle Markerproteine der Apoptose in NCOL-1 Zellen hervorgerufen durch Quercetin-nicht aber durch Flavon-Exposition.**

	Quercetin
Pro-apoptotische Proteine ↑	Chaperonin (HSP60) Annexin IV
Anti-apoptotische Proteine ↓	Desmoplakin KRSP
Caspase-Substrate ↓	Lamin A,C

## **5.2 DNA-Array zur Analyse der Wirkung von Flavon auf das Transkriptom von HT-29 Zellen**

Um die Effekte des Flavons in HT-29 Zellen auch auf Genexpressionsebene zu analysieren, dienten Oligonukleotid-Arrays. Nach Flavoninkubation wurden eine Vielzahl von mRNAs in ihrer Expression verändert vorgefunden. Die Gruppierung der regulierten Transkripte erfolgte anhand der Funktion der korrespondierenden Proteine, für die sie kodieren. Transkripte mit verändertem Spiegel konnten dem Metabolismus, der Signaltransduktion, der Transkription, der Immunfunktion, der Krebsentwicklung, der Zell-Zell Interaktion, dem Cytoskelett, dem Wachstums/Differentiation und / oder der Zellzykluskontrolle sowie dem vesikulären Transport zugeordnet werden.

Die in der Proteomanalyse identifizierte Regulation der PKC-beta ließ bereits vermuten, dass Flavon auch in die Signaltransduktion der Zelle eingreift. Entsprechend zeigte die Array-Analyse, dass 73 der 488 mindestens 2-fach durch Flavon regulierten mRNAs Signaltransduktionswegen zugeordnet werden können. Die mit der MAP-Kinase interagierende Ser/Thr Kinase 1 wurde 3-fach im mRNA-Spiegel erhöht. Der mRNA-Spiegel von Erbin, einem erb-B2 interagierenden Protein, wurde durch Flavon ebenfalls signifikant erhöht. Erbin ist in der Lage, den MAP-Kinase Signalweg zu hemmen<sup>209</sup> und dies könnte auch auf eine Rolle von Flavon in der Hemmung der Angiogenese von Tumoren hindeuten. So wurde gezeigt, dass der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) in der Lage ist, den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) über den MAP-Kinase Signalweg zu induzieren. Die Induktion beider Faktoren konnte durch Inhibitoren des MAP-Kinase Signalwegs geblockt werden<sup>210</sup>. Die Hemmung der Angiogenese kann auch durch eine erhöhte Expression von Notch-4 gefördert werden<sup>211</sup>, das nach Flavonbehandlung auf mRNA-Ebene ebenfalls verstärkt exprimiert war. Die STAT Proteine (Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription) sind cytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die durch Tyrosin-Phosphorylierung als Antwort auf eine Stimulierung mit Cytokinen aktiviert werden. Die erhöhten mRNA-Spiegel eines Proteininhibitors von aktiviertem STAT, die unter Flavonexposition vorgefunden wurden, könnten die Aktivität der STAT Proteine reduzieren<sup>212</sup>. Flavon beeinflusste weiterhin eine Reihe von mRNAs, die mit den G-Protein gekoppelten Signalwegen verbunden sind.

Im Rahmen der Proteom-Analyse wurden eine Reihe von regulierten Proteinen identifiziert, die Bestandteile des Cytoskeletts sind. Auch die DNA-Array Daten zeigten, dass 23 mRNAs von Proteinen des Cytoskeletts nach Flavoninkubation in ihrem Spiegel beeinflusst waren, so z.B. die mRNA-Spiegel der Aktin-bindenden und das Cytoskelett stabilisierende Proteine Profilin, Thymosin beta-4 und Platin-3, die um mehr als die Hälfte reduziert vorlagen. Die mRNA-Menge des beta-Aktin wurde sogar auf ein Drittel des Kontrollwertes vermindert. Analog der Proteomanalyse wurden auch mit der Array-Analyse mRNAs von Cytoskelettproteinen identifiziert, die in ihrer Menge erhöht wurden, wie z. B. Troponin und Myosin, deren mRNA-Menge sich mehr als verdoppelte. Diese Regulation kann als Versuch der Zelle gewertet werden, dem proteolytischen Abbau während der Apoptose entgegen zu wirken und zeigt, dass die Proteine des Cytoskeletts im Verlauf der Apoptose nicht nur durch Spaltung, sondern auch durch veränderte Expression auf mRNA-Ebene reguliert werden.

Die meisten regulierten mRNAs konnten Enzymen des Energiestoffwechsels und des Fremdstoffmetabolismus zugeordnet werden. Dies lässt auf eine starke metabolische Anpassung, wie z.B. durch verstärkte Aufnahme von Nährstoffen und erhöhten Substratflux schließen. Besonders auffällig ist die 13-fache Zunahme der mRNA des Cytochrom P450 1A1 nach Flavoninkubation. Das Cytochrom P450 ist in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate, wie z.B. Steroide, Fettsäuren und Xenobiotika zu oxidieren und ist eingebunden in den NADPH-abhängigen Elektronentransport. Dieser Befund lässt vermuten, dass auch Flavon ein bifunktionaler Induktor der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme ist, da die Aktivierung der Phase I-Enzyme mit der Aktivierung der Phase II-Enzyme eng über den AH-Rezeptor verknüpft ist und bereits einige Flavonoide als bifunktionelle Induktoren beschrieben wurden<sup>213,214</sup>. Auf mRNA-Ebene konnte jedoch keine Regulation von Phase II-Enzymen unter Flavon beobachtet werden. Allerdings bewirkte Flavon auf Proteinebene eine Reduktion des Glutathion-S-Transferase-Spiegels, was auf eine komplexe Regulation der Enzyme durch Flavon schließen lässt. Die Transkripte der beiden Glutathion-Peroxidasen 1 und 2 lagen im Gegensatz zur Glutathion-S-Transferase nach Flavoninkubation vermindert vor. Diese beiden Enzyme katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid und schützen so die Zellen vor dem Angriff von ROS. Für die Glutathion-Peroxidase 1 ist

außerdem bekannt, dass sie durch die Hemmung der ROS-Produktion, eine durch CD95 ausgelöste Apoptose zu verhindern vermag<sup>215</sup>.

32 Transkripte, die durch Flavon im Spiegel verändert vorlagen, konnten Prozessen der Krebsentwicklung zugeordnet werden. So wurde zum Beispiel die mRNA-Menge des Tumor-assoziierte Calcium-Signaltransduktors 1 durch Flavon um den Faktor 2 vermindert, während die mRNA eines Tumor-Suppressor-Gens (DLC-1), um den Faktor 3,5 unter Flavonwirkung verstärkt wurde. Der mRNA-Spiegel von DLC-1 ist in ca. 70 % der Darmkrebszelllinien vermindert oder die mRNA ist nicht mehr detektierbar. In 2 unterschiedlichen Brustkrebszelllinien wurde darüber hinaus gezeigt, dass eine Transfektion mit DLC-1 eine signifikante Wachstumsinhibierung bewirkt und die Ausbildung von Metastasen hemmt<sup>216</sup>. Das pro-apoptotische B7-H1 Protein wird u.a. in humanem Lungen-, Gebärmutterhals- oder Darmkrebsgewebe vermehrt exprimiert und vermag die Apoptose zu fördern<sup>217</sup>. Der mRNA-Spiegel von B7-H1 wurde durch Flavoninkubation um das 2,5-fache verstärkt. B7-H1 gehört zur Familie der B7-kostimulierenden Moleküle, die in die Regulation der zellulären und humoralen Immunantwort über den PD-1 Rezeptor von aktivierten T und B Zellen involviert sind und in normalem humanen Gewebe nicht exprimiert werden. Durch die Aufklärung der Rolle von B7-H1 erhofft man sich u.a. neue Möglichkeiten einer T-Zell-basierten Immuntherapie bei Krebs<sup>217</sup>. Einen direkten Einfluss auf die Aktivierung der Apoptose hat auch das in Anwesenheit von Flavon 3-fach verstärkt exprimierte Nip-3 Protein (19 kDa interagierendes Protein). Das mitochondriale Nip3-Protein ist in der Lage, Apoptose durch die Suppression von Bcl-2 zu fördern und könnte somit auch unmittelbar mit der Wirkung von Flavon auf die Apoptose verbunden sein<sup>218</sup>.

Von 51 identifizierten Proteinen, die nach Flavoninkubation als reguliert identifiziert wurden, waren 32 korrespondierende cDNAs auf dem Array präsent. Nur die NADH-DH und das Cytokeratin 19 waren gleichsinnig im Protein- und mRNA-Spiegel mindestens um den Faktor 2 reguliert (Tabelle 6,8). Für 12 weitere mRNAs konnte eine gleichartige Tendenz der Veränderung, wie auf Proteinebene beobachtet werden. Die MAP Kinase 1 und das humane Cytokeratin 8 wurden zwar ebenfalls mehr als zweifach in ihrem mRNA-Spiegel verändert, dies jedoch in die entgegengesetzte Richtung als auf Proteinebene (Tabelle 8). 15 weitere mRNAs

zeigten im Vergleich zur Regulation auf Proteinebene eine entgegengesetzte Änderung. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich beim Vergleich der Flavoneffekte (24h) auf mRNA Ebene mit den Veränderungen auf Proteinebene nach 48 h. 35 Proteine wurden nach 48 h als reguliert identifiziert und davon waren 23 als Oligonukleotide auf den Array aufgetragen. Die Triosephosphatisomerase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-DH und das  $\alpha$ 2-Macroglobulin-Rezeptor-assoziierte Protein wurden mindestens um das 2-fache im mRNA-Spiegel und entsprechend im Proteinspiegel verändert. Die MAP-Kinase 1 und Methylthioadenosin-Phosphorylase wurden mehr als 2-fach auf der mRNA-Ebene hochreguliert, fanden sich nach 48 h in ihrer Proteindichte jedoch signifikant vermindert. 8 mRNAs zeigten die gleiche Tendenz in der Regulation wie ihre entsprechenden Proteine und weitere 10 mRNAs wurden tendenziell in die entgegengesetzte Richtung der Proteinebene verändert. Diese Befunde zeigen deutlich, dass Veränderungen in der Transkriptmenge eines Proteins nur eine schlechte Vorhersage für die Änderungen des jeweiligen Proteinspiegels in einer Zelle ermöglichen. Um Veränderungen zellulärer Prozesse, wie hier unter Gabe ausgewählter Flavonoide, zu erfassen, scheint neben der Transkriptomanalyse der Nachweis der Alterationen des Proteinspiegels z.B. durch 2-DE unabdingbar.

**Tabelle 22: Vergleich der Proteom- mit der Transkriptomanalyse**

<b>Analoge Regulation auf Protein- und mRNA-Ebene</b>	<b>Gleiche Tendenz auf Protein- und mRNA-Ebene</b>
Annexin II ↓ Stathmin ↓ NADH-DH ↓ Lamin C ↑ Keratin 19 ↓	Succinat-DH ↓ Katalase ↓ Protein-Disulfid-Isomerase ↑

## 6 Zusammenfassung

Flavonoide stellen eine Gruppe von mehr als 6500 polyphenolischen Verbindungen dar, die natürlicherweise in pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen. Sie weisen ein breites Spektrum biologischer Wirkungen auf und werden u.a. im Zusammenhang mit einer Protektion der Karzinogenese und Tumorentwicklung in Verbindung gebracht. So lassen mehrere epidemiologische Studien vermuten, dass ein hoher Verzehr von Flavonoiden mit einem verminderten Risiko, an Krebs zu erkranken, einhergeht.

Die Fähigkeit einiger Flavonoide, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu reduzieren, wird oftmals in Bezug auf ihren anti-kanzerogenen Effekt diskutiert. In dieser Arbeit wurden zunächst 27 verschiedene Flavonoide auf ihre antioxidativen Wirkungen in transformierten und nicht-transformierten humanen Kolonozyten (HT-29 und NCOL-1) untersucht, wobei sowohl die Reduktion von Wasserstoffperoxid, als auch die von Superoxidradikalanionen geprüft wurde. Quercetin erwies sich in beiden Zelllinien als sehr effektives Antioxidans, während Flavon keinen antioxidativen Effekt zeigte.

Die Auslösung von Apoptose in Tumorzellen ist eine weitere Wirkung, die die anti-kanzerogene Wirkung von Flavonoiden erklären könnte. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität und fluoreszenzbasierter Nachweis der Membrandesintegration bzw. DNA-Fragmentierung dienten dem Nachweis der Apoptose in den gewählten Zelllinien. Während Quercetin in beiden Zelllinien den Zelltod förderte, aktivierte Flavon spezifisch nur in den transformierten Kolonozyten Apoptose.

Um die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Flavonoide bzgl. ihrer anti-kanzerogenen Aktivität zu untersuchen, wurden Veränderungen auf Proteinebene in beiden Zelllinien untersucht. Mit Hilfe der 2-DE wurde das Proteom von HT-29 und NCOL-1 Zellen vor und nach einer Flavonoid-Exposition (24 h und 48 h) der Zellen aufgetrennt und verglichen. Die im Spiegel veränderten Proteine wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Es konnten zum einen pro-apoptotische Proteine identifiziert werden, die durch Flavon und Quercetin in ihren Spiegeln verstärkt wurden, wie z.B. Annexin I und Chaperonin (HSP60), zum anderen wurden anti-apoptotische Proteine vorgefunden, die durch die beiden Flavonoide in ihren Spiegeln vermindert wurden (Stathmin, Katalase, MAP-Kinase). Zusätzlich wurden Proteine entdeckt, die als Caspase-Substrate in Folge der Apoptoseinduktion vermutlich nach Proteolyse ebenfalls vermindert vorlagen (Lamin A,B,C, Cofilin, CLP-36, Radixin). Die Caspase-3 Aktivierung in HT-29 Zellen durch Flavon war deutlich höher, als die durch Quercetin. Entsprechend dazu konnten weitere Apoptosemarker in den Flavon-behandelten Zellen, wie die Proteinkinase C beta (anti-apoptotisch, vermindert) und das *Growth-arrest-specific protein 11* (Zellzyklusarrest, verstärkt) identifiziert werden.

Der Vergleich des Einflusses von Flavon auf das Proteom und Transkriptom von HT-29 Zellen unter identischen experimentellen Bedingungen zeigte nur wenig Übereinstimmung, d.h. gleichartig und gleichsinniger Regulation. Zur vollständigen Erfassung zellulärer Veränderungen in Anpassung an Veränderungen ihrer Ernährungsumwelt scheint neben der Transkriptomanalyse die Proteomanalyse zwingend erforderlich.

## 7 Summary

Flavonoids are polyphenolic compounds that occur ubiquitously in plants. They are considered as active food ingredients with a spectrum of anti-carcinogenic and cancer-preventive activities.

The majority of flavonoids is known to reduce reactive oxygen species (ROS) which is taken as the main reason of their anti-carcinogenic potential. In the present studies 27 different flavonoids were screened with regard to their scavenging activity for superoxidanion- and hydroperoxide radicals in human transformed and non-transformed colonocytes (HT-29 and NCOL-1). Quercetin was found to be a powerful antioxidant with the ability to reduce ROS in both cell-lines, whereas flavone possessed no anti-oxidative capacity at all.

The induction of apoptosis in tumor-cell-lines is another anti-cancer effect attributed to flavonoids. Apoptosis induction by quercetin and flavon in the cell-lines was determined by caspase-3-activity, DNA-fragmentation and membrane-desintegration. Quercetin was able to induce apoptosis in both cell-lines, whereas flavone was a highly specific inducer of cell-death only in transformed colonocytes. To understand the molecular basis of the putative anti-cancer activity of quercetin and flavone, the proteome of HT-29 and NCOL-1 cells exposed for 24 h and 48 h to the two flavonoids was assessed using 2-DE analysis. The proteome of flavone- and quercetin-treated cells was compared and regulated proteins were identified using MALDI-TOF-MS analysis.

Proteins with pro-apoptotic effects, such as annexin I and chaperonin (HSP60) were identified as up-regulated and anti-apoptotic proteins (e.g. stathmin, catalase, MAP-kinase) were down-regulated after flavonoid incubation. In addition, proteins which are known as substrates of caspases (lamin A,B,C, cofilin, CLP-36, radixin) were found down-regulated after apoptosis initiation. Further proteins such as protein-kinase-C (anti-apoptotic, down-regulated) and growth arrest specific protein 11 (pro-apoptotic, up-regulated) could be identified as selective marker proteins for flavone action.

A comparative analysis of the transcriptome and proteome of HT-29 cells exposed to flavone revealed a surprisingly low number of mRNA-species and corresponding proteins with identical or similar changes in expression level. For a comprehensive analysis of the cellular targets of dietary constituents it seems mandatory to assess not only the transcriptome but simultaneously the proteome.

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien

#### 8.1.1 Chemikalien

30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
BME Vitaminlösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Biorad-Reagenz zur Proteinbestimmung	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
t-Butanol	Roth, Karlsruhe
CHAPS	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie brilliant Blau (G250)	Serva, Heidelberg
Collagen 100	Vitrogen Biomaterials, Palo Alto, CA USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMEM/HEPES	Gibco BRL, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacid (EDTA/Na <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (konz.)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe
Fungizon	Gibco BRL, Karlsruhe
FKS (HT-29)	Gibco BRL, Karlsruhe
FKS (NCOL-1)	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glutardialdehyd	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Immobiline II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPG Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
MEM Aminosäuren	Gibco BRL, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
Pharmalyte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Proteinaseinhibitor Mix Complete Mini	Roche Diagnostics, Mannheim
Quercetin	Sigma, Deisenhofen
RhEGF	Promega, Madison, WI USA
RPMI 1640	Gibco BRL, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37%	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Siliconöl	Serva, Heidelberg

Tetramethylenethyldiamine (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Promega, Madison, WI USA
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypan Blau-Lösung	Sigma, Deisenhofen

### 8.1.2 Flavonoide

#### Phytochem, Ichenhausen

Bavachanin A	Flavon
Didymin	Acacetin
3-Hydroxy-Flavon	Apigenin
5-Hydroxy-Flavon	BiochaninA
7-Hydroxy-Flavon	Chrysin
5,7 Dihydroxy-Flavon	Diosmin
Flavanone	Morin
Flavonol	Myricetin
Apiin	Naringenin
Baicalein	Naringin

#### Roth AG, Karlsruhe

Diosmetin	Rutin
Luteolin	Esculetin
Tangeritin	Esculin
	Fisetin
	Genistin

#### Calbiochem

Daidzein	Hesperetin
Genistein	Hesperidin
	Kämpferol

### 8.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Proxylfluorescamin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
CPP32/Apopain Substrat	Calbiochem, Bad Soden
F1 Hoechst 33342	Hoechst, Frankfurt
F2 Hoechst 33258	Hoechst, Frankfurt

### 8.1.4 Zellkultur-Supplemente

BME-Vitamin-Lösung	Gibco, Karlsruhe
Collagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
FKS	Sigma, Deisenhofen
FKS	Gibco, Karlsruhe
Fungizone (Lyophilisat)	Gibco, Karlsruhe
Gentamycin [50 mg/ml]	Gibco, Karlsruhe
MEM-Aminosäuren (50X)	Gibco, Karlsruhe
MEM-nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (Lyophilisat)	Sigma, Deisenhofen
rhEGF (Lyophilisat)	Promega, Leiden, Niederlande
Trypanblau Lösung	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
DulbeccosModEM/ 25mM Hepes	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe

### 8.1.5 Molekularbiologische Reagenzien

Agarose MP	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
RNAse Inhibitor	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNA-Wiz Lösung	Ambion, Austin, Texas, USA
Formaldehyde loading dye	Ambion, Austin, Texas, USA

### 8.1.6 Puffer und Lösungen

#### Apoptosepuffer:

CHAPS	1 %
HEPES	10 mM
EDTA	2 mM
DTT	5 mM
PMSF	1 mM
PepstatinA	10 µg/ml
Leupeptin	20 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml

pH-Wert mit 3 M KOH auf 7,4 einstellen

#### Lysepuffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	2 %
Pharmalyte pH 3-10	0,8 %
DTT	1 %
Proteaseinhibitor	5 mM

Lysepuffer als 1ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  einfrieren, DTT, Pefablock und Pharmalyte erst vor Gebrauch zusetzen.

#### PBS (Polyphosphatgepufferte Kochsalzlösung, Phosphat buffered saline)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 mM

pH mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bzw. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen und nach Sterilfiltration (Schleicher und Schuell, Porengröße 0,45 µm) autoklavieren

#### Trypsin-Lösung für HT-29

Trypsin in PBS, pH 7,4	0,05 % (v/v)
EDTA	0,02 %

#### Trypsin-Lösung für NCOL-1

Trypsin in PBS	0,1 % (v/v)
EDTA	0,04 %

#### HMKEE-Puffer

HEPES	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	1 mM

pH mit Tris auf pH 7,2 einstellen

#### Digitonin-Puffer (HMKEE-Basis)

Saccharose	250 mM
Digitonin	0,025 %
Proteaseinhibitor-Mix	

<u>Triton-X-100-Puffer (HMKEE-Basis)</u>	
Saccharose	200 mM
Triton-X-100	0,5 %
Proteaseinhibitor-Mix	
<u>Tween 40-Puffer</u>	
HEPES	20 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Deoxycholate	0,5 %
Tween 40	1 %
Proteaseinhibitor-Mix	
<u>Krebspuffer pH 7,4</u>	
NaCl	137 mM
KCl	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	2,8 mM
MgSO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	1,0 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 mM
Hepes	10 mM
Glucose	10 mM (erst vor Gebrauch zusetzen)
Cystein	0,2 mM (nur bei Superoxidanion-Messung)
Mit Tris auf pH 7,4 einstellen.	
<u>TrisCl</u>	
Tris, pH 8,8 mit HCl	1,5 M
<u>1x SDS-Laufpuffer</u>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
<u>Verdrängungslösung</u>	
TrisCl, pH 8,8	0,375 M
Glycerol	50 % (v/v)
Bromphenolblau	
<u>Rehydratationspuffer</u>	
Harnstoff	8 M
CHAPS	0,5 %
DTT	15 mM
IPG Puffer	0,5 %
<u>Equilibrationspuffer 1</u>	
Harnstoff	6 M
Glycerol	30 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
TrisCl, pH 8,8	50 mM
DTT	1 %
Bromphenolblau	
<u>Equilibrationspuffer 2</u>	
Harnstoff	6 M
Glycerol	30 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
TrisCl, pH 8,8	50 mM
Iodacetamid	4 %
Bromphenolblau	
<u>Agaroselösung</u>	
Agarose in 1x SDS-Laufpuffer	0,5 %

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 %
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2 %
Methanol	50 ml
Coomassie Brilliant Blue G250, (5 %)	2,5 ml
mit <i>A. bidest</i> auf 200 ml auffüllen	
<u>Bicarbonat-Lösung</u>	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	50 mM
<u>Peptidelutionslösung</u>	
Acetonitril	
TFA 0,1 %	
<u>10xMOPS-Puffer</u>	
MOPS (3-[Morpholino]propansulfonsäure)	20 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA, pH 7,0	10 mM
<u>DEPC-Wasser</u>	
1 ml DEPC auf 1 l <i>A. bidest</i>	

## 8.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav	Webeco, Fridolfing
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Stericult 200	Forma Scientific, Frankfurt
Ettan Dalt II large vertical system	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ettan Dalt II Gel caster	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ettan Dalt II staining tray set	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fluoroscanner Ascent	Labsystems, Merlin Diagnostika, Bornheim
Gelbond PAGfilm	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glasplatte mit 0,5 mm U-frame (200 x 260 mm <sup>2</sup> )	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gradientengelstreifen pH 3-10 NL, pH 3-10 L	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gradientenmischer SG 15	Hoefler
Hautstanze, Ø 2mm, 3mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Heizkammer	Juan, Frankreich
ImageScanner	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPG cup loading strip holder	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPGphor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
FlexiClamps	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
MALDI-TOF-MS Autoflex	Bruker Saxonia, Leipzig
PCR-Personal Cycler	Biometra, Göttingen
Potter	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 0,2 ml safe lock)	Eppendorf, Hamburg
Reswelling Tray	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Schüttler HS 250 basic	Kika Labortechnik
Sterilbank, FASTER Bio 48	Recon, Stadthagen
Tischzentrifuge A 14	Juan, Frankreich
Tischzentrifuge B 4	Juan, Frankreich
Ultraschallstab	Dr. Wielscher GmbH,
Ultraschallfuge Himoc CP 65 β	Hitachi
Ultraschallbad	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> )	Renner, Dannstadt
Zellschaber	Renner, Dannstadt

## 8.3 Verzeichnisse

### 8.3.1 Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose induzierender Faktor
Apaf-1/2	Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor
APC	Adenopolyposis coli
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bad	Bcl-X <sub>L</sub> /Bcl-2 associated death promotor
Bak	BCL-2 homologous antagonist/killer
Bax	BCL-2 associated protein x
BCL-2	B-Cell-Lymphoma-2
BSA	Bovines-Serum-Albumin
Caspasen	Cystein-Aspartyl-Proteinasen
CDK	Cyclin-dependent-kinases
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	
cDNA	Complementary DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-amino]-1-propanesulfat
	Cyclooxygenase
COX	Colorectal Cancer
CRC	2 dimensionale Gelelektrophorese
2-DE	Diethylpyrocarbonat
DEPC	Dehydrogenase
DH	Dulbeccos Minimales Essentielles Medium
DMEM	Dimethylsulfoxid
DMSO	Desoxyribonucleic acid
DNA	Dithiothreitol
DTT	Ethylendiamintetra-acetat/Dinatriumsalz
EDTA	Endoplasmatisches Retikulum
ER	Familiäre adenomatöse Polyposis
FAP	Fetales Kälberserum
FKS	Guanosin-Triphosphat
GTP	Stunden
h	Essigsäure
HAc	Hydroxy-cyanozimsäure
HCCA	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEPES	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales
HNPCC	Karzinom
	Hitze Schock verwandtes Protein
HSC	Hitze Schock Protein
HSP	Inhibitorische Proteine der Apoptose
IAP	Interleucin converting enzyme
ICE	Isoelektrische Fokussierung
IEF	Interleukin
IL	Immobilisierter pH Gradient
IPG	kilo-Dalton
kDa	Low density Lipoprotein
LDL	Lipoxygenase
LOX	millimolar
mM	Matrix assisted laser desorption ionization-time of
MALDI-TOF-MS	flight-mass spectrometry
	Minuten
min	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAGE	Poly-ADP Ribose Polymerase
PARP	Polymerase-chain-reaction
PCR	Phosphoinositol-2 phosphat
PIP2	Proteinkinase
PK	Proteinkinase C
PKC	Parts-per-million
ppm	Protein-Tyrosinkinase
PTK	

Rb	Retinoblastom Protein
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SGLT1	Natrium abhängiger Glukosetransporter1
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
SOD	Superoxid Dismutase
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	Tumor growth factor
z.B.	Zum Beispiel

### 8.3.2 Liste identifizierter Peptidfragmente

**Anhang Tabelle 6:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

Protein Name	Identifizierte Peptide	Accession-number
Plectin	6-17, 33-41, 83-93, 102-109, 113-121, 113-122, 124-132, 133-143, 155-164, 186-196, 195-204, 249-257, 385-393, 468-478, 479-488, 527-538, 539-554	CAA65765
Annexin II	1-9, 10-27, 28-46, 47-62, 49-62, 68-76, 104-114, 115-134, 119-134, 152-137, 157-167, 157-168, 178-195, 179-195, 212-219, 233-245, 313-323, 313-328, 324-338	BAA05730
Annexin VI	55-67, 75-83, 140-155, 156-165, 231-246, 250-258, 270-280, 296-305, 306-313, 446-464, 456-470, 465-477, 509-519, 546-553, 561-567, 568-578, 579-586, 629-638	P08133
HSTCP1, similar to HSP60,	19-33, 110-122, 131-145, 146-153, 234-243, 248-259, 248-264, 299-310, 369-378, 391-400, 434-443, 469-480, 469-481, 485-496, 500-510, 516-526, 533-541	XP_116321
PDI precursor	31-42, 32-42, 70-78, 82-97, 104-114, 121-130, 133-162, 171-195, 196-207, 201-208, 209-222, 214-222, 214-230, 231-247, 255-263, 264-276, 264-276, 286-300, 301-309, 327-338, 339-345, 367-375, 376-385, 376-386, 410-424, 437-444, 445-452	ISHUSS
Human thyroid binding protein	31-42, 32-42, 82-97, 121-130, 196-207, 214-230, 223-230, 231-247, 255-263, 301-308, 301-309(m.c.1), 309-316, 317-326, 327-338, 339-345, 376-386, 410-420, 437-444	AAA61169.1
Glutamate-DH	51-60, 69-76, 77-90, 108-123, 124-136, 125-136, 152-162, 172-183, 172-187, 204-211, 212-231, 303-318, 353-363, 364-386, 400-420, 400-420, 445-453, 454-460, 461-476, 497-516, 504-516	NP_005262
3 alpha hydroxy steroid-DH IIB	48-66, 76-84, 162-170, 184-199, 208-223, 210-223, 250-258	Q9UKL9
Succinate-DH	233-246, 251-261, 262-282, 313-325, 362-379, 424-451, 452-465, 466-480, 518-527, 590-598, 601-615, 616-623, 637-647, 648-662	Q99643
Isocitrate-DH	59-66, 101-115, 116-134, 117-134, 135-146, 147-169, 170-178, 178-188, 179-188, 206-216, 215-223, 327-336, 351-360, 351-361	O43837
NADH-DH	63-68, 185-200, 292-299, 300-308, 409-420, 420-428, 421-428, 471-483, 502-511, 608-617, 693-702	S17854
Acyl-CoA-DH	24-35, 36-45, 184-201, 184-202, 203-214, 215-225 (m.c.1), 226-237, 261-272, 362-374	NP_000009
Apolipoprot. A1	36-46, 47-54, 53-64, 55-64, 55-65, 66-76, 82-91, 99-107, 110-118, 119-129, 132-140, 154-173, 165-184	P02647
Peroxiredoxin I	8-16, 111-120, 129-136, 141-151, 159-168, 169-190	NP_006397
Catalase	19-37, 23-46, 38-46, 98-105, 156-168, 243-262, 252-262, 263-272, 354-362, 430-443, 431-443, 444-455, 457-467, 458-467, 499-521, 506-521	P04040

Serine/threonine specific PK	640-647, 684-695, 750-762, 783-791, 941-950, 997-1005, 1006-1013, 1058-1073, 1121-1134, 1141-1148, 1160-1172, 1195-1208, 1208-1220, 1268-1275	P05771
40S rib. Prot. S12 RS	23-32, 83-92, 84-92, 101-111, 102-111, 121-128	P25398
Translational ER ATPase	26-45, 46-53, 66-83, 96-109, 148-155, 218-225, 278-287, 278-288, 363-377, 366-377, 378-386, 454-465, 466-487, 488-502, 503-512, 513-524, 585-599, 639-653, 654-662, 669-677, 701-708, 701-709, 734-741, 746-753, 754-766	XP_208629
GTP binding protein	45-57, 48-57, 89-99, 101-118, 107-118, 140-155, 156-172, 186-212, 226-245, 246-257, 309-317	B33928 human
BC001951	21-30, 73-93, 140-155, 145-155, 156-172, 173-191, 216-236, 250-258, 264-271, 272-281, 289-298, 299-311, 312-320, 333-344, 356-364	AAH01951

**Anhang Tabelle 8:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

Protein Name	Identifizierte Peptide	Accession-number
GrpE <sup>1</sup>	26-34, 33-50, 35-50, 67-77, 80-89, 81-89, 92-100, 128-138, 139-153, 187-196, 187-200	AAH24242
GP 96 <sup>1</sup>	23-46, 31-46, 55-63, 96-114, 122-135, 364-374, 375-383, 395-413, 473-482, 491-509, 721-733	P14625
Cofilin <sup>1</sup>	35-44, 35-45, 54-73, 82-92, 113-121, 115-125, 133-144, 133-146, 153-166	BAA05711
CLP-36 <sup>1</sup>	18-32, 23-32, 70-83, 72-83, 88-99, 104-122, 167-192, 199-211, 229-241, 263-273, 278-294, 297-309, 313-329, 315-329	CAC32846
Lamin A <sup>1</sup>	1-8, 12-25, 29-41, 51-60, 61-72, 79-89, 79-90, 124-133, 134-144, 145-156, 156-166, 181-189, 182-190, 197-208, 209-216, 226-235, 250-261	P02545
Lamin C <sup>1</sup>	9-25, 12-25, 29-41, 42-50, 51-60, 79-89, 134-144, 136-144, 145-155, 145-156, 156-166, 157-166, 182-190, 209-216, 222-233, 241-249, 241-260, 281-296, 297-311, 299-311, 367-377, 379-386, 440-453, 472-482, 528-541, 546-571	P02545
Lamin B1 <sup>1</sup>	1-9, 51-66, 79-89, 79-90, 102-110, 109-122, 111-122, 124-135, 134-144, 145-156, 157-166, 222-233, 258-270, 367-377, 379-386	NP_005564
Desmoplakin I <sup>1,2</sup>	852-860, 852-862, 871-879, 880-889, 882-889, 890-897, 901-911, 974-981, 982-991, 1016-1024, 1043-1050, 1075-1084, 1094-1102, 1109-1116, 1157-1169, 1181-1190, 1232-1240, 1241-1250, 1265-1272, 1220-1231, 1251-1258, 1251-1264, 1336-1343, 1389-1397, 1399-1408, 1418-1433, 1472-1482, 1501-1511, 1512-1521, 1522-1531, 1532-1541, 1560-1568, 1588-1595, 1659-1674, 1820-1832, 1870-1881	A38194
HUMKER B typ II cytoskeletal <sup>8,1,2</sup>	24-32, 123-130, 134-148, 134-149, 159-176, 161-176, 161-178, 187-197, 187-198, 199-213, 214-225, 226-233, 234-252, 253-264, 265-273, 274-285, 286-295, 317-325, 317-328, 329-341, 329-341, 329-347, 394-414	AAA35763
Radixin <sup>2</sup>	2-8, 140-156, 166-171, 238-246, 247-253, 331-337, 382-388, 545-556, 545-559, 577-583	P35241
Keratin 19, typ I cytoskeletal <sup>2</sup>	8-24, 82-90, 112-118, 126-138, 141-150, 151-159, 167-176, 189-197, 266-274, 359-365, 371-381	P08727
Mitofilin <sup>2</sup>	171-195, 196-211, 258-269, 276-284, 331-343, 331-344, 354-366, 372-385, 396-410, 517-525, 527-545, 527-547, 546-564, 548-564, 582-600, 601-623, 624-632, 690-708, 709-718, 719-726	Q16891
Stathmin <sup>1</sup>	14-26, 27-40, 29-40, 43-51, 52-59, 53-60, 62-69, 85-94, 104-111, 137-148	BAA5794
Annexin 4 <sup>1</sup>	9-23, 9-24, 28-43, 100-115, 116-122, 122-133, 123-133, 141-149, 150-159, 150-171, 160-171, 192-199, 202-212, 202-213, 214-224, 259-269, 275-283, 309-318	P09525

Annexin XI <sup>2</sup>	215-230, 236-243, 287-302, 328-336, 360-371, 379-386, 389-400, 431-439	P50995
Methylcrotonyl-CoA-carbox. beta <sup>2</sup>	51-59, 126-141, 156-164, 165-180, 181-193, 293-299, 349-361, 383-394, 384-394, 461-469	NP_071415
Cyt. C oxidase <sup>2</sup>	50-57, 57-68, 58-68, 69-86, 75-86, 75-87, 122-129	OTHU5B
beta-ETF <sup>2</sup>	33-48, 57-73, 83-95, 162-171, 172-183, 174-183, 189-197, 189-199, 219-230	P38117
Glutathione-S-transferase <sup>1</sup>	1-12, 2-12, 2-14, 15-30, 20-30, 31-45, 56-71, 76-101, 83-101, 104-121, 122-141, 190-209, 192-210	A37378
Antioxidant protein 2 <sup>1</sup>	1-21, 41-52, 97-105, 132-141, 144-154, 155-161, 162-173, 174-181, 204-214	P30041
Ser/threo phosphatase gamma <sup>1</sup>	7-15, 27-36, 61-74, 99-111, 112-122, 123-132, 133-142, 169-187, 212-221, 222-234, 235-246, 247-260, 247-261	BAA82664
MAP kinase 1 <sup>1</sup>	2-21, 22-37, 25-37, 25-37, 57-72, 57-72, 103-118, 119-128, 119-133, 146-167, 168-180, 213-226	I38969
Pyruvate kinase <sup>1</sup>	32-42, 43-55, 73-88, 92-114, 136-150, 151-161, 173-185, 188-205, 188-206, 206-223, 207-223, 278-293, 319-335, 367-375, 383-398, 400-421, 467-474, 475-488	P14618
Ribosomal prot RS 40 k <sup>1</sup>	54-63, 64-80, 86-102, 90-102, 103-117, 121-128, 129-155, 156-166	A31233
GAS 11 <sup>1</sup>	29-37, 40-46, 59-68, 81-90, 83-90, 130-139, 181-188, 198-204, 215-225, 253-260, 268-277, 278-285, 286-295, 288-295, 296-304, 303-311, 323-334, 349-359, 360-369, 371-381, 406-418	NP_005247
DJ694B14.1 <sup>1</sup>	95-102, 193-200, 212-234, 219-234, 257-267, 333-340, 380-388, 383-393, 408-416, 464-472, 506-514, 537-547, 548-556, 576-584, 580-592, 618-631, 693-705, 722-730, 741-751	CAB43548
AC005185 <sup>1</sup>	4-12, 20-36, 38-53, 93-107, 130-139, 176-183, 184-194, 215-229, 223-231, 238-246, 257-270, 262-270, 271-285, 288-297	AAD10636
Marine transposase <sup>1</sup>	12-22, 44-51, 90-107, 118-130, 142-150, 229-239, 241-260, 288-297, 334-343	Q13579
KIAA1751 protein <sup>1</sup>	29-41, 42-48, 80-86, 144-150, 144-157, 151-160, 168-174, 193-199, 197-204, 205-210	BAB21842
HSU 80458 <sup>2</sup>	1378-1384, 1387-1393, 1281-1287, 1420-1426, 1288-1294, 1352-1358	AAD00355
DKFZp434D0917.1 <sup>2</sup>	384-390, 293-298, 392-398, 392-398, 160-166, 221-230, 358-366, 562-570, 561-570	T43446

**Anhang Tabelle 10:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

Protein Name	Identifizierte Peptide	Accession-number
Lamin A	111-117, 124-135, 134-144, 136-144, 145-155, 157-166, 182-190, 191-201, 202-208, 209-216, 222-233, 250-261, 266-275, 271-280, 299-316, 342-349, 367-377	P02545
Plectin	6-17, 31-39, 113-122, 133-143, 155-162, 155-164, 166-175, 216-225, 237-246, 250-257, 260-267, 297-305, 373-383, 393-402, 417-425, 456-465, 509-518	CAA65765
Desmoplakin I (plakin family)	809-815, 863-870, 880-889, 982-990, 982-991, 1062-1074, 1075-1084, 1148-1156, 1207-1216, 1232-1240, 1251-1258, 1377-1385, 1418-1432, 1435-1443	A38194
Annexin II	1-9, 10-27, 28-46, 47-62, 49-62, 68-76, 104-114, 115-134, 119-134, 152-137, 157-167, 157-168, 178-195, 179-195, 212-219, 233-245, 313-323, 313-328, 324-338	BAA05730
Annexin I	9-25, 29-52, 58-71, 81-96, 81-97, 113-123, 128-143, 166-176, 185-203, 188-203, 204-212, 213-227, 214-227, 294-302	NP_000691

BIP	32-42, 64-78, 80-95, 84-95, 105-120, 121-134, 146-163, 147-163, 168-179, 180-195, 180-196, 280-288, 289-306, 307-318, 309-318, 336-349, 359-368, 418-428, 430-446, 457-474, 475-492, 506-514, 515-522, 541-555, 584-599, 584-601, 604-615	AJ271729
HSTCP1,	51-62, 87-111, 116-123, 196-208, 212-223, 212-226, 227-239, 240-258, 241-258, 259-280, 292-300, 361-379, 420-436, 453-460, 472-483	XP_116321
PDI precursor	95-104, 105-119, 120-129, 120-130, 174-183, 215-226, 336-344, 352-363, 423-433, 434-448, 449-460, 472-482	ISHUSS
Stathmin	14-26, 27-40, 29-40, 43-51, 52-59, 53-60, 62-69, 85-94, 104-111, 137-148	BAA5794
GAP-DH	61-79, 66-79, 66-83, 66-83, 86-106, 117-138, 118-138, 145-161, 162-185, 200-214, 234-247, 309-322	G3P2_HUMAN
Glutamate DH	51-60, 69-76, 77-90, 108-123, 124-136, 125-136, 152-162, 172-183, 172-187, 204-211, 212-231, 303-318, 353-363, 364-386, 400-420, 400-420, 445-453, 454-460, 461-476, 497-516, 504-516	NP_005262
Succinate DH	47-75, 76-92, 163-171, 189-195, 233-246, 251-261, 262-282, 326-335, 336-345, 424-451, 452-465, 466-480, 539-547, 590-598, 599-615, 601-615, 601-615, 616-623, 624-636, 637-647, 648-662	Q99643
Acyl-CoA DH	24-35, 36-45, 184-201, 184-202, 203-214, 215-225, 226-237, 261-272, 362-374	NP_000009
Triosephosphate-isomerase	5-13, 6-13, 18-32, 19-32, 33-52, 59-68, 69-84, 99-112, 100-112, 113-130, 156-174, 175-187, 194-205, 206-218, 219-247	TPIS_HUMAN
Human thyroid binding protein	31-42, 32-42, 70-78, 82-97, 104-114, 121-130, 171-195, 196-207, 201-208, 209-222, 214-222, 214-230, 223-247, 231-247, 255-263, 264-276, 264-276, 286-300, 301-308, 301-309, 327-338, 339-345, 376-385, 376-386, 410-424, 437-444, 445-452	AAA61169.1
Apolipoprotein A1	36-46, 47-54, 53-64, 55-64, 55-65, 66-76, 82-91, 99-107, 110-118, 119-129, 132-140, 154-173, 165-184	P02647
Thioredoxin peroxidase	8-16, 111-120, 129-136, 141-151, 159-168, 169-190	AF110731
Glutathione-S-Transferase	1-12, 2-12, 2-14, 15-30, 20-30, 31-45, 56-71, 76-101, 83-101, 104-121, 122-141, 190-209, 192-210	A37378
Catalase	19-37, 23-46, 38-46, 98-105, 156-168, 243-262, 252-262, 263-272, 354-362, 430-443, 431-443, 444-455, 457-467, 458-467, 499-521, 506-521	P04040
Nucleoside diphosphate kin.	7-18, 19-27, 57-66, 89-105, 106-114, 115-128	O00746
Pyruvat kinase	32-42, 43-55, 73-88, 92-114, 151-161, 173-185, 188-205, 206-223, 207-223, 207-223, 247-255, 278-293, 278-293, 279-293, 294-304, 383-398, 383-399, 400-421, 422-432, 467-474, 475-488, 489-497	P14618
Adenylate kinase	1-14, 2-14, 18-28, 64-72, 73-85, 94-103, 122-137, 139-147, 161-174, 165-174, 176-184, 187-202, 205-229	JC5893
MAP kinase 1	2-21, 22-37, 25-37, 25-37, 57-72, 57-72, 103-118, 119-128, 119-133, 146-167, 168-180, 213-226	O15264
MTAP	12-29, 33-51, 50-60, 52-60, 61-71, 72-82, 83-99, 100-116, 148-157, 150-158, 167-176, 226-238, 272-282, 272-282	NP_002442
Caspase recruitment domain protein 14	253-266, 269-275, 296-304, 299-309, 305-311, 310-317, 318-326, 320-326, 336-344, 374-382, 422-428	AAH18142
DNMAP1	84-93, 84-94, 125-134, 135-143, 151-159, 183-193, 206-213, 221-229, 223-229, 235-252, 243-252, 256-264, 299-310, 355-364, 397-406	Q9P2C2
40S ribos. Prot. S12 RS	23-32, 83-92, 84-92, 101-111, 102-111, 121-128	P25398
translat. ER ATPase	26-45, 46-53, 66-83, 96-109, 148-155, 218-225, 278-287, 278-288, 363-377, 366-377, 378-386, 454-465, 466-487, 488-502, 503-512, 513-524, 585-599, 639-653, 654-662, 669-677, 701-708, 701-709, 734-741, 746-753, 754-766	XP_20862

RNA binding motif 4	1-11, 4-11, 36-45, 60-71, 80-92, 112-120, 121-129, 141-149, 152-164, 183-198, 314-341, 350-358	Q9BWF3
EF-Tu	24-32, 57-73, 94-105, 95-105, 108-123, 210-227, 239-252, 253-271, 272-281, 286-297, 287-297, 316-327, 352-361	P43897
$\alpha$ -2 macroglobulin receptor-associated protein	48-55, 56-65, 59-65, 59-68, 66-75, 85-94, 98-110, 132-150, 132-153, 164-174, 181-195, 183-195, 230-237, 240-256, 241-256, 273-282, 307-316, 322-330, 341-348	A39875
Hyaluronan mediated motility receptor	44-57, 84-92, 130-143, 130-143, 144-154, 228-235, 292-301, 349-357, 379-390, 391-400, 401-408, 410-420, 423-431	O75330
KIAA1751 protein	29-41, 42-48, 80-86, 144-150, 144-157, 151-160, 168-174, 193-199, 197-204, 205-210	BAB21842
Ran chain A	22-30, 30-48, 31-48, 53-63, 69-87, 92-98, 103-115, 135-144, 145-158	1IBR_A
GTP binding protein	45-57, 48-57, 89-99, 101-118, 107-118, 140-155, 156-172, 186-212, 226-245, 246-257, 309-317	B33928 human

**Anhang Tabelle 12:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

<b>Protein Name</b>	<b>Identifizierte Peptide</b>	<b>Accession-number</b>
Lamin B1	1-13, 14-25, 51-66, 51-70, 79-89, 109-122, 111-122, 134-144, 197-208, 241-249, 258-270, 299-311, 320-329, 350-366, 367-377, 367-378, 379-386, 457-472, 532-541	NP_005564
HSTCP1	19-33, 64-73, 110-122, 112-122, 131-145, 190-199, 234-243, 248-264, 299-309, 299-310, 469-480, 469-481, 500-510, 513-526, 516-526, 533-541	XP_116321
Ninein	1514-1523, 1627-1638, 1643-1651, 1654-1673, 1697-1706, 1707-1719, 1745-1753, 1750-1763, 1764-1772, 1796-1805, 1845-1858, 1881-1891, 1883-1891, 1915-1921, 1930-1941, 2001-2010, 2034-2046, 2034-2047	Q9UH61
Acyl-CoA-DH	24-35, 36-45, 184-201, 184-202, 203-214, 215-225, 226-237, 261-272, 362-374	NP_000009
GAP-DH	62-80, 67-80, 67-84, 67-84, 87-107, 108-117, 118-139, 119-139, 119-139, 119-139, 146-162, 201-215, 235-248, 310-323	G3P2_HUMAN
Glutamate-DH	51-60, 69-76, 77-90, 108-123, 124-136, 125-136, 152-162, 172-183, 172-187, 204-211, 212-231, 303-318, 353-363, 364-386, 400-420, 400-420, 445-453, 454-460, 461-476, 497-516, 504-516	NP_005262
NADH-DH	63-68, 185-200, 292-299, 300-308, 409-420, 420-428, 421-428, 471-483, 502-511, 608-617, 693-702	S17854
Succinate-DH	233-246, 251-261, 262-282, 313-325, 362-379, 424-451, 452-465, 466-480, 518-527, 590-598, 601-615, 616-623, 637-647, 648-662	Q99643
Thioredox. perox.	8-16, 111-120, 129-136, 141-151, 159-168, 169-190	NP_006397
Catalase	19-37, 23-46, 38-46, 98-105, 156-168, 243-262, 252-262, 263-272, 354-362, 430-443, 431-443, 444-455, 457-467, 458-467, 499-521, 506-521	P04040
RNA binding motif protein 4	1-11, 4-11, 36-45, 60-71, 80-92, 112-120, 121-129, 141-149, 152-164, 183-198, 314-341, 350-358	Q9BWF3
Proliferation associated 2G4	15-23, 17-23, 30-48, 33-48, 94-107, 121-135, 260-275, 276-282, 353-368	
hyaluronan mediated motility receptor	44-57, 84-92, 130-143, 130-144, 144-154, 228-235, 292-301, 349-357, 379-390, 391-400, 401-408, 410-420, 423-431	BAB55389
GTP-binding protein	45-57, 48-57, 89-99, 89-100, 101-118, 107-118, 131-139, 140-155, 156-172, 176-183, 186-212, 213-225, 226-245, 246-257, 265-280, 309-317	B33928 human

**Anhang Tabelle 14:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

<b>Protein Name</b>	<b>Identifizierte Peptide</b>	<b>Accession-number</b>
Annexin II <sup>1</sup>	1-9, 10-27, 28-46, 47-62, 49-62, 68-76, 104-114, 115-134, 119-134, 152-137, 157-167, 157-168, 178-195, 179-195, 212-219, 233-245, 313-323, 313-328, 324-338	BAA05730
GrpE <sup>1</sup>	26-34, 33-50, 35-50, 67-77, 80-89, 81-89, 92-100, 128-138, 139-153, 187-196, 187-200	AAH24242
GP 96 <sup>1</sup>	23-46, 31-46, 55-63, 96-114, 122-135, 364-374, 375-383, 395-413, 473-482, 491-509, 721-733	P14625
BIP <sup>1</sup>	32-42, 64-78, 80-95, 84-95, 105-120, 121-134, 146-163, 147-163, 168-179, 180-195, 180-196, 280-288, 289-306, 307-318, 309-318, 336-349, 359-368, 418-428, 430-446, 457-474, 475-492, 506-514, 515-522, 541-555, 584-599, 584-601, 604-615	AJ271729
HSP70-1 <sup>1</sup> Chaperone	4-25, 57-71, 57-72, 113-126, 129-155, 160-171, 172-187, 221-236, 237-246, 237-247, 300-311, 302-311, 326-342, 329-342, 349-357, 349-361, 362-384, 424-447, 510-517, 525-533(m.c.1), 540-550, 629-641	NP_005336
Lamin A <sup>1</sup>	1-8, 12-25, 29-41, 51-60, 61-72, 79-89, 79-90, 124-133, 134-144, 145-156, 156-166, 181-189, 182-190, 197-208, 209-216, 226-235, 250-261	P02545
Lamin B1 <sup>1</sup>	1-9, 51-66, 79-89, 79-90, 102-110, 109-122, 111-122, 124-135, 134-144, 145-156, 157-166, 222-233, 258-270, 367-377, 379-386	NP_005564
Desmoplakin I <sup>1</sup>	852-860, 852-862, 871-879, 880-889, 882-889, 890-897, 901-911, 974-981, 982-991, 1016-1024, 1043-1050, 1075-1084, 1094-1102, 1109-1116, 1157-1169, 1181-1190, 1232-1240, 1241-1250, 1265-1272, 1220-1231, 1251-1258, 1251-1264, 1336-1343, 1389-1397, 1399-1408, 1418-1433, 1472-1482, 1501-1511, 1512-1521, 1522-1531, 1532-1541, 1560-1568, 1588-1595, 1659-1674, 1820-1832, 1870-1881	A38194
Mitofilin <sup>2</sup>	171-195, 196-211, 258-269, 276-284, 331-343, 331-344, 354-366, 372-385, 396-410, 517-525, 527-545, 527-547, 546-564, 548-564, 582-600, 601-623, 624-632, 690-708, 709-718, 719-726	Q16891
Myosin heavy chain 12 <sup>2</sup>	515-526, 570-581, 587-597, 641-659, 776-783, 792-801, 802-810, 839-849, 942-949, 985-994, 1007-1015, 1008-1017, 1051-1058, 1198-1208, 1218-1226, 1287-1301	A59254
Myosin-IXA <sup>2</sup>	666-681, 702-710, 711-720, 740-754, 776-790, 811-820, 832-842, 845-854, 877-884, 923-934, 1005-1021, 1022-1028, 1029-1036, 1037-1043, 1218-1228, 1229-1237, 1254-1265	AAH34228
Peptidyl prolyl isomerase <sup>1</sup>	2-19, 20-28, 20-31, 56-69, 77-91, 83-91, 119-131, 132-144, 134-144	AAM63961
Putative acetyl-transferase <sup>2</sup>	185-201, 263-276, 339-357, 358-366, 448-454, 497-506, 550-556, 606-613, 688-696, 697-714, 757-765	Q9BXJ9
Aconitate hydratase, iron dependent	2-10, 58-68, 59-68, 69-84, 87-95, 118-138, 145-160, 234-245, 367-378, 371-378, 412-424, 430-437, 438-457-522-534, 574-587, 578-587, 592-605, 634-648, 657-671, 702-717, 731-739	T52543
Glutathione-S-transferase <sup>2</sup>	1-12, 2-12, 2-14, 15-30, 20-30, 31-45, 56-71, 76-101, 83-101, 104-121, 122-141, 190-209, 192-210	A37378
Serine/threonine-specific protein kinase <sup>2</sup>	528-539, 529-539, 589-596, 591-601, 602-61, 667-678, 710-718, 710-719, 730-739, 820-830, 820-833, 877-885, 878-885, 1022-1029	S69211
MAP kinase 1 <sup>1</sup>	2-21, 22-37, 25-37, 25-37, 57-72, 57-72, 103-118, 119-128, 119-133, 146-167, 168-180, 213-226	P04406
Pyruvate kinase M1 isoenzyme	32-42, 43-55, 73-88, 92-114, 136-150, 151-161, 173-185, 188-205, 188-206, 206-223, 207-223, 278-293, 319-335, 367-375, 383-398, 400-421, 467-474, 475-488	P14618

Ribos. prot RS 40 k <sup>1</sup>	54-63, 64-80, 86-102, 90-102, 103-117, 121-128, 129-155, 156-166	A31233
KIAA1349 <sup>2</sup>	143-154, 160-170, 227-239, 305-313, 361-369, 399-416, 492-500, 516-528, 520-528, 529-537, 540-547, 577-590, 591-603, 604-612, 660-670	Q9P2J8
DEAD box protein RB <sup>1</sup>	85-92, 93-108, 127-140, 218-228, 234-246, 314-324, 325-343, 395-410, 446-452, 467-484, 500-508, 531-543, 562-571, 572-590, 620-628	A47743
Polybromo-1 <sup>2</sup>	301-317, 417-425, 417-434, 426-434, 426-436, 491-511, 525-534, 541-552, 542-552, 580-595, 680-690	NP_060783
HSPC017 <sup>2</sup>	77-91, 92-101, 128-141, 130-141, 142-149, 150-165, 224-235, 243-253, 254-264, 265-280, 269-280, 286-297, 336-347	AAD26998
Unknown protein for MGC8882 <sup>2</sup>	209-219, 272-279, 307-318, 333-344, 338-346, 367-376, 368-376, 368-382, 386-391, 392-402, 412-422, 471-479, 497-504, 523-538, 593-599, 605-615, 640-649, 706-717	Q96ED9
KIAA1751 <sup>1</sup>	29-41, 42-48, 80-86, 144-150, 144-157, 151-160, 168-174, 193-199, 197-204, 205-210	BAB21842
Platelet activating factor acetylhydrolase IB alpha <sup>1</sup>	20-31, 20-32, 33-45, 71-87, 92-100, 133-143, 147-162, 163-174, 175-185, 228-237, 238-258, 302-315, 303-315, 360-367, 374-389, 390-404	LIS_HUMAN
NIT protein 2 <sup>1</sup>		
Sequence 135 from patent EP 1067182 <sup>1</sup>	82-89, 90-104, 105-116, 126-135, 128-135, 128-146, 147-155, 156-168, 192-199, 203-211, 204-211, 204-216	CAC39749
D50929 <sup>1</sup>	416-438, 547-559, 573-579, 673-681, 695-702, 733-740, 778-787, 788-794, 811-817, 890-900, 947-959, 981-990	BAA09488

**Anhang Tabelle 16:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

<b>Protein Name</b>	<b>Identifizierte Peptide</b>	<b>Accession-number</b>
Lamin A	1-8, 12-25, 29-41, 51-60, 61-72, 79-89, 79-90, 124-133, 134-144, 145-156, 156-166, 181-189, 182-190, 197-208, 209-216, 226-235, 250-261	P02545
Mitofilin	85-102, 217-229, 276-284, 287-297, 305-313, 316-330, 344-353, 354-366, 354-370, 372-385, 428-436, 444-457, 458-467, 486-495, 548-564, 565-577, 582-600	Q16891
Stathmin	14-26, 27-40, 29-40, 43-51, 52-59, 53-60, 62-69, 85-94, 104-111, 137-148	BAA5794
Annexin II	1-9, 10-27, 28-46, 47-62, 49-62, 68-76, 104-114, 115-134, 119-134, 152-137, 157-167, 157-168, 178-195, 179-195, 212-219, 233-245, 313-323, 313-328, 324-338	BAA05730
Annexin I	9-25, 29-52, 58-71, 81-96, 81-97, 113-123, 128-143, 166-176, 185-203, 188-203, 204-212, 213-227, 214-227, 294-302	NP_000691
HSTCP1, similar to HSP60,	19-33, 110-122, 131-145, 146-153, 234-243, 248-259, 248-264, 299-310, 369-378, 391-400, 434-443, 469-480, 469-481, 485-496, 500-510, 516-526, 533-541	XP_116321
Hum. thyroid bind. protein	31-42, 32-42, 82-97, 121-130, 196-207, 214-230, 223-230, 231-247, 255-263, 301-308, 301-309, 309-316, 317-326, 327-338, 339-345, 376-386, 410-424, 437-444	AAA61169.1
Triosephosphate-isomerase	5-13, 6-13, 18-32, 19-32, 33-52, 59-68, 69-84, 99-112, 100-112, 113-130, 156-174, 175-187, 194-205, 206-218, 219-247	TPIS_HUMAN
Acyl-CoA DH	24-35, 36-45, 184-201, 184-202, 203-214, 215-225, 226-237, 261-272, 362-374	NP_000009
Ninein	1514-1523, 1627-1638, 1643-1651, 1654-1673, 1697-1706, 1707-1719, 1745-1753, 1750-1763, 1764-1772, 1796-1805, 1845-1858, 1881-1891, 1883-1891, 1915-1921, 1930-1941, 2001-2010, 2034-2046, 2034-2047	Q9UH61

Glutathione-S-transferase	1-12, 2-12, 2-14, 15-30, 20-30, 31-45, 56-71, 76-101, 83-101, 104-121, 122-141, 190-209, 192-210	A37378
Thioredox. peroxidase	8-16, 17-27, 94-110, 110-120, 111-120, 129-136, 141-151, 169-190	A46711
Nucleoside diphosphate kinase	7-18, 19-27, 57-66, 89-105, 106-114, 115-128	O00746
Ribosomal protein L13	6-17, 23-35, 60-75, 87-103, 104-120	BC009190.1
EF-Tu	24-32, 57-73, 94-105, 95-105, 108-123, 210-227, 239-252, 253-271, 272-281, 286-297, 287-297, 316-327, 352-361	P43897
GTP binding protein	45-57, 48-57, 89-99, 89-100, 101-118, 107-118, 131-139, 140-155, 156-172, 176-183, 186-212, 213-225, 226-245, 246-257, 265-280, 309-317	B33928 human
KIAA1751	29-41, 42-48, 80-86, 144-150, 144-157, 151-160, 168-174, 193-199, 197-204, 205-210	BAB21842

**Anhang Tabelle 18:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

<b>Protein Name</b>	<b>Identifizierte Peptide</b>	<b>Accession-number</b>
Cytokeratin 18	9-39, 45-75, 119-125, 126-143, 132-143, 144-152, 160-169, 170-180, 170-181, 248-255, 365-375	CAA31377
Lamin B2 <sup>1</sup>	74-84, 74-85, 95-103, 104-113, 106-116, 129-138, 139-151, 152-161, 162-175, 192-202, 192-203, 204-211, 204-214, 236-244, 245-252, 253-265, 294-306, 315-326, 337-344, 362-372, 373-381, 397-410, 470-482, 475-482, 485-496, 530-541, 542-555	NP_116126
Fascin (actin binding protein) <sup>1</sup>	43-62, 68-81, 82-89, 90-99, 100-108, 100-109, 109-117, 110-117, 118-130, 151-166, 185-196, 201-216, 247-270, 379-388, 389-397, 398-407, 408-425, 468-478	FSC1_HUMAN
HUMKER B typ II cytoskeletal 8 <sup>2</sup>	9-18, 12-23, 24-40, 89-96, 123-130, 123-133, 179-185, 214-225, 253-264, 286-295, 303-312, 317-325, 329-341, 348-362, 353-362, 393-401	AAA35763
Myosin heavy chain VA <sup>2</sup>	64-74, 155-164, 201-216, 304-311, 312-325, 347-358, 370-379, 391-400, 401-412, 440-453, 450-458, 524-531, 550-559, 552-559, 571-579, 580-588, 590-608, 595-608, 640-648	Q9Y411
HSP 70-1	4-25, 57-71, 57-72, 113-126, 129-155, 160-171, 172-187, 221-236, 237-246, 237-247, 300-311, 302-311, 326-342, 329-342, 349-357, 349-361, 362-384, 424-447, 510-517, 525-533, 540-550, 629-641	NP_005336
Heat shock 60kDa protein 1 <sup>2</sup>	51-62, 87-111, 116-123, 196-208, 212-223, 212-226, 227-239, 240-258, 241-258, 259-280, 292-300, 361-379, 420-436, 453-460, 472-483	NP_002147
3-oxo-thiolase	14-25, 15-25, 46-71, 110-130, 215-234, 271-278, 279-305, 313-332, 341-360, 341-360, 361-370, 361-371	S43440
Prohibitin <sup>2</sup>	12-35, 36-43, 75-93, 84-93, 94-105, 106-117, 129-143, 134-143, 134-148, 158-177, 187-195, 220-239, 240-253, 241-253, 254-272	P35232
CTCL tumor antigen SE2-1 <sup>2</sup>	93-104, 93-108, 121-128, 131-138, 146-157, 158-170, 181-192, 360-368, 401-414, 407-414, 444-451	AAG34903
Apaf-1	45-58, 64-81, 82-100, 161-169, 170-189, 190-198, 278-290, 316-332, 333-343, 338-343, 377-391, 432-448, 586-600, 655-670	O14727
ATPase homolog 26 S subunit	70-80, 71-81, 115-134, 122-134, 179-192, 218-229, 274-283, 314-326, 330-338, 331-339, 342-351, 343-351, 370-388, 389-397	AAH16368
Lyst interacting Prot LIP7	13-21, 16-23, 25-33, 25-35, 36-44, 105-114, 107-114, 129-135, 175-183, 184-191	AAG49446
Elastone inhibitor <sup>1</sup>	57-69, 70-79, 70-80, 97-110, 111-129, 111-130, 178-189, 194-201, 204-213, 204-215, 246-254, 276-290, 278-290, 291-301, 312-321, 364-375	AAH09015

Truncated rad50 protein <sup>1</sup>	37-45, 46-54, 55-63, 81-91, 116-125, 118-125, 126-134, 146-156, 205-213, 253-259, 271-282, 287-294, 298-307, 363-372, 407-414	Q9UP86
NY-REN-58 antigen <sup>1</sup>	7-14, 15-21, 24-30, 51-62, 67-76, 97-106, 126-135, 256-269, 284-294, 303-313, 322-334, 335-343, 379-385, 403-410, 431-439	AAD42881
Golgin like protein <sup>2</sup>	111-118, 139-146, 147-156, 175-193, 189-199, 224-234, 230-237, 306-317, 348-355, 409-415	XP_208843
BAC 33152 chromosome 19 (AAB94784) <sup>1</sup>	68-75, 76-84, 138-149, 241-247, 268-280, 281-288, 294-306, 411-419, 428-442, 485-492, 551-563, 565-572, 567-573, 614-622, 615-623, 661-669, 678-686	AAB94784

**Anhang Tabelle 19:** Die *Accession-number* wurde der Mascot-Datenbank entnommen.

<b>Protein Name</b>	<b>Identifizierte Peptide</b>	<b>Accession-number</b>
Lamin A	29-41, 61-72, 63-78, 79-90, 100-108, 124-135, 134-144, 136-144, 145-156, 157-166, 157-171, 182-190, 197-208, 202-208, 209-219, 226-235, 241-249, 281-296, 297-311, 299-311, 367-378, 379-386, 440-453, 528-542, 598-624, 628-644	P02545
Lamin C	12-45, 29-41, 51-60, 61-72, 79-89, 91-99, 100-108, 124-133, 124-135, 136-144, 145-156, 156-166, 157-166, 157-171, 197-208, 209-216, 226-235, 241-249, 281-296, 297-311, 299-311, 352-366, 367-378, 379-386, 379-388, 420-427, 428-435, 440-453, 458-471, 471-482, 546-571	P02545
Keratin 19, typ I cytoskeletal	1-7, 82-90, 139-150, 177-188, 198-208, 254-265, 265-274, 266-274, 275-293, 281-293, 302-317, 318-330, 331-365, 359-365, 373-381, 382-398	P08727
Cytokeratin 18	9-39, 45-75, 76-84, 106-112, 119-125, 126-143, 132-143, 132-143, 144-152, 160-169, 162-169, 162-180, 170-180, 170-181, 181-190, 182-190, 248-255, 365-375	CAA31377
Desmoplakin I	1199-1209, 1220-1231, 1220-1231, 1251-1258, 1251-1264, 1273-1285, 1304-1312, 1336-1343, 1359-1370, 1365-1376, 1379-1387, 1418-1432	A38194
HUMKER B typ II cytoskel. 8 <sup>2</sup>	123-130, 134-148, 134-149, 161-176, 161-178, 187-197, 199-213, 214-225, 226-233, 234-252, 253-264, 274-285, 286-295, 317-325, 317-328, 329-347, 342-352, 382-392	AAA35763
HUMKER B typ II cytoskel. 8 <sup>2</sup>	1-9, 2-9, 10-21, 22-29, 30-48, 49-60, 70-81, 72-81, 82-91, 113-121, 113-124, 125-137, 125-143, 149-158, 178-189	AAA35763
HUMKER B typ II cytoskel. 8 <sup>2</sup>	24-32, 89-96, 123-130, 134-148, 150-158, 199-213, 214-225, 226-233, 234-252, 253-264, 274-285, 303-312, 317-325, 317-328, 329-341, 382-393, 393-401, 472-482	AAA35763
Mitofilin (HMP) <sup>2</sup>	123-132, 171-195, 212-222, 276-284, 286-297, 287-297, 287-299, 316-330, 344-353, 354-366, 386-395, 396-410, 517-525, 517-526, 527-545, 548-564, 565-577, 582-600, 601-623, 624-632, 719-726	NP_006830
Plectin <sup>1</sup>	18-28, 62-70, 83-91, 133-143, 237-248, 249-257, 258-266, 297-305, 342-352, 393-402, 394-404, 426-436, 437-446, 468-478, 491-501, 539-549	Q15149
Nucleoporin <sup>1</sup>	63-78, 139-159, 187-198, 255-269, 281-295, 282-297, 304-314, 347-364, 375-387, 376-387, 376-387, 402-412, 420-431, 476-486, 503-513, 514-523, 529-540, 541-562, 607-618, 677-684	AAK27309
Myosin heavy chain, nonmuscle type A	64-74, 155-164, 201-216, 304-311, 312-325, 347-358, 370-379, 391-400, 401-412, 440-453, 450-458, 524-531, 550-559, 552-559, 571-579, 580-588, 590-608, 595-608, 640-648	P35579
Profilin	25-36, 37-52, 37-54, 55-68, 74-87, 88-103, 90-103, 104-114, 107-124, 125-134, 126-135	P10924
Annexin 4	9-23, 9-24, 28-43, 100-115, 122-133, 123-133, 141-149, 150-171, 160-171, 192-199, 202-213, 214-224, 275-283, 308-318	P09525

Annexin IV <sup>1</sup>	9-23, 9-24, 28-43, 100-115, 122-133, 123-133, 141-149, 150-171, 160-171, 192-199, 202-213, 214-224, 275-283, 308-318	P09525
Annexin IV <sup>1</sup>	9-23, 9-24, 28-43, 100-115, 122-133, 123-133, 141-149, 150-171, 160-171, 192-199, 202-213, 214-224, 275-283, 308-318	P09525
HSP 70-1	4-25, 57-71, 160-171, 172-187, 221-236, 237-246, 237-247, 300-311, 302-311, 312-322, 329-342, 349-357, 349-361, 424-447, 459-469, 540-550, 629-641	NP_005336
HSC 54	4-25, 26-36, 138-155, 160-171, 221-236, 300-311, 302-311, 349-357, 424-447	Q9H3R6
HSPA5 chaperone	50-60, 82-96, 82-97, 102-113, 114-122, 123-138, 139-152, 153-163, 165-181, 186-197, 198-214, 262-268, 298-306, 307-324, 325-336, 354-367, 377-386, 448-464, 465-474, 475-492, 493-510, 524-532, 533-540, 602-617, 602-619, 622-633, 634-654	CAB71335
Chaperonin <sup>2</sup>	51-62, 87-111, 116-123, 196-208, 212-223, 212-226, 227-239, 240-258, 241-258, 259-280, 292-300, 361-379, 420-436, 453-460, 472-483	NP_002147
PDI precursor <sup>2</sup>	5-20, 62-73, 83-94, 95-104, 105-119, 108-119, 130-140, 259-271, 289-296, 290-304, 305-329, 306-329, 336-344, 352-362, 352-363, 418-425, 434-448, 449-460, 449-461, 472-482, 483-497	ISHUSS
HSTCP1 <sup>1</sup>	19-33, 44-63, 64-73, 131-145, 131-153, 190-199, 234-243, 248-259, 248-264, 278-298, 299-309, 379-390, 391-400, 407-433, 444-466, 469-481, 485-496, 500-510, 516-526	XP_116321
ER luminal protein 28	60-69, 60-74, 76-99, 113-122, 123-137, 178-192, 197-204, 198-204, 209-223, 209-226, 244-253	CAA64397
Isocitrate-DH	83-89, 101-109, 133-140, 152-164, 223-233, 244-249, 322-338	O43837
Mitochondrial porin	20-38, 88-100, 90-100, 101-122, 123-135, 123-136, 193-200, 201-223, 224-244, 251-262, 263-282, 283-292, 301-308	A45972
H <sup>+</sup> transp. ATP synthase	134-149, 150-161, 219-230, 231-239, 232-239, 254-262, 306-316, 323-334, 335-347, 403-416, 442-463, 473-493, 494-503, 499-506, 504-527	NP_001686
Acetyltransferase (put.)	185-201, 263-276, 339-357, 358-366, 448-454, 497-506, 550-556, 606-613, 688-696, 697-714, 757-765	Q9BXJ9
Phosphoglycerate-DH	9-20, 9-21, 21-33, 34-54, 39-54, 59-75, 237-247, 248-268, 248-270, 271-289, 352-364, 365-380, 462-469, 470-491, 523-533	AAH01349
Succinate-DH <sup>2</sup>	47-75, 76-92, 163-171, 189-195, 233-246, 251-261, 262-282, 326-335, 336-345, 424-451, 452-465, 466-480, 539-547, 590-598, 599-615, 601-615, 601-615, 616-623, 624-636, 637-647, 648-662	Q99643
OAT <sup>1</sup>	1-14, 15-29, 15-31, 32-41, 135-145, 221-236, 221-239, 240-257, 328-337, 340-348, 362-378, 364-378, 379-391	2OATA
Triosephosphate-isomerase <sup>1</sup>	6-13, 33-52, 85-98, 99-112, 113-130, 156-174, 194-205, 219-247	TPIS_HUMAN
Fructose-biphosphat aldolase <sup>1</sup>	1-12, 43-56, 60-68, 87-98, 111-133, 111-133, 153-172, 243-257, 322-330, 342-363	ADHUA
SOD	12-23, 54-68, 54-75, 76-89, 90-114, 115-123, 124-132, 135-154, 135-156, 203-216	DSHUN
Glut.-S-Transferase	1-12, 2-12, 2-14, 15-30, 20-30, 31-45, 56-71, 76-101, 83-101, 104-121, 122-141, 190-209, 192-210, 192-210	NP_000842
Pyruvat-kinase	44-56, 74-89, 93-115, 142-151, 174-186, 271-278, 279-294, 280-294, 384-399, 384-400, 468-489, 476-489	S30038
Ser/threo specific PK <sup>2</sup>	404-415, 423-434, 529-539, 591-601, 665-676, 730-739, 820-830, 877-885, 907-921, 927-934, 929-940, 935-950, 1037-1045, 1121-1134, 1141-1148, 1150-1172, 1285-1293	P05771
MAD1A	95-102, 131-143, 208-226, 271-288, 274-288, 337-344, 350-360, 388-395, 470-478, 577-599, 696-714	AAD24498
Cell cycle dep. 350 K nuclear prot.	170-186, 187-208, 241-252, 253-266, 267-275, 337-351, 339-355, 356-364, 356-370, 508-516, 527-534, 535-546, 569-578, 587-594, 595-605, 623-632, 639-653, 678-688, 739-750, 757-766, 759-776	PC4035

Gonadotropin inducible transcription repressor-4 <sup>2</sup>	259-267, 272-282, 287-296, 324-336, 343-351, 352-366, 368-379, 371-379, 455-463, 483-491, 520-534, 552-562, 563-573, 576-588, 619-631	Q9ULZ5
EF-Tu <sup>2</sup>	54-70, 91-102, 92-102, 105-120, 121-135, 163-169, 183-200, 210-227, 210-234, 239-252, 253-271, 316-327, 316-327, 316-330, 352-361	P43897
Translation initiation factor eIF-3 Prt 1-chain <sup>1</sup>	231-254, 263-284, 272-288, 335-345, 342-355, 371-386, 417-430, 437-459, 493-501, 536-548, 536-550, 587-599, 600-608, 600-608, 677-693, 762-772	T09582
FUSE 2 (KRSP)	88-109, 88-110, 111-122, 122-142, 123-142, 151-162, 170-190, 170-190, 178-190, 263-284, 267-284, 307-320	NP_003676
KSRP	88-109, 88-110, 122-142, 123-142, 143-162, 170-190, 178-190, 206-214, 263-284, 267-284, 307-320, 332-340, 385-394, 414-435, 449-462, 474-488, 647-654, 655-683	AAB53222
Stratifin	12-27, 28-41, 33-41, 33-49, 42-49, 42-56, 69-82, 88-109, 123-129, 161-169, 196-214, 215-224	NP_006133
Apaf-1 <sup>1</sup>	45-58, 64-81, 82-100, 161-169, 170-189, 190-198, 278-290, 316-332, 333-343, 338-343, 377-391, 432-448, 586-600, 655-670	O14727
MGC 15366	82-97, 139-150, 254-265, 265-274, 266-274, 266-274, 275-293, 281-293, 318-330, 359-365, 371-381, 373-381, 382-398	AAH10409
Galectin-3 carbohydrate recognition domaine	17-31, 39-49, 50-56, 64-73, 74-86, 87-97, 98-111	1A3K
Phosphoglycerate mutase brain form	10-20, 21-38, 21-39, 46-60, 46-61, 90-99, 141-161, 162-175, 179-190, 180-190, 222-239	PMGB_human
NMP 238	47-57, 77-90, 91-107, 108-117, 109-117, 153-162, 172-182, 183-201, 185-201, 185-202, 269-276, 318-333, 340-357, 363-376, 379-400, 405-418, 423-441, 428-441	Q9Y265
KIF 1 B <sup>2</sup>	295-301, 365-372, 437-450, 557-565, 574-582, 588-595, 636-644, 672-679, 726-736, 737-753, 757-766, 778-786, 791-802, 791-811, 893-903, 921-928	AY043362
Dynamin 1-like protein <sup>2</sup>	13-22, 13-27, 23-34, 127-141, 314-327, 507-532, 569-580, 614-623, 634-642, 693-705	Q9BMW1
GCP 170 <sup>2</sup>	904-912, 913-929, 944-957, 981-990, 998-1008, 1081-1094, 1083-1097, 1110-1118, 1133-1145, 1169-1183, 1200-1207, 1297-1304, 1305-1316, 1317-1329, 1330-1344	BAA23661
BB152015.1 <sup>2</sup>	15-27, 32-53, 41-53, 120-135, 136-149, 168-175, 176-188, 241-257, 263-274, 275-281, 361-384, 375-385, 432-457	CAC16610
KIAA0912 protein <sup>1</sup>	191-199, 197-209, 200-212, 221-230, 231-241, 287-300, 480-492, 493-504, 529-550, 606-618, 609-622, 619-628, 629-642, 649-656, 657-672, 673-680, 695-703, 819-829, 831-841, 863-873, 903-919, 1001-1012, 1029-1047, 1149-1161, 1246-1265	O94986
Transposase <sup>1</sup>	1-9, 14-22, 15-32, 23-32, 39-51, 110-117, 110-127, 128-139, 149-165, 158-165	Q96N14
Truncated rad50 protein <sup>1</sup>	37-45, 46-54, 55-63, 81-91, 116-125, 118-125, 126-134, 146-156, 205-213, 253-259, 271-282, 287-294, 298-307, 363-372, 407-414	Q9UP86
Elastone inhibitor <sup>1</sup>	57-69, 70-79, 70-80, 97-110, 111-129, 111-130, 178-189, 194-201, 204-213, 204-215, 246-254, 276-290, 278-290, 291-301, 312-321, 364-375	AAH09015

### 8.3.3 Literaturverzeichnis

1. HMSO. Mortality Statistics. Cause. England and Wales. London 1992.
2. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 1994;35(11):1590-2.
3. Steinert R, Buschmann T, van der Linden M, Fels LM, Lippert H, Reymond MA. The role of proteomics in the diagnosis and outcome prediction in colorectal cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2002;1(4):297-304.
4. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet* 1999;353(9150):391-9.
5. Ransohoff DF, Lang CA. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1991;325(1):37-41.
6. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87(2):159-70.
7. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987;328(6131):614-6.
8. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992;340(8820):626-30.
9. Nakamura Y. The role of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human cancers. *Adv Cancer Res* 1993;62:65-87.
10. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359(6392):235-7.
11. Ilyas M, Tomlinson IP. The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol* 1997;182(2):128-37.
12. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262(5140):1731-4.
13. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):3046-50.
14. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 1997;57(20):4624-30.
15. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(15):7950-4.
16. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281(5382):1509-12.
17. Arends J. Effects of a combined thermochemotherapy on markers of apoptosis, differentiation and adhesion in the human mammary carcinoma MX-1. A light microscopic and immunohistochemical study. *Anat Anz* 2000;182(4):339-47.
18. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
19. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282(5392):1318-21.

20. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398(6726):422-6.
21. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996;13(3):343-6.
22. Moskaluk CA, Kern SE. Cancer gets Mad: DPC4 and other TGFbeta pathway genes in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288(3):M31-3.
23. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996;86(4):543-52.
24. de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, et al. Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* 1998;12(11):1587-92.
25. Kawada M, Yamagoe S, Murakami Y, Suzuki K, Mizuno S, Uehara Y. Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 1997;15(6):629-37.
26. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997;3(2):231-4.
27. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-6.
28. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253(5015):49-53.
29. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329(18):1318-27.
30. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66(3):589-600.
31. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253(5020):661-5.
32. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999;45(3):409-15.
33. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertsen H, Gelbert L, Samowitz W, et al. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 1991;66(3):601-13.
34. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;253(5020):665-9.
35. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368(6468):258-61.
36. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1994;77(1):167.
37. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75(6):1215-25.

38. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17(3):271-2.
39. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371(6492):75-80.
40. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991;25:229-53.
41. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997;6(1):105-10.
42. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104(5):1535-49.
43. Myrhoj T, Bisgaard ML, Bernstein I, Svendsen LB, Sondergaard JO, Bulow S. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical features and survival. Results from the Danish HNPCC register. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(6):572-6.
44. Barth RJ, Jr., Camp BJ, Martuscello TA, Dain BJ, Memoli VA. The cytokine microenvironment of human colon carcinoma. Lymphocyte expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-4 predicts improved survival. *Cancer* 1996;78(6):1168-78.
45. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997;182(3):318-24.
46. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 8):S4-66.
47. Riboli E. Nutrition and cancer: background and rationale of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Ann Oncol* 1992;3(10):783-91.
48. Rohrmann S, Becker N. Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines. *Public Health Nutr* 2002;5(5):699-705.
49. Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA. Red meat and colorectal cancer risk: the effect of dietary iron and haem on endogenous N-nitrosation. *IARC Sci Publ* 2002;156:205-6.
50. WCRF WCRF, American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research 1997.
51. Michels KB, Edward G, Joshipura KJ, Rosner BA, Stampfer MJ, Fuchs CS, et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(21):1740-52.
52. Tomatis L, Bartsch H. The contribution of experimental studies to risk assessment of carcinogenic agents in humans. *Exp Pathol* 1990;40(4):251-66.
53. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999;340(3):169-76.
54. Patterson RE, White E, Kristal AR, Neuhauser ML, Potter JD. Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control* 1997;8(5):786-802.
55. Terry P, Jain M, Miller AB, Howe GR, Rohan TE. Dietary carotenoid intake and colorectal cancer risk. *Nutr Cancer* 2002;42(2):167-72.
56. Wu K, Willett WC, Chan JM, Fuchs CS, Colditz GA, Rimm EB, et al. A prospective study on supplemental vitamin e intake and risk of colon cancer in women and men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(11):1298-304.

57. McCullough ML, Robertson AS, Rodriguez C, Jacobs EJ, Chao A, Carolyn J, et al. Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in the cancer prevention study II nutrition cohort (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14(1):1-12.
58. Duke J. Handbook of Phytochemical constituents of GRAS Herbs and other Economic Plants: Herbal Reference Library CRC Pr, 2000.
59. Park AM, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol* 2003;36(1):66-77.
60. Middleton EM, Teramura AH. The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiol* 1993;103(3):741-52.
61. Moyano E, Martinez-Garcia JF, Martin C. Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. *Plant Cell* 1996;8(9):1519-32.
62. Mortenson LE, Thorneley RN. Structure and function of nitrogenase. *Annu Rev Biochem* 1979;48:387-418.
63. Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr* 2000;130(5):1200-3.
64. Watzl B, Rechkemmer G. Validity of dietary assessment. *Am J Clin Nutr* 2001;74(2):273-4.
65. Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):G120-6.
66. Hollman PC, Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res* 1999;31(Suppl):S75-80.
67. Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* 1999;31(6):569-73.
68. Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 1998;29(3):257-69.
69. Ueno I, Nakano N, Hirono I. Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med* 1983;53(1):41-50.
70. Hollman PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl* 1998;20:237-48.
71. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33(12):1061-80.
72. Podhajcer OL, Friedlander M, Graziani Y. Effect of liposome-encapsulated quercetin on DNA synthesis, lactate production, and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate level in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1980;40(4):1344-50.
73. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 1998;426(3):331-6.
74. Griffiths LA, Barrow A. The fate of orally and parenterally administered flavonoids in the mammal. The significance of biliary excretion. *Angiologica* 1972;9(3-6):162-74.
75. Winter J, Moore LH, Dowell VR, Jr., Bokkenheuser VD. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1989;55(5):1203-8.

76. Graefe EU, Veit M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine* 1999;6(4):239-46.
77. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.
78. Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1994;1205(2):325-35.
79. Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 1998;36(8):617-21.
80. Wei H, Cai Q, Rahn RO. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis* 1996;17(1):73-7.
81. Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res* 2000;91(7):686-91.
82. Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 1989;49(18):5111-7.
83. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E, Jr. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Lett* 1991;56(2):147-52.
84. Lin JK, Chen YC, Huang YT, Lin-Shiau SY. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 1997;28-29:39-48.
85. Weber G, Shen F, Prajda N, Yang H, Li W, Yeh A, et al. Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv Enzyme Regul* 1997;37:35-55.
86. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 2001;19(4):837-44.
87. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001;61(10):1205-15.
88. Kim SY, Gao JJ, Kang HK. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. *Biol Pharm Bull* 2000;23(4):451-5.
89. Takahashi N, Fukui T, Iwahori A, Kubo Y, Hosoe T, Kawai K. Induction of differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL60 cell line by a new type of steroids. *Exp Cell Res* 1998;245(2):313-20.
90. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60(14):3823-31.
91. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, et al. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(16):8395-400.
92. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53(17):3976-85.
93. Janicke RU, Walker PA, Lin XY, Porter AG. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *Embo J* 1996;15(24):6969-78.

94. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, et al. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996;183(5):1957-64.
95. Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, et al. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J* 1995;14(24):6148-56.
96. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102(1):33-42.
97. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410(6828):549-54.
98. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* 2002;63(2):225-36.
99. Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res* 2000;20(6B):4339-45.
100. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 1999;9(4):369-76.
101. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999;35(10):1517-25.
102. Kaltschmidt E, Wittmann HG. Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970;67(3):1276-82.
103. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26(3):231-43.
104. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-21.
105. Aebersold R, Leavitt J. Sequence analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis: towards an integrated protein database. *Electrophoresis* 1990;11(7):517-27.
106. Tan S, Seow TK, Liang RC, Koh S, Lee CP, Chung MC, et al. Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 2002;98(4):523-31.
107. Hanash SM, Teichrow D. Mining the human proteome: experience with the human lymphoid protein database. *Electrophoresis* 1998;19(11):2004-9.
108. Melhem R, Hailat N, Kuick R, Hanash SM. Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia. *Leukemia* 1997;11(10):1690-5.
109. Kim J, Kim SH, Lee SU, Ha GH, Kang DG, Ha NY, et al. Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Electrophoresis* 2002;23(24):4142-56.
110. Fogh J TG. New human tumor cell lines In Fogh J ed. Human Tumor cells in vitro. *Plenum Press* 1995:115-41.
111. Deveney CW, Rand-Luby L, Rutten MJ, Luttrupp CA, Fowler WM, Land J, et al. Establishment of human colonic epithelial cells in long-term culture. *J Surg Res* 1996;64(2):161-9.

112. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376(6535):37-43.
113. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21(6):1037-53.
114. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(259):680-5.
115. Wallin E, von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 1998;7(4):1029-38.
116. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995;16(6):1034-59.
117. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982;6(4):317-39.
118. Ramsby ML, Makowski GS, Khairallah EA. Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis* 1994;15(2):265-77.
119. Blum A BH, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 1987;8:93-99.
120. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60(20):2299-301.
121. Brown RS, Lennon JJ. Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions. *Anal Chem* 1995;67(21):3990-9.
122. Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem* 2001;73(3):434-8.
123. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
124. Mayer D, Muhlhofer A, Biesalski HK. A modified system to evaluate the potency of anti-oxidative compounds in different cell types in vitro. *Eur J Med Res* 2001;6(5):201-8.
125. Stegh AH, Herrmann H, Lampel S, Weisenberger D, Andra K, Seper M, et al. Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20(15):5665-79.
126. Chiang Y, Rizzino A, Sibenaller ZA, Wold MS, Vishwanatha JK. Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 1999;199(1-2):139-47.
127. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286(3):433-42.
128. Satoh H, Nakano Y, Shibata H, Maki M. The penta-EF-hand domain of ALG-2 interacts with amino-terminal domains of both annexin VII and annexin XI in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Biochim Biophys Acta* 2002;1600(1-2):61-7.
129. Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, Powis G. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection

against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 2001;392(1):103-9.

130. Yu W, Murray NR, Weems C, Chen L, Guo H, Ethridge R, et al. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C beta II-mediated colon carcinogenesis. *J Biol Chem* 2003;278(13):11167-74.

131. Gerner C, Frohwein U, Gotzmann J, Bayer E, Gelbmann D, Bursch W, et al. The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J Biol Chem* 2000;275(50):39018-26.

132. Satoh H, Shibata H, Nakano Y, Kitaura Y, Maki M. ALG-2 interacts with the amino-terminal domain of annexin XI in a Ca(2+)-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(5):1166-72.

133. Mistry SJ, Atweh GF. Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy. *Mt Sinai J Med* 2002;69(5):299-304.

134. Canaider S, Solito E, de Coupade C, Flower RJ, Russo-Marie F, Goulding NJ, et al. Increased apoptosis in U937 cells over-expressing lipocortin 1 (annexin I). *Life Sci* 2000;66(18):PL265-70.

135. Hong YR, Chen CH, Chang JH, Wang S, Sy WD, Chou CK, et al. Cloning and characterization of a novel human ninein protein that interacts with the glycogen synthase kinase 3beta. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492(2-3):513-6.

136. Radomski N, Jost E. Molecular cloning of a murine cDNA encoding a novel protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle. *Exp Cell Res* 1995;220(2):434-45.

137. Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;276(44):41175-81.

138. Tabuchi A, Funaji K, Nakatsubo J, Fukuchi M, Tsuchiya T, Tsuda M. Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. *J Neurosci Res* 2003;71(4):504-15.

139. Cui Y, Mirkia K, Florence Fu YH, Zhu L, Yokoyama KK, Chiu R. Interaction of the retinoblastoma gene product, RB, with cyclophilin A negatively affects cyclosporin-inhibited NFAT signaling. *J Cell Biochem* 2002;86(4):630-41.

140. Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res* 2000;87(9):789-96.

141. Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Embo J* 1992;11(10):3507-12.

142. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):5317-27.

143. Poland J, Sinha P, Siegert A, Schnolzer M, Korf U, Hauptmann S. Comparison of protein expression profiles between monolayer and spheroid cell culture of HT-29 cells revealed fragmentation of CK18 in three-dimensional cell culture. *Electrophoresis* 2002;23(7-8):1174-84.

144. Broers JL, Bronnenberg NM, Kuijpers HJ, Schutte B, Hutchison CJ, Ramaekers FC. Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *Eur J Cell Biol* 2002;81(12):677-91.

145. Said JW, Pinkus JL, Shintaku IP, deVos S, Matsumura F, Yamashiro S, et al. Alterations in fascin-expressing germinal center dendritic cells in neoplastic follicles of B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 1998;11(1):1-5.

146. Nguyen JT, Wells JA. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, 2003:7533-8.

147. Hochwald SN, Lind DS, Malaty J, Copeland EM, 3rd, Moldawer LL, MacKay SL. Antineoplastic therapy in colorectal cancer through proteasome inhibition. *Am Surg* 2003;69(1):15-23.
148. Thompson WE, Branch A, Whittaker JA, Lyn D, Zilberstein M, Mayo KE, et al. Characterization of prohibitin in a newly established rat ovarian granulosa cell line. *Endocrinology* 2001;142(9):4076-85.
149. Tsukahara F, Yoshioka T, Muraki T. Molecular and functional characterization of HSC54, a novel variant of human heat-shock cognate protein 70. *Mol Pharmacol* 2000;58(6):1257-63.
150. Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M, Packham G. BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway. *Cancer Res* 2003;63(14):4150-7.
151. Odgren PR, Toukatly G, Bangs PL, Gilmore R, Fey EG. Molecular characterization of mitofilin (HMP), a mitochondria-associated protein with predicted coiled coil and intermembrane space targeting domains. *J Cell Sci* 1996;109(Pt 9):2253-64.
152. Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 2002;158(5):915-27.
153. Ferrando-May E, Cordes V, Biller-Ckovic I, Mirkovic J, Gorlich D, Nicotera P. Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8(5):495-505.
154. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, et al. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* 1997;16(11):3044-56.
155. Oren A, Herschkovitz A, Ben-Dror I, Holdengreber V, Ben-Shaul Y, Seger R, et al. The cytoskeletal network controls c-Jun expression and glucocorticoid receptor transcriptional activity in an antagonistic and cell-type-specific manner. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1742-50.
156. Wiedemann P, Giehl K, Almo SC, Fedorov AA, Girvin M, Steinberger P, et al. Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1996;271(47):29915-21.
157. Ku NO, Soetikno RM, Omary MB. Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* 2003;37(5):1006-14.
158. Hernandez-Saavedra D, McCord JM. Paradoxical effects of thiol reagents on Jurkat cells and a new thiol-sensitive mutant form of human mitochondrial superoxide dismutase. *Cancer Res* 2003;63(1):159-63.
159. Sheweita SA, Tilmisany AK. Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2003;4(1):45-58.
160. Seok H, Cho J, Cheon M, Park IS. Biochemical characterization of apoptotic cleavage of KH-type splicing regulatory protein (KSRP)/far upstream element-binding protein 2 (FBP2). *Protein Pept Lett* 2002;9(6):511-9.
161. Bhatia K, Siraj AK, Hussain A, Bu R, Gutierrez MI. The tumor suppressor gene 14-3-3 sigma is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(2):165-9.
162. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 1993;84(4):407-12.
163. McKeon F. Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell-cycle-regulated dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3(1):82-6.

164. Gerace L, Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:335-74.
165. Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, et al. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9042-6.
166. Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996;135(6 Pt 1):1441-55.
167. Cross T, Griffiths G, Deacon E, Sallis R, Gough M, Watters D, et al. PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 2000;19(19):2331-7.
168. Badock V, Steinhilber U, Bommert K, Wittmann-Liebold B, Otto A. Apoptosis-induced cleavage of keratin 15 and keratin 17 in a human breast epithelial cell line. *Cell Death Differ* 2001;8(3):308-15.
169. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997;138(6):1379-94.
170. Kulesh DA, Cecena G, Darmon YM, Vasseur M, Oshima RG. Posttranslational regulation of keratins: degradation of mouse and human keratins 18 and 8. *Mol Cell Biol* 1989;9(4):1553-65.
171. He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE. The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 2002;277(13):10767-74.
172. Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 1997;272(52):33197-203.
173. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 17):2477-86.
174. Andra K, Nikolic B, Stocher M, Drenckhahn D, Wiche G. Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. *Genes Dev* 1998;12(21):3442-51.
175. Young GD, Winokur TS, Cerfolio RJ, Van Tine BA, Chow LT, Okoh V, et al. Differential expression and biodistribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes. *Lung Cancer* 2002;36(2):133-41.
176. Alvarez-Martinez MT, Porte F, Liautard JP, Sri Widada J. Effects of profilin-annexin I association on some properties of both profilin and annexin I: modification of the inhibitory activity of profilin on actin polymerization and inhibition of the self-association of annexin I and its interactions with liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1997;1339(2):331-40.
177. Lain S, Xirodimas D, Lane DP. Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function. *Exp Cell Res* 1999;253(2):315-24.
178. Marklund U, Larsson N, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *Embo J* 1996;15(19):5290-8.
179. Roos G, Brattsand G, Landberg G, Marklund U, Gullberg M. Expression of oncoprotein 18 in human leukemias and lymphomas. *Leukemia* 1993;7(10):1538-46.
180. Rescher U, Zobiack N, Gerke V. Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 22):3931-8.
181. Raynal P, Pollard HD. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197(1):63-93.

182. Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* 2001;133(2):217-28.
183. Wildrick DM, Priebe-Malven M, Boman BM. 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* 1992;12(5):1721-4.
184. Emoto K, Sawada H, Yamada Y, Fujimoto H, Takahama Y, Ueno M, et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21(2B):1339-45.
185. Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE. Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 17):3155-66.
186. Sohma H, Ohkawa H, Hashimoto E, Sakai R, Saito T. Ethanol-induced augmentation of annexin IV expression in rat C6 glioma and human A549 adenocarcinoma cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26(8 Suppl):44S-48S.
187. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002;82(2):331-71.
188. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* 1999;18(8):2040-8.
189. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *Embo J* 1999;18(8):2049-56.
190. Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestril R, Scheffler IE, Dillmann WH. Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation* 2001;103(13):1787-92.
191. Cole KK, Perez-Polo JR. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury. *J Neurochem* 2002;82(1):19-29.
192. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 1990;248(4957):850-4.
193. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000;275(33):25665-71.
194. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001;3(9):839-43.
195. Santarosa M, Favaro D, Quايا M, Galligioni E. Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients. *Eur J Cancer* 1997;33(6):873-7.
196. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355(6355):33-45.
197. Turner CP, Panter SS, Sharp FR. Anti-oxidants prevent focal rat brain injury as assessed by induction of heat shock proteins (HSP70, HO-1/HSP32, HSP47) following subarachnoid injections of lysed blood. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;65(1):87-102.
198. Bulliard C, Zurbriggen R, Tornare J, Faty M, Dastoor Z, Dreyer JL. Purification of a dichlorophenol-indophenol oxidoreductase from rat and bovine synaptic membranes: tight complex association of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform, TOAD64, enolase-gamma and aldolase C. *Biochem J* 1997;324(Pt 2):555-63.
199. Dastoor Z, Dreyer J. Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 16):2845-54.

200. Paulsson K, Wang P. Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2003;1641(1):1-12.
201. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 2002;514(2-3):122-8.
202. Ko HS, Uehara T, Nomura Y. Role of ubiquitin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem* 2002;277(38):35386-92.
203. Sancho P, Troyano A, Fernandez C, De Blas E, Aller P. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol Pharmacol* 2003;63(3):581-9.
204. Licato LL, Keku TO, Wurzelmann JI, Murray SC, Woosley JT, Sandler RS, et al. In vivo activation of mitogen-activated protein kinases in rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 1997;113(5):1589-98.
205. Gokmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP. Elevated protein kinase C beta1 is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61(4):1375-81.
206. Cesaro P, Raiteri E, Demoz M, Castino R, Baccino FM, Bonelli G, et al. Expression of protein kinase C beta1 confers resistance to TNFalpha- and paclitaxel-induced apoptosis in HT-29 colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2001;93(2):179-84.
207. Scott PA, Smith K, Poulson R, De Benedetti A, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA vs protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E. *Br J Cancer* 1998;77(12):2120-8.
208. Re FC, Manenti G, Borrello MG, Colombo MP, Fisher JH, Pierotti MA, et al. Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol Carcinog* 1992;5(2):155-60.
209. Huang YZ, Zang M, Xiong WC, Luo Z, Mei L. Erbin suppresses the MAP kinase pathway. *J Biol Chem* 2003;278(2):1108-14.
210. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277(41):38205-11.
211. Leong KG, Hu X, Li L, Nosedá M, Larrivee B, Hull C, et al. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2830-41.
212. Liu JJ, Nakajima K, Hirano T, Yang-Yen HF. Activation of Stat3 by v-Src is through a Ras-independent pathway. *J Biomed Sci* 1998;5(6):446-50.
213. Yannai S, Day AJ, Williamson G, Rhodes MJ. Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers of quinone reductase in murine hepatoma cell lines. *Food Chem Toxicol* 1998;36(8):623-30.
214. Talalay P. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 1989;28:237-50.
215. Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O, Malagarie-Cazenave S, Frisach MF, Mirault ME, et al. Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(45):42867-74.
216. Youan BB, Hussain A, Nguyen NT. Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS PharmSci* 2003;5(2):E22.

217. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793-800.
218. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997;278(5345):1966-8.

## Lebenslauf

**Name:** Herzog  
**Vorname:** Angelika  
**Geburtstag:** 31. Dezember 1973  
**Geburtsort:** Ludwigshafen am Rhein

### Schulbildung

1980-1984 Wilhelm-Leuschner Grundschule, Ludwigshafen am Rhein  
1985-1993 Max-Planck Gymnasium, Ludwigshafen am Rhein  
1993 Abitur

### Studium

1993-1995 Universität Kaiserslautern  
Diplom-Chemie  
1995-1999 Universität Kaiserslautern  
Lebensmittelchemie  
09/1998 Erstes Staatsexamen in Lebensmittelchemie  
1998-1999 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg  
Diplomarbeit  
04/1999 Diplom in Lebensmittelchemie  
1999-2003 Technische Universität München  
Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie  
Doktorarbeit  
Seit 10/03 DSM nutritional products, Basel  
Post-doc

**Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

**Publikationen:**

**Angelika Herzog, Sabine Kuntz, Hannelore Daniel and Uwe Wenzel**

„Identification of biomarkers for the initiation of apoptosis in human preneoplastic colonocytes by proteome analysis“  
International Journal of Cancer 109, 220-229 (2004)

**Angelika Herzog, Birgit Kindermann, Frank Döring, Hannelore Daniel, Uwe Wenzel**

„Pleiotropic molecular effects of the pro-apoptotic dietary constituent flavone in human colon cancer cells identified by protein and mRNA expression profiling“  
Proteomics (in Press)

**Uwe Wenzel, Angelika Herzog, Sabine Kuntz, Hannelore Daniel**

„Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells“  
Proteomics (in Press)

**Posterbeiträge:**

**A.Herzog, U.Wenzel and H.Daniel (2002)**

„Proteome analysis of transformed and non-transformed human colonic cells in response to flavone and quercetin treatment“  
The first international Nutrigenomics Conference Noordwijk, Netherlands

**A.Herzog, U.Wenzel and H.Daniel (2001)**

„Wirkung des Flavonoids Flavon auf das Proteom humaner Kolonkarzinomzellen (HT-29) mittels 2 D-Gelelektrophorese“  
38. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Giessen

**A. Herzog, S. Kuntz, U. Wenzel and H. Daniel (2000)**

„Nitric oxide prevents apoptosis induced by dietary flavone in human colon cancer cells by preventing down-regulation of bcl-X<sub>L</sub> and NF-κB“  
Symposium Nutritional Oncology, Frankfurt

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit

### **Wirkung zweier Flavonoide – Flavon und Quercetin – auf das Proteom humaner transformierter und nicht-transformierter Kolonozyten**

Selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Kaiseraugst,

Angelika Herzog