

Aus dem Zentrum für
Innere Medizin
Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. Th. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Untersuchungen zu den Wirkungen von Flavon auf
humane Kolonkarzinomzellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps – Universität Marburg
vorgelegt von

Lisa M. Erhart
aus Frankfurt a.M.
Marburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am : 25. Juli 2013

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund
Referent: Prof. Dr. R. Göke
1. Korreferent: Prof. Dr. K.-H. Pflüger

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Flavone.....	1
1.2 Das kolorektale Karzinom	2
1.2.1 Epidemiologie.....	2
1.2.2 Ätiologie.....	3
1.2.3 Risikofaktoren und Prävention.....	3
1.3 Apoptose.....	5
1.4 Zellzyklus.....	8
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Zelllinien.....	11
2.1.2 Zellkulturmaterialien.....	11
2.1.3 Chemikalien.....	11
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	13
2.1.5 Geräte.....	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Zellkultur.....	16
2.2.2 MTT-Assay.....	17
2.2.3 FACS Analyse Zellzyklus.....	17
2.2.4 FACS Analyse Apoptose.....	18
2.2.5 Proteinanalytische Methoden.....	19
3 Ergebnisse.....	24
3.1 Nachweis des zytotoxischen Effekts von Flavon mittels MTT- Assay.....	24
3.2 Untersuchung des Zelltods mittels Propidium Iodid Färbung und FACScan.....	26
3.2.1 Flavon induziert Zelltod.....	26
3.2.2 Hemmung der Apoptose durch z-VAD-fmk.....	27
3.3 Nachweis eines Zellzyklusarrestes mittels FACS-Analyse.....	28
3.3.1 Flavone arretiert Zellen in der G2/M Phase.....	28
3.4 Western Blot.....	29
3.4.1 Caspase 3-Spaltung.....	29

3.4.2 Caspase 9-Spaltung.....	30
3.4.3 Caspase 8-Spaltung.....	31
3.4.4 Caspase 2-Spaltung.....	32
3.4.5 Caspase 10-Spaltung.....	33
3.4.6 Regulation der Bcl2-Expression.....	35
3.4.7 Regulation der Expression von Apoptosis inducing factor (AIF).....	36
4 Diskussion.....	37
4.1 Zusammenhang zwischen Lifestyle-Modification und Entstehung kolorektaler Karzinome.....	37
4.2 Flavon induziert Apoptose in Kolonkarzinom-Zellen.....	39
4.3 Flavon induziert einen Zellzyklusarrest in Kolonkarzinomzellen.....	45
4.4 Ausblick in die Forschungsergebnisse nach 2005.....	46
5 Zusammenfassung.....	49
6 Abkürzungsverzeichnis.....	51
7 Literaturverzeichnis.....	53
8 Anhang.....	58
8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	58
8.2 Danksagung.....	59
8.3 Ehrenwörtliche Erklärung.....	60

1 Einleitung

1.1 Flavone

Flavone sind die Aglykone der Flavonoide, im Allgemeinen gelbe Pflanzenfarbstoffe. Diese stellen eine Vielzahl polyphenolischer Substanzen dar, die ubiquitär in Pflanzen vorkommen. Es wurden bereits über 4000 verschiedene Formen identifiziert. Gemäß ihrer chemischen Struktur werden sie weiter unterteilt in Anthocyanine, Flavane, Flavanone, Flavone, Flavonole und Isoflavonoide. Studien haben gezeigt, dass Flavonoide das Auftreten von koronarer Herzkrankheit und Schlaganfall sowie bestimmter Krebserkrankungen senken. Diese gesundheitsfördernden Aspekte beruhen auf variablen biochemischen Mechanismen. Flavonoide haben antioxidative Eigenschaften, sie befreien von aktivierten Karzinogenen und Mutagenen, beeinflussen Proteine, die den Zellzyklus regulieren und verändern die Expression von Genen. Außerdem erhöhen sie die Aufnahme fettlöslicher Antioxidantien, gleichermaßen wie die von Vitamin E und Betacarotin. [3; 10; 22; 34; 52]

Flavonoide können zwar von Menschen und Tieren nicht synthetisiert, jedoch metabolisiert werden. In früheren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass Flavonoide in merkbaren Mengen vom menschlichen Körper resorbiert werden und im Darmlumen stabil bleiben. Insbesondere haben sie die Eigenschaft in intestinalen Zellen zu akkumulieren, so dass ein Effekt auf die Entstehung von karzinomatös entarteten Zellen möglich ist. [7; 18; 20; 24; 55]

Die biologische Aktivität der Flavonoide ist abhängig von der individuellen unterschiedlichen molekularen Struktur der einzelnen Substanz und lässt sich nicht beliebig übertragen. Im Rahmen dieser

Arbeit wurde speziell der Einfluss des Flavons 2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one auf humane Kolonkarzinomzellen der Linie HCT116 untersucht. Flavone lassen sich in Spinat, Karotten, Grapefruit, Zitronen und Orangen in Mengen bis zu 3,99 mg/ 100 g nachweisen.

[33]

1.2 Das kolorektale Karzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom gehört in der westlichen Welt und auch in Deutschland zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen. Mit einer Inzidenz von 16,3 % war es im Jahre 2004 bei Männern das am zweithäufigsten diagnostizierte Karzinom nach dem Prostatakarzinom. Die Inzidenz bei Frauen betrug 17,6 %, häufiger war nur das Mammakarzinom.

Für einen Menschen, der keine prädisponierenden Risikofaktoren aufweist, liegt die Wahrscheinlichkeit im Laufe seines Lebens an einem Kolonkarzinom zu erkranken bei ungefähr 6 %. Bestimmte Faktoren gehen mit einem erhöhten Risiko einher. Dazu zählen ein vorausgegangenes kolorektales Karzinom, weitere Erkrankungsfälle bei Verwandten ersten Grades, das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Die familiäre adenomatöse Polyposis Coli (FAP) wie auch die Colitis ulcerosa gelten als obligate Präkanzerose für das kolorektale Karzinom.

90 % der Karzinome werden nach dem 50. Lebensjahr diagnostiziert, es treten allerdings auch vereinzelt Fälle vor dem 40. Lebensjahr auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68 Jahren und für Frauen bei 73 Jahren. [23; 35]

1.2.2 Ätiologie

Über 90 % der malignen Tumore des Dickdarms sind epithelialen Ursprungs, wobei es sich fast ausschließlich um Adenokarzinome handelt. Obligate Vorstufen der Adenokarzinome sind, sowohl bei den sporadischen als auch bei den hereditären Karzinomen, Adenome in Dickdarmpolypen. Man vermutet die Entstehung des kolorektalen Karzinoms über die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz, die erstmalig 1978 von Hill postuliert wurde. [16]

Die Neoplasie entsteht phasenweise. Zunächst kommt es zur Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens (APC = Adenoma Polyposis Coli). Daraus resultiert eine veränderte Expression darauf codierter Gene und Proteine. In der zweiten Phase kommt es zu aktivierenden Mutationen in einem Onkogen (K-ras) und zu Veränderungen am Chromosom 18. Morphologisch finden sich Adenome mit niedrig- bis mittelgradigen Dysplasien. Schließlich beginnt die dritte Phase, der Übergang zum hochgradig dysplastischen Adenom bzw. Karzinom, durch Mutationen im Gen des Tumorsuppressors p53 auf Chromosom 17. Diese Veränderungen finden sich sowohl bei sporadischen als auch bei hereditären Kolonkarzinomen. Bei der FAP liegt durch eine Keimbahnmutation in einem Allel des APC-Gens bereits ein Defekt vor, so dass die Tumoren häufiger und schneller entstehen. Defekte in Reparaturgenen, die DNA-Replikationsschäden beheben sollen, bestehen hingegen bei den HNPCC. Daraus resultiert eine Fehlerakkumulation während der Zellteilung, die die Karzinogese erleichtert.

1.2.3 Risikofaktoren und Prävention

In der Entstehung kolorektaler Karzinome spielen insbesondere

Umwelteinflüsse und Lebensgewohnheiten eine entscheidende Rolle. Zahlreiche Studien, die den Zusammenhang zwischen der Entstehung kolorektaler Karzinome und Faktoren wie Ernährung, körperliche Aktivität und Konsum von Genussmitteln wie Alkohol und Nikotin untersuchten, haben dies bereits bewiesen. [19; 36; 40; 41; 44; 54]

Mehrfach ließ sich ein signifikant erhöhtes Risiko durch eine fleisch- und fettreiche Ernährung, insbesondere mit rotem Fleisch – wie z. B. Rind, Schwein, Lamm und Kalb – nachweisen. Dabei wurde zum einen die hohe Konzentration an tierischen Fetten als Auslöser diskutiert, zum anderen die Entstehung karzinogener Stoffe durch die Zubereitung mit hohen Temperaturen. [43] Man nahm weiterhin an, dass durch eine fett- und fleischreiche Ernährung vermehrt Gallensäuren sezerniert werden. Gallensäuren – insbesondere sekundäre – haben eine direkt karzinogene Wirkung auf die Darmmukosa. [36] Eine kalziumreiche Kost hingegen senkt das Risiko, vermutlich weil Gallen- und Fettsäuren gebunden werden und so die karzinogene Wirkung abgeschwächt wird. Auch Ballaststoffe können Gallensäuren binden und die Umwandlung von primären in sekundäre Gallensäuren verhindern, so wird die toxische Wirkung abgeschwächt. Weiterhin beschleunigen sie die Passagezeit des Speisebreis im Darmlumen und erhöhen die Stuhlfrequenz, somit wird die Kontaktzeit zwischen Karzinogenen und Darmmukosa reduziert. [35; 36]

Andere Untersuchungen zeigten ein geringeres Risiko durch eine Ernährung mit viel Fisch und Meeresfrüchten, durch Folsäure oder Multivitaminpräparate sowie bei regelmäßiger Einnahme von Acetylsalicylsäure oder anderen nichtsteroidalen Antiphlogistika. [43; 44] Übergewicht und Adipositas gingen mit einem erhöhten Risiko einher, welches durch gesteigerte körperliche Aktivität gesenkt werden konnte, auch wenn diese nicht zur Gewichtsreduktion führte. [35; 43]

Diskutiert wurde in diesem Zusammenhang die beschleunigte Stuhlpassage, die zu einer verkürzten Kontaktzeit zwischen Karzinogenen und Darmmukosa führt. [36] Wie auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen, insbesondere malignen Entartungen, förderte Rauchen die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. Studien zeigten eine Korrelation zwischen Tabakkonsum und einem erhöhten Erkrankungsrisiko. [41] Auch bei hohem Alkoholkonsum wurde ein erhöhtes Risiko nachgewiesen, insbesondere bei reduzierter Folsäureeinnahme. Dabei korrelierte das Risiko vor allem mit der Menge des aufgenommenen Alkohols und nicht mit der Art des alkoholischen Getränks. [36; 41; 43]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach einer Erklärungsmöglichkeit für die protektive Wirkung von Gemüse gesucht, bzw. die Wirkungen von Flavonen als einer der vielen potentiell verantwortlichen pflanzlichen Wirkstoffe untersucht. [36; 43]

1.3 Apoptose

Apoptose bezeichnet die physiologische Form des Zelltodes, auch programmierter Zelltod genannt. Dieser Prozess ist essentiell für die Differenzierung und Homöostase von Geweben und findet während des gesamten Lebens eines Organismus in unterschiedlichem Ausmaß statt. In der frühen Ontogenese ist Apoptose an der Ausbildung von Gewebs- und Organstrukturen beteiligt, später u.a. an der Kontrolle der Zellzahl und der Eliminierung nichtfunktioneller oder maligner Zellen. In dem Zusammenhang stellt selektive Apoptoseinduktion in malignen Zellen einen wichtigen Angriffspunkt für Chemotherapeutika dar. [13; 29]

Der Prozess der Apoptose ist genetisch fixiert und weist charakteristische morphologische Merkmale auf. Spezifische Aktivierungsmechanismen führen zum Ablauf eines relativ einheitlichen, genetisch determinierten Programms, welches mit dem Tod der Zelle endet und mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen beschrieben werden kann. Apoptotische Zellen zeigen eine typische Kondensation des Kernchromatins, die Kerne werden pyknotisch und fragmentieren. Die Zytoplasmamembran zieht sich zusammen, es entstehen Vesikel, sogenannte apoptotic bodies, die Kernfragmente, Organellen und andere zytoplasmatische Bestandteile enthalten. Diese Vesikel werden dann von spezifischen Zellen phagozytiert. Der gesamte Prozess ist energieabhängig und dauert 30 bis 60 Minuten. Mittlerweile sind verschiedene Mechanismen bekannt, über die Apoptose induziert wird. So gibt es zum einen Caspase-unabhängige Signaltransduktionswege, zum anderen einen Caspase-abhängigen, der sich wiederum in ein intrinsisches und extrinsisches System gliedern lässt. [13; 29]

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die im Rahmen des programmierten Zelltodes spezifische Hauptmediatoren apoptotischer Signale darstellen. Man kann sie in Apoptose-induzierende – dazu gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10 – und Apoptose-ausführende – dazu gehören die Caspasen 3, 6 und 7 – unterteilen. Sie bestehen aus drei Domänen – einer N-terminalen Pro-Domäne, einer großen Untereinheit und einer kleinen C-terminalen Untereinheit. Caspasen liegen in allen Zellen als inaktives Proenzym vor, ihre Aktivierung erfolgt zunächst durch Abspaltung der Pro-Domäne und anschließende Spaltung in die größere und kleinere Untereinheit. Je zwei große und zwei kleine Untereinheiten lagern sich zu einem Heterotetramer zusammen und bilden so die aktive Caspase. Caspasen prozessieren ihre Substrate spezifisch durch Spaltung

hinter einem Aspartatrest. Ihre Aktivität kann durch verschiedene reversible und irreversible Inhibitoren gehemmt werden. Die inaktive Procaspase sowie die aktivierte Caspase – in Form von Spaltprodukten – können im Western Blot nachgewiesen werden. [8; 13; 47]

Im Rahmen der caspase-abhängigen Apoptose lassen sich Zellen in zwei große Gruppen einteilen. [32; 38] In Typ I Zellen wird Apoptose unabhängig von den Mitochondrien über sogenannte death-receptors – wie z. B. Fas oder tumor necrosis factor receptor (TNF-R) – ausgelöst. Wenn diese durch spezifische Liganden aktiviert werden, binden sie an ihrer intrazellulären death-Domäne Adaptor-Proteine – beispielsweise FADD (Fas-associating protein with death domain) – und induzieren so die Bildung des death-inducing-signaling-Komplexes (DISC). Über Dimerisierung kommt es zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung der Caspase 8. Caspase 8 ihrerseits spaltet dann unmittelbar die Caspasen 3 und 7. Caspase 3 spaltet in aktivierter Form unter anderem Caspase 6, welche verantwortlich ist für die Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns. Diese Kaskade wird als extrinsischer Weg der Apoptose bezeichnet. [5; 17; 47; 50]

Der intrinsische Weg wird über die Mitochondrien induziert, welche bei zytotoxischem Stress ihre Membranpermeabilität erhöhen und Cytochrom C ins Zytoplasma ausschütten. Cytochrom C bildet zusammen mit apoptotic proteinase activating factor-1 (Apaf-1) und Pro-Caspase 9 ein Apoptosom, welches zur Spaltung und Aktivierung von Caspase 9 führt. Caspase 9 spaltet wiederum nachfolgende Caspasen, unter anderem auch Caspase 3. Extrinsischer und intrinsischer Weg weisen also eine gemeinsame Endstrecke auf, die durch Spaltung der Caspase 3 eingeleitet wird. [5; 12; 13; 29; 42]

In die Regulation der Apoptose sind weiterhin auch Proteine der *bcl₂*-Familie involviert, die insbesondere bei der Regulation des mitochondrialen Wegs eine wichtige Rolle spielen. Diese Proteine können sowohl anti- als auch proapoptotisch wirken. Entscheidend für die Reaktion der Zellen auf zytotoxische Stimuli ist das Verhältnis, in dem pro- und antiapoptotisch wirkende Proteine vorliegen. Wird die Apoptose jedoch durch Bindung von Liganden an *death receptors* induziert, können diese Proteine den Zelltod nicht verhindern. [1; 31]

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose die pathologische Form des Zelltodes. Diese tritt nach starker Zellschädigung durch mechanische oder chemische Noxen ein. Charakteristisch ist ein ungeordneter Abbau von makromolekularen Strukturen, die Zelle wird irreversibel geschädigt und lysiert innerhalb kurzer Zeit. Dabei kommt es zu einer Entzündungsreaktion im angrenzenden Gewebe.

1.4 Zellzyklus

Zellwachstum, Zellteilung, Differenzierung und letztlich Zelltod sind Prozesse, die eine Zelle während ihres Lebens durchläuft. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Ausbildung intakter Zellen und Zellverbände unterliegen die genannten Prozesse einer besonders strengen Regulation.

Der Zellzyklus kann in verschiedene Phasen gegliedert werden: die S-Phase, sowie die M-Phase, die jeweils von zwei G-Phasen getrennt werden. Die S-Phase ist die sogenannte Synthese-Phase. Während dieser Phase wird das Genom exakt und vollständig repliziert. Nach vollständig beendeter S-Phase folgt die M-Phase, in der die Mitose stattfindet. Die Zelle teilt sich in je zwei Tochterzellen mit identischer genetischer Information. In den G-Phasen (engl. *gap* – Lücke)

werden alle notwendigen Faktoren für die Zellteilung und den Stoffwechsel der Tochterzellen synthetisiert. Wenn das proliferative Potential einer Zelle im Laufe ihres Lebens abnimmt, geht sie letztendlich in einen ruhenden Zustand über, die sogenannte G₀-Phase. Das passiert ebenfalls, wenn die Zelle sich entdifferenziert.

In der Phase der Zellteilung ist es entscheidend, dass die genetische Informationen auf die nächste Generation übertragen wird. Es existieren konkrete Schutz- und Kontrollmechanismen, um eine vollständige und exakte Replikation des Genoms zu gewährleisten. Zellen, deren DNA fehlerhaft ist oder bei deren Chromosomenteilung Fehler aufgetreten sind, müssen entweder repariert oder – falls eine Reparatur nicht möglich ist – eliminiert werden.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Einflüsse von Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten auf die Entstehung vieler Krebserkrankungen sind heutzutage gut belegt. Insbesondere in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen wird der Einfluss der Ernährung diskutiert. In vielen Studien ist bereits gezeigt worden, dass eine gemüsereiche Ernährung mit einem geringeren Erkrankungsrisiko einhergeht. Da Flavone vor allem in Gemüse vorhanden sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss sie auf die Zellen kolorektaler Karzinome haben. Wenzel et al hatten bereits den Effekt von Flavonen auf humane Kolonkarzinomzellen der Linie HT 29 untersucht und gezeigt, dass die Expression von Genen beeinflusst wird, welche Apoptose, Zelldifferenzierung und Zellwachstum regulieren. Auf gesunde Darmzellen von Mäusen hatten Flavone keine Wirkung. [51]

In Vorversuchen zu dieser Arbeit war in MTT-Assays (MTT = methylthiazoletetrazolium) gesehen worden, dass auch humane Kolonkarzinomzellen der Linie HCT 116 absterben, wenn sie mit Flavon behandelt wurden. Die verantwortlichen Mechanismen blieben jedoch zunächst unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der antineoplastischen Wirkung der Flavone am Beispiel von 2-phenyl-4H-benzopyran-4-one (in dieser Arbeit im weiteren Flavon genannt) zu untersuchen.

Insbesondere interessierten die Effekte von Flavon auf die Apoptose, den Zellzyklus, sowie die während dieser Geschehnisse unter Flavoneinfluss exprimierten Proteine.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Humane Kolonkarzinomzellen der Linie HCT 116

2.1.2 Zellkulturmaterialien

McCoys 5A Medium	GIBCO Invitrogen
Fötale Kälberserum	
Gentamicin	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Trypsin EDTA	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

2.1.3 Chemikalien

Flavon	Sigma, Taufkirchen, Deutschland 30 mM gelöst in DMSO, gelagert bei -20°C
Trail	Biomol, Hamburg, Deutschland 1µg/1µl gelöst in McCoys5A Medium
z-VAD-fmk	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland gelöst in DMSO, gelagert bei -20°C

z-DQMD-fmk	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland gelöst in DMSO, gelagert bei -20°C
LEVD-cho	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland gelöst in DMSO, gelagert bei -20°C
Ac-YVAD-cmk	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland gelöst in DMSO, gelagert bei -20°C
MTT (methylthiazoletetrazolium)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland 5 mg/ml in PBS gelöst
DMSO	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DTT	
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Prestained Protein Marker	Fermentos
ECL detection reagents	Amersham Bioscience

Antikörper

Cell signaling, Beverly, MA, USA

- Caspase-2 Antikörper
- Caspase-3 Antikörper
- Caspase-8 Antikörper
- Caspase-9 Antikörper

- Caspase-10 Antikörper
- Anti-rabbit IgG-HRP
- Anti-mouse IgG-HRP

Santa Cruz, Charlottesville, VA, USA

- Caspase-6 Antikörper
- Caspase-7 Antikörper
- Bcl₂
- AIF
- Aktin-HRP
- Anti-goat IgG-HRP

2.1.4 Puffer und Lösungen

PBS

- 8.00 g/l NaCl
- 0,20 g/l KCl
- 1,15 g/l Na₂HPO₄*2H₂O
- 0,20 g/l KH₂PO₄
- pH 7,4

10*SDS-Laufpuffer

- 250 mM Tris Base
- 1,92 M Glycin
- 1 % SDS

Blotting-Puffer

- 100 ml Towbin [250 mM Tris Base, 1,92 M Glycin]
- 200 ml Methanol
- 700 ml Aqua dest

10* TBS-Puffer

- 24,2 g Tris Base
- 80 g NaCl
- 15 ml HCl (37 %ig)
- pH 7,6

TBS-T

- 100 ml 10*TBS Puffer
- 900 ml Aqua dest
- 1 ml Tween 20

Trenngelpuffer

- 1,5 M Tris Base
- 0,4 % SDS
- pH 8,8

Sammelgelpuffer

- 0,5 M Tris Base
- 0,4 % SDS
- pH 6,8

Zytosolextraktion-Puffer

- 40 µl HEPES-KOH pH 7,5 [0,5 M]
- 10 µl KCl [1 M]
- 2 µl EDTA [0,5 M]
- 939 µl H₂O
- 1 µl DTT [1 M]
- 10 µl Protease Arrest

2.1.5 Geräte

Heraeus Instrumente GmbH, Hanau,
Deutschland

Zentrifugen,
Brutschränke, Sterile
Arbeitsbank Lamin Air
HB2448

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	Gewebekulturflaschen, 24-Loch-Gewebekulturplatten
NUNC™, Dänemark	6-Loch-Gewebekulturplatten, 12-Loch-Gewebekulturplatten, 100mm-Gewebekulturschalen
Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA	FACScan flow cytometer

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellen der Linie HCT 116 wurden in McCoy's 5A-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 40 µg/ml Gentamicin im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt in den üblichen Gewebekulturflaschen kultiviert.

Alle sieben Tage wurden die Zelllinien passagiert. Dafür wurden die Zellen mit 2,5 ml Trypsin für ca. 2 min inkubiert, durch leichtes Klopfen resuspendiert und die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 2,5 ml Medium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min. bei 1500 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Für die Dauerkultur wurden die Zellen 1:10 verdünnt.

Für die Versuchsansätze wurden die Zellen auf Gewebekulturschalen ausgesät, für 48 h bis zu einer Dichte von 50 % kultiviert, nochmals ein Mediumwechsel durchgeführt und dann Flavon je nach Versuchsansatz für die entsprechenden Inkubationszeiten zugegeben.

2.2.2 MTT-Assay

Das Prinzip des MTT-Assays besteht darin, dass Methylthiazoletetrazolium (MTT) nur von lebenden Zellen aufgenommen wird und diese blau färbt. Durch photometrische Messung lässt sich dann die Intensität der Blaufärbung messen und der Prozentsatz der überlebenden Zellen ermitteln.

Für MTT-Assays wurden die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt und ca. 50.000 Zellen pro well in 12-Lochplatten ausgesät. Nach 48 h Kultivierung wurde Flavon in aufsteigenden Dosierungen (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M bzw. 300 μ M (Kontrollen erhielten entsprechende Zusätze an Lösungsmittel)) zugegeben und die Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle (8 h, 16 h, 24 h, 32 h bzw. 48 h) weiter inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μ l MTT hinzugefügt und nochmals 2 h inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 μ l DMSO für 15 min auf einem Plattenschüttler bei 200 rpm lysiert. Anschließend wurde die Intensität der Blaufärbung bei 550 nm gemessen. Der Prozentsatz der Proliferationshemmung wurde berechnet aus dem Verhältnis der Extinktion der behandelten Zellen zur Extinktion der Kontrollzellen multipliziert mit 100. Für die Auswertung wurden außerdem Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

2.2.3 FACS Analyse Zellzyklus

Für die Zellzyklus Analyse wurden die Zellen in 12-Lochplatten ausgesät (50.000 Zellen pro well) und für 48 h kultiviert, darauf erfolgte die Zugabe von 200 μ M Flavon und eine Inkubation für weitere 48 h.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 200 μ l Trypsin abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt, die Trypsinwirkung durch Zugabe von 200 μ l PBS abgestoppt. Dann wurden die Zellen für 3 min bei 1500 G zentrifugiert und das Pellet in 50 μ l PBS resuspendiert. Die Zelllösung wurde anschließend tropfenweise in 1 ml eiskaltes 70 %iges Ethanol gegeben und mindestens 24 h bei 4 °C inkubiert, um die Zellen zu fixieren.

Für die DNA-Färbung wurden die Zellen für 5 min bei 3500 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS, welches 1 μ g/ml DNase freie RNase, 50 μ g/ml Propidium Iodid und 0,1 % Glukose enthielt, resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 4 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und der DNA-Gehalt per Durchflusszytometrie mit dem FACScan flow cytometer bestimmt. Die Datenauswertung und Erstellung der Histogramme erfolgte mit Hilfe der Cell Quest software (Becton-Dickinson) und der ModFit 2.0 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

2.2.4 FACS Analyse Apoptose

Die Zellen wurden wie für die Zellzyklusanalyse ausgesät und mit 100 μ M oder 200 μ M Flavon für jeweils 24 h bzw. 48 h inkubiert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen ebenfalls mit 100 μ M oder 200 μ M Flavon inkubiert, wobei zusätzlich noch 50 μ M z-VAD-FMK – ein Breitspektrum-Caspase-Inhibitor – zugegeben wurde, um zu überprüfen, ob durch Inhibition der Caspasen die Apoptose ebenfalls gehemmt werden kann.

Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen abtrypsiniert und mit dem Medium in FACS-Röhrchen überführt, um auch bereits abgestorbene und somit nicht mehr adhärente Zellen mitzuerfassen.

Trypsin und Medium wurden abzentrifugiert und das Zellpellet in PBS aufgenommen. Kurz vor der Messung wurde 2 µg/ml Propidium Iodid (PI) zugegeben. Nach Durchflusszytometrie mit dem FACScan flow cytometer wurde eine Datenanalyse mit Hilfe der Cell Quest software (Becton-Dickinson) durchgeführt.

2.2.5 Proteinanalytische Methoden

Präparation und Quantifizierung von Gesamtproteinextrakten

Für die Gesamtproteinextrakte wurden Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und mit 100 µM bzw. 200 µM Flavon für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Außerdem wurde stets eine Kontrolle ohne Zusatz von Substanzen mitgeführt. Bei den Versuchen mit Caspase-Inhibitoren wurden zuerst diese allein auf die Zellen gegeben und für 60 min inkubiert, erst dann erfolgte die Zugabe von Flavon in den entsprechenden Konzentrationen.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellscraper abgekratzt und in 1 ml PBS in Eppendorfcups überführt. Nachdem die Zellen für 3 min bei 1500 G zentrifugiert und der Überstand verworfen worden war, wurden sie in PBS mit 1 % Protease Arrest und 0,5 µl EDTA/ml aufgenommen. Die Proben wurden anschließend auf Eis sonifiziert.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe eines Protein Assays von Biorad bestimmt. Dazu wurden je 5 µl der Proben mit 250 µl der Biorad-Lösung gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensität der Blaufärbung wurde dann bei 570 nm gegen einen Blindwert (Reagenz ohne Protein) gemessen. Mit Hilfe einer Eichgraden (1 bis 8 µg BSA) konnte die in der Probe enthaltene

Proteinmenge bestimmt werden.

Proben, die nicht unmittelbar für den Western Blot verwendet wurden, wurden dann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und aufbewahrt.

Präparation von zytosolischen Extrakten

Für die zytosolischen Extrakte wurden die Zellen auf 100 mm-Schalen ausgesät, bis zu einer Dichte von 50 % kultiviert und dann mit 100 μM oder 200 μM Flavon bzw. ohne Zugabe weiterer Substanzen für 48 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellscraper abgekratzt, in 3 ml PBS resuspendiert und in Röhrchen überführt, anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 μl des Zytosolextraktion-Puffers resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt, um die Zellen zu lysieren. Der Zellaufschluss wurde dreimal durch eine 20 G Kanüle gezogen und anschließend für 10 min bei 1000 G und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. So erhielt man ein Zellpellet, in dem sich lediglich noch die Zellkerne befinden. Der Überstand wurde nochmals für 30 min bei 100000 G und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der darauffolgende Überstand für Western Blots verwendet. Das Pellet enthielt mitochondriale Proteine, die ebenfalls mit Western Blots analysiert wurden. Der Proteingehalt der Proben wurde wiederum mittels des Protein-Assays von Biorad bestimmt und die Proben, die nicht unmittelbar für den Western Blot verwendet wurden, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese besteht darin, dass Proteine

entsprechend ihrer molekularen Größe, aber unabhängig von ihrer Eigenladung aufgetrennt werden. Dabei überschichtete ein großporiges Sammelgel ein kleinporiges 12 – 15 %iges Trenngel. Die Wahl des Trenngels richtete sich nach der Größe der zu analysierenden Proteine. Je kleiner die Proteine desto höherprozentiger sollte das Trenngel gewählt werden.

Die Lösungen für das Sammel- bzw. Trenngel wurden entsprechend der Tabelle 2.1 gemischt, wobei die Polymerisation des Acrylamid durch Zugabe von APS und TEMED katalysiert wurde (die Angaben beziehen sich auf die Herstellung zweier Gele). Zuerst wurde die Trenngellösung zwischen zwei Glasplatten, welche zuvor mit Ethanol gereinigt und in eine Gelgießapparatur eingespannt worden waren, bis ca. 2 cm unter den Rand gegossen. Darüber wurde vorsichtig die Sammelgellösung pipettiert, so dass sich die beiden Lösungen nicht mischten oder Luftblasen entstanden. Noch bevor das Sammelgel polymerisierte, wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen zur Aufnahme der Proben zu schaffen. Nach ca. 45 min war das Gel vollständig polymerisiert. Anschließend wurde der Kamm entfernt, das Gel in den Glasplatten in die Elektrophoresekammer gestellt und mit SDS-Laufpuffer bedeckt.

In die Taschen wurden jeweils ca. 15 µg Protein der zu analysierenden Proben geladen. Diese mussten vorher noch 1:1 mit SDS-Laufpuffer und 10 % DTT gemischt und dann für 5 min bei 95 °C erhitzt werden. Hierbei wurden die Proteine denaturiert und ihre Eigenladung überdeckt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein Prestained Protein Marker verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer Spannung von 150 V durchgeführt.

Stammlösung	Sammelgel [ml]	Trenngel 12% [ml]	Trenngel 15% [ml]
Sammelgelpuffer	1,000	-	-
Trenngelpuffer	-	2,500	2,500
Glycerol	-	0,500	0,500
Acrylamid (30/0,8)	0,640	4,000	5,000
Aqua dest.	2,360	3,000	2,000
APS (10%)	0,010	0,012	0,012
TEMED	0,005	0,006	0,010

Tabelle 2.1 Volumenangaben für zwei Polyacrylamidgele

Blotting und Blocking

Beim Western Blot wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und dort mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Zum Proteintransfer wurde das Gel auf einen Schwamm und ein Whatmanpapier gelegt. Auf das Gel wurde eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 μm) gelegt und diese wiederum mit einem Whatmanpapier und einem Schwamm bedeckt. Der Aufbau erfolgt von der Anode zur Kathode der Blottingkammer. Dabei sollten keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bleiben, da ansonsten an diesen Stellen kein effizienter Transfer auf die Membran stattfindet.

Die Blottingkammer wurde komplett mit Blottingpuffer gefüllt und dann für 45 min bei 300 mA geblottet, wobei auf ausreichende Kühlung zu achten war.

Danach wurde die Membran mit TBS-T und 5 % Magermilchpulver für 1 h bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzublocken. Vor dem Blocking konnte man die Membran gegebenenfalls noch mit Ponceau S färben, um abzuschätzen, ob in allen Taschen annähernd gleich viel Protein geladen wurde.

Anschließend wurde der Erstantikörper (proteinspezifischer Antikörper) in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung hinzupipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Membran viermal für 10 min mit TBS-T gewaschen und schließlich mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Blot erneut in vier Waschschritten für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen.

Die Membran wurde in einer 1:1 Mischung der Lösung 1 und 2 des ECL detection reagents für 1 min inkubiert, kurz getrocknet, mit einer Schicht Klarsichtfolie umwickelt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Das am Zweitantikörper fixierte Enzym erzeugte durch Substrat-Umsatz Chemilumineszenz, die zur Schwärzung des Röntgenfilms führte.

Zum Teil wurden die Membranen anschließend noch über Nacht bei 4 °C mit einem an HRP-gekoppelten Aktin-Antikörper (Verdünnung 1:5000) in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Aktin ist ein in allen Zellen vorkommendes Protein, welches man ebenso wie die Ponceau S Färbung einsetzen konnte, um zu beweisen, dass gleich viel Gesamtprotein aufgetragen wurde und die gezeigte Proteinregulation nicht auf Artefakten durch Fehlauftrag beruhte.

Da bei der Analyse der mitochondrialen Proteine in den zytosolischen Extrakten die Aktinexpression nicht verwendet werden konnte, um einen gleichmäßigen Proteinauftrag zu dokumentieren, wurde in diesen Fällen eine Ponceau S Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran noch vor dem Blocking für ungefähr 1 min. in Ponceau S Lösung gelegt, in welcher sich die Proteine rot anfärbten. Je mehr Protein auf der Membran war, desto intensiver färbte diese sich an. Da die Färbung reversibel war und sich wieder vollständig auswusch, wurden die Membranen an dieser Stelle eingescannt und somit die Färbung dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des zytotoxischen Effekts von Flavon mittels MTT-Assay

Um zu untersuchen, ob und wie effektiv Flavon das Zellwachstum von Tumorzellen hemmte, wurden Kolonkarzinomzellen der Linie HCT 116 ohne und mit verschiedenen Konzentrationen an Flavon inkubiert. Die Rate der überlebenden Zellen wurde mittels eines MTT-Assays ermittelt. Parallel wurde eine Kontrolle ohne Zugabe weiterer Substanzen angesetzt, um zu berücksichtigen, wie viele Zellen spontan abstarben, sowie eine Kontrolle mit Lösungsmittel (1% DMSO) inkubiert, um auszuschließen, dass die Zellen durch die Wirkung von DMSO abstarben.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen lediglich mit 100 μM oder 200 μM Flavon versetzt und das Überleben der Zellen nach jeweils 8 h, 16 h, 24 h, 32 h und 48 h mittels MTT-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass Flavon auf Kolonkarzinomzellen sowohl konzentrationsabhängig als auch zeitabhängig zytotoxisch wirkt, wie in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Durch einen MTT-Assay war nicht zu differenzieren, ob Zellen durch Apoptose oder Nekrose starben. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass Flavon hemmend auf die Zellproliferation wirkt und dadurch die Zellpopulation abnimmt. Zur Klärung dieser Frage galt es, weitere Experimente durchzuführen.

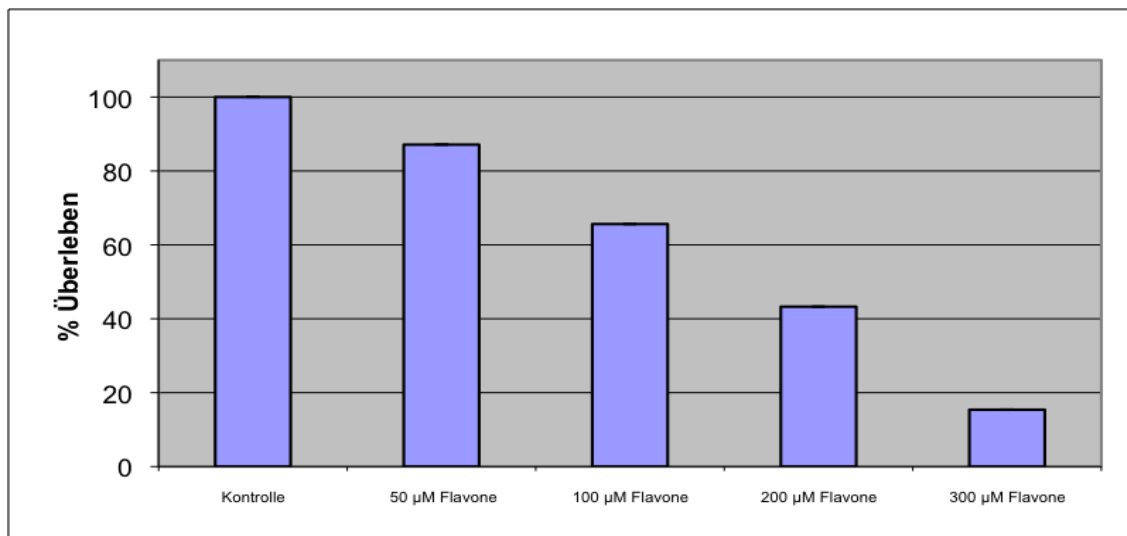


Abbildung 3.1 **Konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung von Flavon**
 HCT 116 Zellen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Flavon inkubiert, und die Rate der überlebenden Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Der Versuchsansatz ohne Flavon ist gleich 100%.

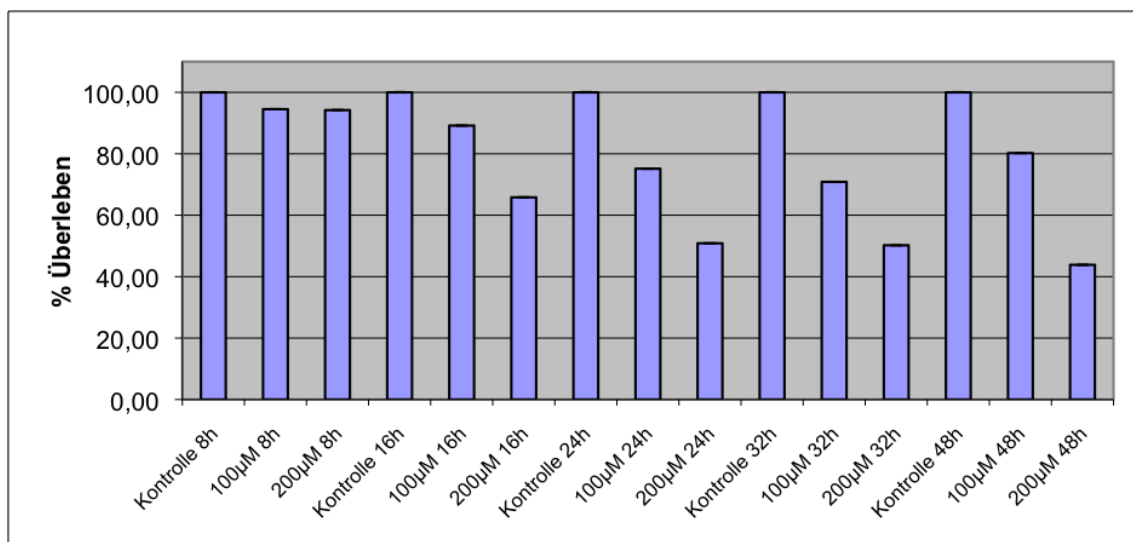


Abbildung 3.2 **Zeitabhängige zytotoxische Wirkung von Flavon**
 HCT 116 Zellen wurden mit 100 µM oder 200 µM Flavon inkubiert und die Rate der überlebenden Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten mittels MTT-Assay bestimmt. Die Kontrollen ohne Zugabe von Flavon sind gleich 100%.

3.2 Untersuchung des Zelltods mittels Propidium Iodid Färbung und FACScan

3.2.1 Flavon induziert Zelltod

Wenn Zellen im Rahmen von Apoptose oder Nekrose ihre Membranintegrität verlieren, kann Propidiumiodid einströmen und sich an die DNA binden. Da im MTT-Assay nur überlebende Zellen nachgewiesen wurden, ließ sich die Zahl der abgestorbenen Zellen mittels Propidiumjodidfärbung besser quantifizieren. Man konnte jedoch weiterhin nicht differenzieren, ob die Zellen nekrotisch oder apoptotisch geworden waren. Die HCT 116 Zellen wurden wiederum für 24 h bzw. 48 h mit 100 μM bzw. 200 μM Flavon inkubiert. Parallel wurde eine Kontrolle ohne Flavon mitgeführt, um den Anteil spontan sterbender Zellen zu bestimmen. Dann wurden die Zellen entsprechend der Anleitung mit Propidium Iodid gefärbt, und eine FACScan-Analyse durchgeführt. Hierbei bestätigte sich, dass Flavone sowohl zeitabhängig als auch konzentrationsabhängig Zelltod in Kolonkarzinomzellen induziert.

Nach 24 h waren bei 100 μM Flavon 9,3 % der Zellen gestorben mit 200 μM Flavon bereits 21 %. Nach 48 h zeigten sich bei 100 μM Flavon 17,8 %, bei 200 μM Flavon 38,5 % tote Zellen (Abbildung 3.3)

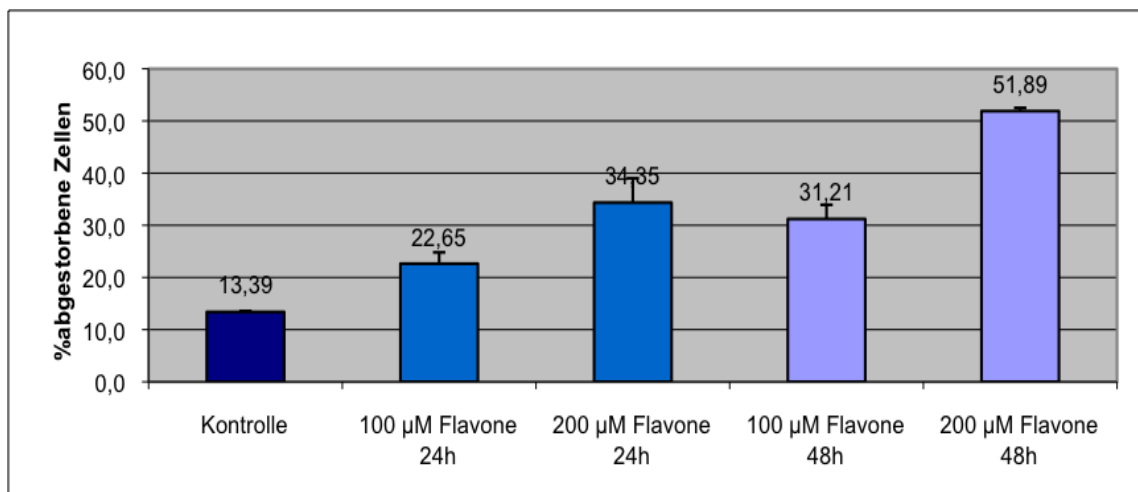


Abbildung 3.3 Flavon induziert in HCT 116 Zellen konzentrations- und zeitabhängig Zelltod

HCT 116 Zellen wurden für 24h bzw. 48h mit 100 µM oder 200 µM Flavon inkubiert und danach der Anteil propidiumiodidpositiver Zellen mittels FACScan Analysen ermittelt.

3.2.2 Hemmung der Apoptose durch z-VAD-fmk

Um zu untersuchen, ob Flavon eine caspase-abhängige Apoptose induzierte, wurden Zellen mit 50 µM z-VAD-fmk, einem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor, welcher die Caspasen 1, 3, 4 und 7 reversibel hemmt, für 60 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µM bzw. 200 µM Flavon dazugegeben, und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Der Anteil abgestorbener Zellen wurde wiederum mit einer FACScan-Analyse ermittelt. Es zeigte sich, dass die Apoptose deutlich gehemmt werden konnte, bei 200 µM Flavon sank der Anteil von 67,2 % abgestorbener Zellen auf 48,5 % (Abbildung 3.4).

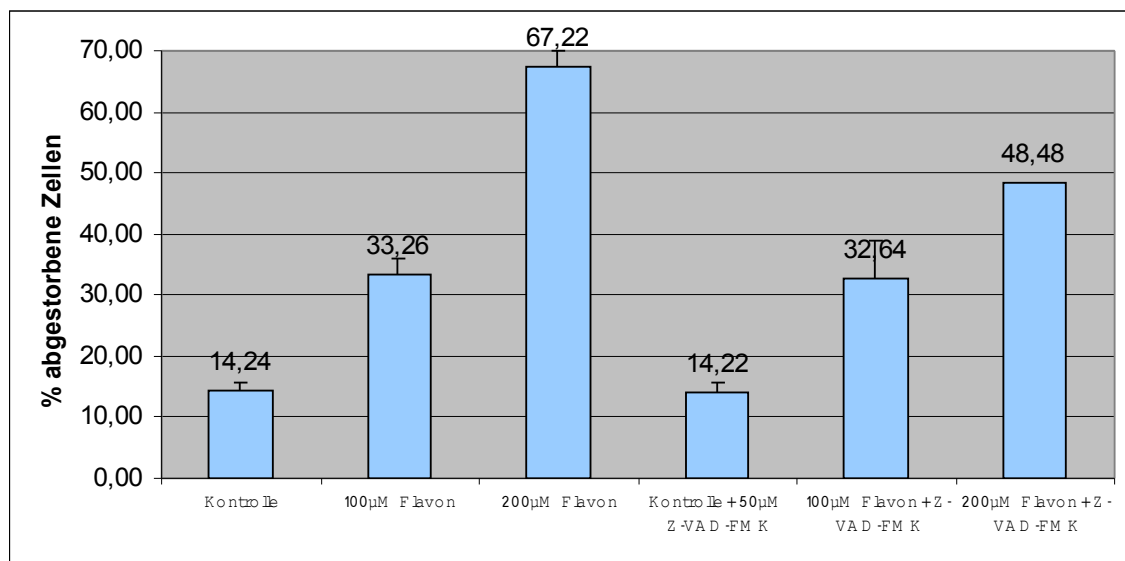


Abbildung 3.4 **Inhibition der apoptotischen Wirkung von Flavon durch z-VAD-fmk.**

HCT 116 Zellen wurden für 60 min. mit 50 µM z-VAD-fmk inkubiert und dann für weitere 48 h 100 µM, bzw. 200 µM Flavon dazugegeben.

Die inhibitorische Wirkung von z-VAD-fmk auf den Flavon-induzierten Zelltod verdeutlichte, dass Flavon die Apoptose Caspasen-abhängig initiierte.

Zur weiteren Analyse der involvierten Caspasen wurde der Effekt von Flavon auf die Caspase 3 Spaltung untersucht.

3.3 Nachweis eines Zellzyklusarrestes mittels FACS-Analyse

3.3.1 Flavone arretiert Zellen in der G₂/M Phase

Zur Untersuchung der Flavonwirkung auf den Zellzyklus wurden Kolonkarzinomzellen für 48 h mit 200 µM Flavon inkubiert und eine Zellzyklusanalyse wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Flavon die Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus arretierte (Abbildung 3.5).

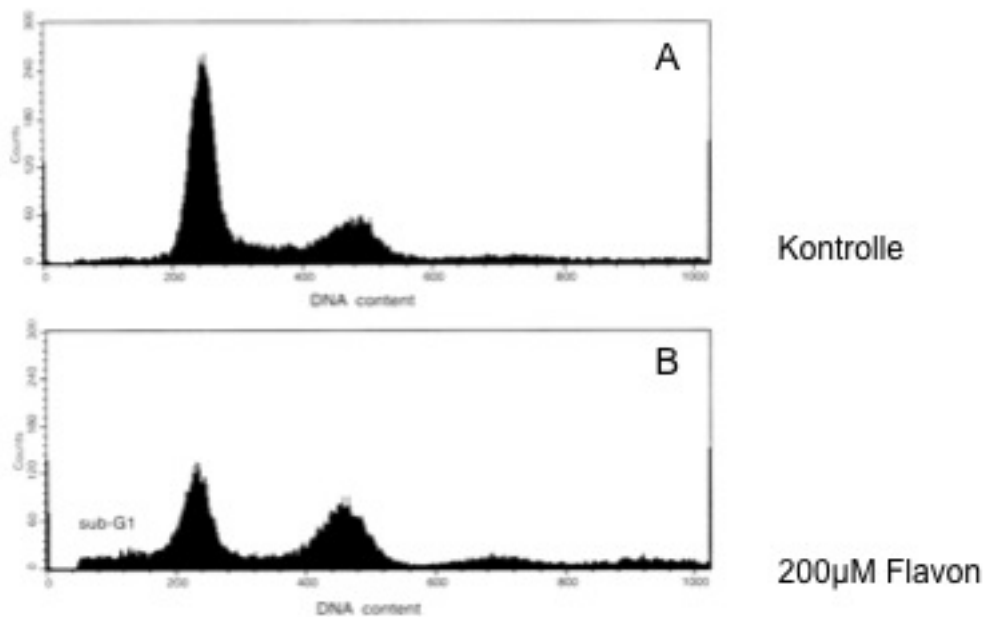


Abbildung 3.5 **Flavon induziert einen Arrest in der G2/M Phase**
 HCT 116 Zellen wurden für 48 h mit 200 µM Flavon inkubiert und dann eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

3.4 Western Blot

3.4.1 Caspase 3-Spaltung

Die inhibitorische Wirkung von z-VAD-fmk auf den Flavon-induzierten Zelltod hat verdeutlicht, dass Flavon die Apoptose Caspasen-abhängig initiierte. Zur weiteren Analyse der involvierten Caspasen wurde der Effekt von Flavon auf die Caspase 3-Spaltung untersucht.^[51] Hierbei konnte sowohl eine Abnahme der vollständigen Caspase 3, als auch eine Zunahme der Spaltprodukte dargestellt werden, die bei 200 µM Flavon deutlich ausgeprägter war als bei 100 µM Flavon (Abbildung 3.6).

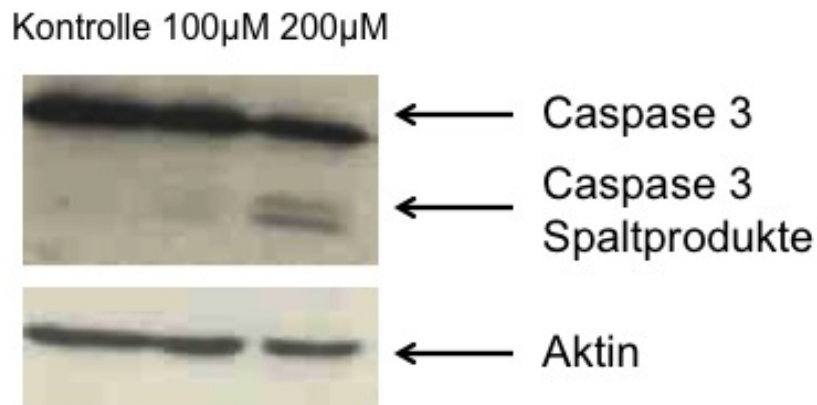


Abbildung 3.6 Western Blot Analyse der Wirkung von Flavon auf Caspase 3
HCT 116 Zellen wurden für 48 h mit 100 µM oder 200 µM Flavon inkubiert. Im Western Blot zeigte sich eine Abnahme der Caspase 3 (35 kDa) und eine Zunahme ihrer Spaltprodukte (17 kDa, 19 kDa). Für die Analyse wurden Gesamtproteinextrakte verwendet, als Kontrolle wurde die Expression von Aktin dargestellt.

Da Caspase 3 als gemeinsames Endglied der Caspasen-Kaskade sowohl bei Aktivierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Weges gespalten wird, wurden weitere Caspasen auf Spaltung untersucht, um zu differenzieren, welche Kaskade durch Flavon induziert wurde.

3.4.2 Caspase 9-Spaltung

Caspase 9 wird gespalten, wenn Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen Weg induziert wird. Der Caspase 9-Antikörper erkannte sowohl Caspase 9 in ihrer gesamten Länge als auch ihre Spaltprodukte. Es konnte eine Abnahme der Caspase 9 sowie eine Zunahme ihrer Spaltprodukte gezeigt werden (Abbildung 3.7).

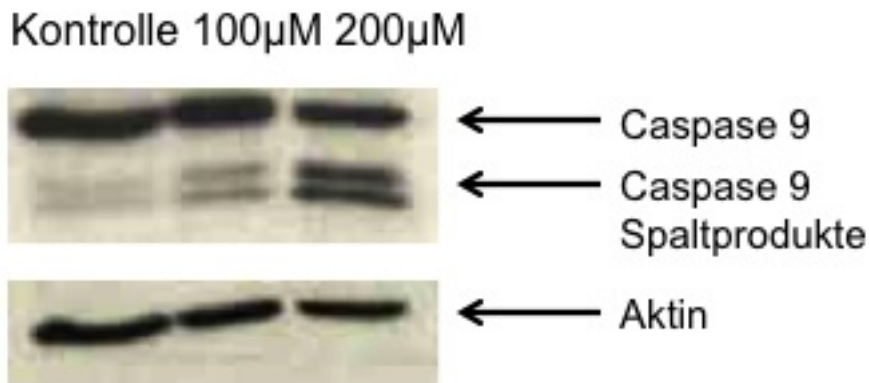


Abbildung 3.7 **Western Blot Analyse der Wirkung von Flavon auf Caspase 9**
HCT 116 Zellen wurden für 48 h mit 100 μ M oder 200 μ M Flavon inkubiert. Im Western Blot zeigte sich eine Abnahme der Caspase 9 und eine Zunahme ihrer Spaltprodukte. Für die Analyse wurden Gesamtproteinextrakte verwendet.

3.4.3 Caspase 8-Spaltung

Caspase 8 wird in Zellen zum einen mitochondrienunabhängig direkt über den DISC-Komplex gespalten und so über den extrinsischen Weg der Caspase-Kaskade aktiviert. Dies wird über den Fas-death-Rezeptor vermittelt. Solche Zellen werden als Typ I Zellen definiert.^[5; 17; 47; 50]

Durch eine Quervernetzung des intrinsischen und extrinsischen Wegs ist es aber auch möglich, dass Caspase 8 von Caspase 3 gespalten wird, wenn diese über den intrinsischen mitochondrienabhängigen Weg aktiviert wurde, wie es in Typ II Zellen geschieht. Da es sich bei HCT 116 Zellen um Typ II Zellen handelt, ist davon auszugehen, dass Caspase 8 nicht über den Fas-Death-Rezeptor aktiviert wurde und Flavone über den intrinsischen Weg die Apoptose induzierte.^[28; 32; 38; 42]

Der verwendete Antikörper erkannte Caspase 8 in ihrer vollständigen Länge sowie ihre Spaltprodukte. In Abbildung 3.8 sieht man die Abnahme der intakten Caspase 8 sowie eine Zunahme ihrer Spaltprodukte.

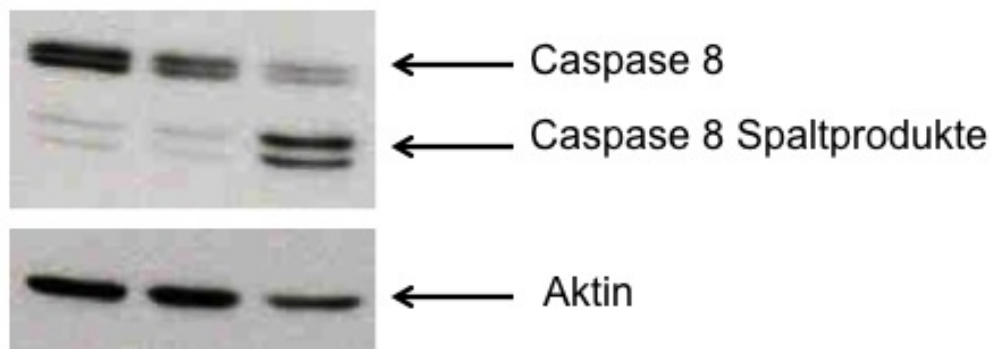
Kontrolle 100 μ M 200 μ M

Abbildung 3.8 **Western Blot Analyse der Wirkung von Flavon auf Caspase 8**
 HCT 116 Zellen wurden für 48 h mit 100 μ M oder 200 μ M Flavon inkubiert. Im Western Blot zeigt sich eine Abnahme der Caspase 8 und eine Zunahme ihrer Spaltprodukte. Für die Analyse wurden Gesamtproteinextrakte verwendet.

3.4.4 Caspase 2-Spaltung

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob durch Flavon auch Caspase 2 aktiviert wurde. Dabei ließ sich zeigen, dass durch die Behandlung mit Flavon in den Zellen auch Caspase 2 gespalten wurde (Abbildung 3.9).

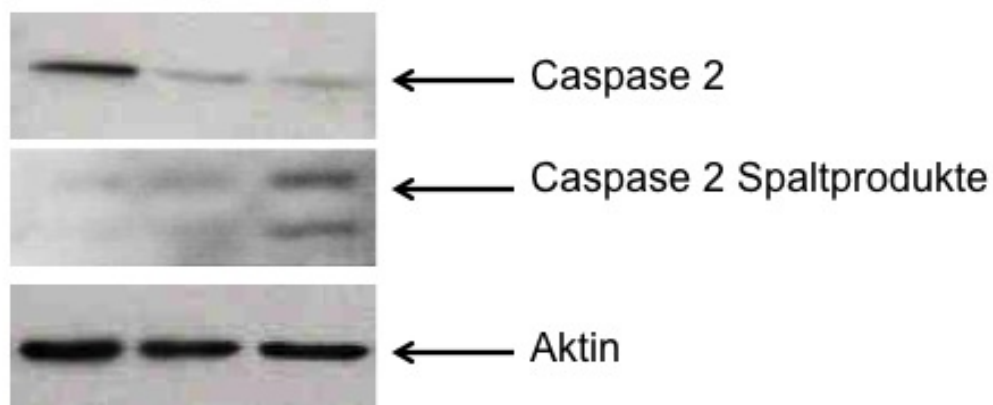
Kontrolle 100 μ M 200 μ M

Abbildung 3.9 **Western Blot Analyse der Wirkung von Flavon auf Caspase 2**
 HCT 116 Zellen wurden für 48 h mit 100 μ M oder 200 μ M Flavon inkubiert. Im Western Blot zeigt sich eine Abnahme der Caspase 2 und eine Zunahme ihrer Spaltprodukte. Für die Analyse wurden Gesamtproteinextrakte verwendet.

3.4.5 Caspase 10-Spaltung

Die HCT 116 Zellen wurden wiederum für 48 h mit 100 μM oder 200 μM Flavon inkubiert. Es zeigte sich, dass Flavon ebenfalls Caspase 10 spaltete.

Um zu analysieren, wie Caspase 10 aktiviert worden war, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob sich diese Spaltung durch spezifische Caspase-Inhibitoren blockieren ließ. Dazu wurden im ersten Ansatz die HCT 116 Zellen für 60 min. mit 50 μM z-VAD-fmk, einem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor, inkubiert und anschließend für weitere 48 h ohne bzw. mit 100 μM und 200 μM Flavone inkubiert. Im Western Blot zeigte sich, dass durch den Caspase-Inhibitor die Spaltung der Caspase 10 aufgehoben werden konnte (Abbildung 3.10).

Da dieser Caspase-Inhibitor unspezifisch die Caspasen 1, 3, 4 und 7 hemmte, wurden für die nächsten Versuche spezifische Caspase-Inhibitoren verwendet, um herauszufinden, ob und durch welche dieser Caspasen die Aktivierung der Caspase 10 induziert wurde. Die HCT 116 Zellen wurden dafür im nächsten Ansatz mit 50 μM z-DQMD-fmk, 30 μM LEVD-cho bzw. 30 μM Ac-YVAD-cmk für 60 min. inkubiert und dann für weitere 48 h mit 100 μM bzw. 200 μM Flavon inkubiert. Z-DQMD-fmk inhibierte spezifisch Caspase 3, LEVD-cho inhibierte spezifisch Caspase 4 und Ac-YVAD-cmk inhibierte spezifisch Caspase 1 und 4. Im Western Blot zeigte sich, dass sowohl bei Inhibition der Caspase 3 als auch bei Inhibition der Caspase 4 Caspase 10 weiterhin gespalten wurde. Wurden allerdings die Caspasen 1 und 4 inhibiert, so ließ sich bei Caspase 10 keine Spaltung mehr feststellen. Da keine spezifischen Inhibitoren für Caspase 1 oder 7 verfügbar waren, ließ sich durch diese Versuchsanordnung nicht eindeutig sagen, ob Caspase 10 durch

Caspase 1 oder 7 aktiviert wurde. Es erschien jedoch wahrscheinlicher, dass die Caspase 10 Spaltung, die bei Behandlung mit Flavon auftrat, durch Caspase 1 induziert wurde, da Caspase 7 erst später in der Kaskade involviert ist (Abbildungen 3.10 und 3.11).

[42]

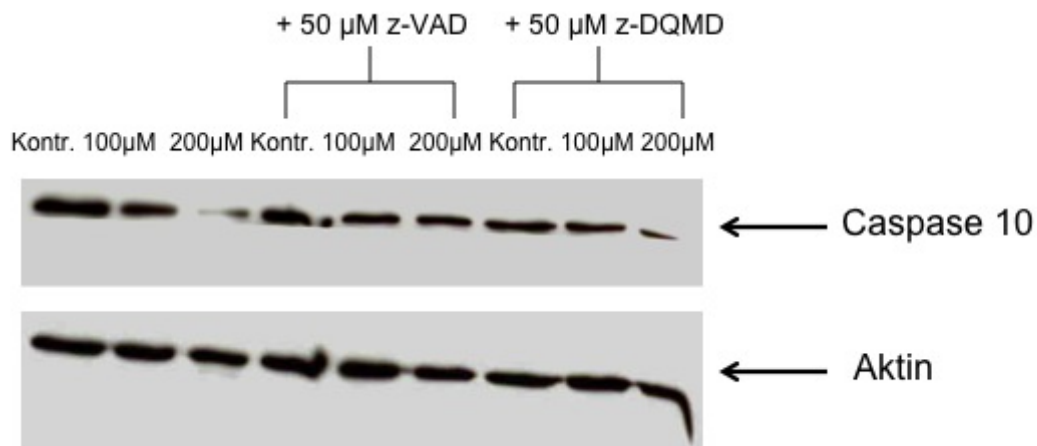


Abbildung 3.10 Spaltung der Caspase 10 und Inhibition der Spaltung durch spezifische Caspase-Inhibitoren

HCT 116 Zellen wurden für 60 min. mit 50μM z-VAD-fmk, bzw. mit 50μM z-DQMD-fmk inkubiert, und dann für weitere 48h 100μM oder 200μM Flavon zugegeben. Es zeigte sich, dass Caspase 10 nicht mehr gespalten wurde, wenn die Caspasen 1, 3, 4 und 7 gehemmt wurden. Wurde jedoch spezifisch nur Caspase 3 durch z-DQMD-fmk blockiert, konnte man die Spaltung weiterhin beobachten.

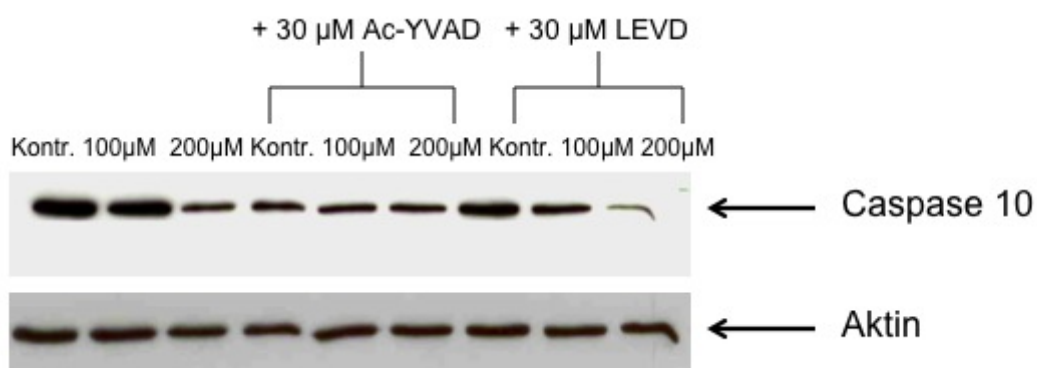


Abbildung 3.11 Spaltung der Caspase 10 und Inhibition der Spaltung durch spezifische Caspase-Inhibitoren

HCT 116 Zellen wurden für 60 min. mit 30μM LEVD-cho, bzw. 30μM Ac-YVAD-cmk inkubiert, und dann für weitere 48h 100μM oder 200μM Flavon zugegeben. Es zeigte sich, dass Caspase 10 weiterhin gespalten wurde, wenn Caspase 4 durch LEVD-cho inhibiert wurde. Durch Blockierung der Caspase 1 ließ sich die Spaltung inhibieren.

Es wurde weiterhin untersucht, ob Flavon einen Effekt auf Caspase 6 oder Caspase 7 hatte. In Western-Blots zeigte sich jedoch keine Wirkung von Flavon auf diese Caspasen.

3.4.6 Regulation der Bcl₂-Expression

Um zu untersuchen, ob Flavon die Regulation von bcl₂, einem proapoptischen mitochondrialen Protein des intrinsischen Apoptosewegs, beeinflusste, wurde die mitochondriale Fraktion der zytoplasmatischen Extrakte im Western Blot mit einem bcl₂Antikörper inkubiert. Es zeigte sich, dass die Expression von bcl₂ durch Behandlung mit Flavone herabreguliert wurde (Abbildung 3.12).

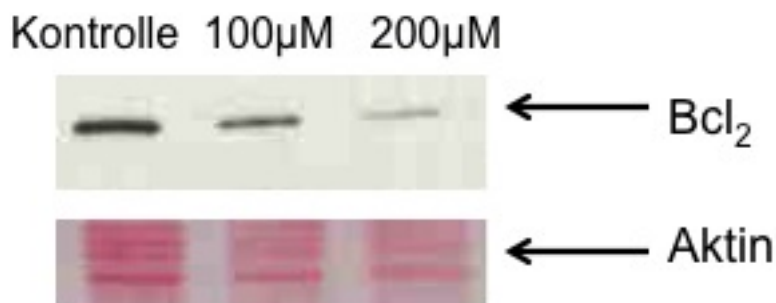


Abbildung 3.12 Western Blot Analyse der Wirkung von Flavon auf bcl₂
HCT 116 Zellen wurden für 48 h mit 100 µM oder 200 µM Flavon inkubiert. Im Western Blot zeigt sich eine Abnahme der bcl₂-Expression. Für die Analyse wurden isolierte Mitochondrien verwendet. Um zu kontrollieren, ob gleich viel Protein geladen wurde, wurde eine Ponceau S Färbung durchgeführt.

3.4.7 Regulation der Expression von Apoptosis inducing factor (AIF)

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob Flavon einen Effekt auf AIF zeigte. Dazu wurden die Zellen mit 200 μ M Flavon für jeweils 8 h, 16 h und 24 h inkubiert und dann Gesamtproteinextrakte im Western Blot mit einem AIF-Antikörper inkubiert. Dabei zeigte sich, dass Flavon zeitabhängig die Expression von AIF deutlich hochregulierte (Abbildung 3.13).

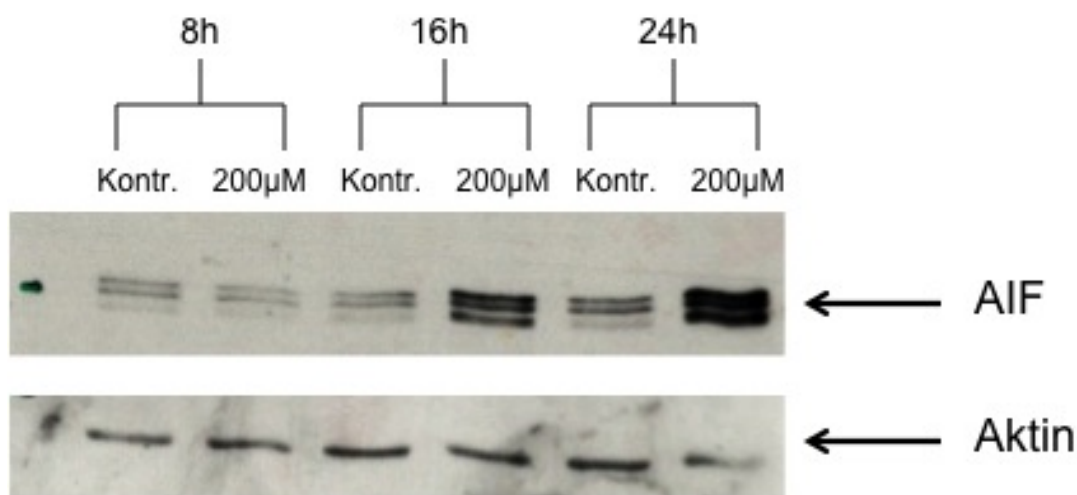


Abbildung 3.13 Western Blot Analyse der Wirkung von Flavon auf AIF
HCT 116 Zellen wurden für 8h, 16h und 24 h mit 200 μ M Flavon inkubiert. Im Western Blot zeigte sich eine Hochregulation der AIF-Expression. Für die Analyse wurden Gesamtproteinextrakte verwendet.

4 Diskussion

Bei der Entstehung kolorektaler Karzinome spielen Lebensgewohnheiten, insbesondere die Ernährung eine bedeutende Rolle. Es gibt unzählige Substanzen in der Nahrung, die unterschiedlichste Einflüsse auf Entstehung und Wachstum entarteter Zellen haben. In diesem Zusammenhang wurden bereits viele Studien durchgeführt, um die Mechanismen genauer zu erforschen.^[19; 35; 36; 40; 41; 43; 44; 54]

Kolorektale Karzinome zählen in der westlichen Welt zu den zweithäufigsten malignen Erkrankungen im Erwachsenenalter. Eine Umstellung von Lebensgewohnheiten stellt im Prinzip eine einfache und kostengünstige Maßnahme zur Prävention und Senkung der Inzidenz eines Malignoms dar. Sie ist allerdings abhängig von der Bereitwilligkeit des einzelnen Menschen gesund zu leben.

4.1 Zusammenhang zwischen Lifestyle-Modification und Entstehung kolorektaler Karzinome

Zahlreiche Studien haben den Zusammenhang zwischen der Entstehung kolorektaler Karzinome und Faktoren wie Ernährung, körperliche Aktivität und Konsum von Genussmitteln wie Alkohol und Nikotin untersucht. ^[19; 36; 40; 41; 44; 54]

Vor allem Ernährungsgewohnheiten scheinen einen großen Einfluss auf die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms haben. Die Idee, dass eine ballaststoffreiche Ernährung das Risiko zu erkranken senken könnte, tauchte erstmals 1969 auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf den

Einfluss einer Ernährung, die reich an Gemüse und Obst ist, gerichtet. Diese geht mit einem reduzierten Risiko einher, ein Kolonkarzinom zu entwickeln. [54] In Pflanzen sind viele Substanzen enthalten, die eine antikarzinogene Wirkung besitzen. Karzinogene agieren in der Regel nach einem einheitlichen Prinzip. Nach der Aktivierung des Prokarzinogens zum Karzinogen interagiert dieses mit der DNA des Zellkerns. Daraus resultiert eine veränderte Expression codierter Gene und Proteine. In diese Kaskade können pflanzliche Stoffe, wie zum Beispiel Karotinoide, Ascorbinsäure, Phenole, Isothiocyanate und Indole, sowie auch die Flavonoide, an unterschiedlichen Stellen eingreifen. Sie wirken als Antioxidantien, inaktivieren Enzyme oder verhindern die Aktivierung von Prokarzinogenen. [19]

Wenzel et al hatten bereits 2000 postuliert, dass Flavon – ein Phytoöstrogen aus der Gruppe der Flavonoide – in Zellen der Linie HT 29 Apoptose induziert. [51] Es wird dabei die mRNA von Genen reguliert, die Zellzyklus und Apoptose steuern, unter anderem Cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear transcription factor kappa B (nf- κ B) und bcl-X_L.

Weiterhin konnte die Proteinkinase-C β , welche einen wichtigen Marker in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms darstellt, in Zellen der Linie HT 29 nicht mehr nachgewiesen werden, nachdem diese mit Flavon behandelt worden waren. [15]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun weiter untersucht, wie Flavon mit humanen Kolonkarzinomzellen der Linie HCT 116 interagiert, bzw. die genauen Mechanismen der zytotoxischen Wirkung auf proteinbiochemischer Ebene analysiert.

4.2 Flavon induziert Apoptose in Kolonkarzinom-Zellen

In Versuchen zu dieser Studie war gezeigt worden, dass Flavone zeit- und konzentrationsabhängig eine Reduktion der Zellzahl von humanen Kolonkarzinomzellen der Linie HCT 116 verursacht. Diese Reduktion konnte Folge einer Hemmung des Zellwachstums oder einer Induktion des Zelltods sein. Mittels Propidiumiodid Färbung und FACScan-Analysen wurde bewiesen, dass die Zellen abgestorben waren. Dieser Effekt konnte außerdem durch den Breitspektrum-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk gehemmt werden, was zu der Annahme führte, das Flavon über Aktivierung der Caspasen-Kaskade Apoptose induziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Flavon auf HCT 116 Kolonkarzinomzellen zytotoxisch wirkt. Flavon hemmt den Zellzyklus und induziert den programmierten Zelltod.

Aktivierung der Caspasen-Kaskade durch Flavon

Apoptose kann über viele verschiedene Mechanismen induziert werden, wobei der sogenannte extrinsische und intrinsische Weg am besten untersucht sind. In Typ I Zellen wird Apoptose unabhängig von den Mitochondrien über sogenannte death-receptors ausgelöst. Im weiteren Verlauf kommt es zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung der Caspase 8, sowie zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Caspase 3 spaltet in aktivierter Form unter anderem Caspase 6. Diese Kaskade wird als extrinsischer Weg der Apoptose bezeichnet. [5;

17; 47; 50]

Der intrinsische Weg wird über die Mitochondrien induziert. Es kommt zur Bildung eines Apoptosoms aus Cytochrom C mit apoptotic proteinase activating factor-1 (Apaf-1) und Pro-Caspase 9, welches

zur Spaltung und Aktivierung von Caspase 9 führt. Caspase 9 spaltet nachfolgende Caspasen, unter anderem auch Caspase 3. Es gibt also eine gemeinsame Endstrecke, die durch Spaltung der Caspase 3 eingeleitet wird. [5; 12; 13; 29; 42] Im Western Blot konnte die Spaltung der Caspase 3 in Zellen der Linie HCT 116 durch Flavon bewiesen werden. Flavon induziert also über die caspase-abhängige Kaskade Apoptose.

Zellen, die auf dem mitochondrienabhängigen Weg in die Apoptose gehen, werden als Typ II Zellen bezeichnet. Zellen der Linie HCT 116 verhalten sich wie Typ II Zellen. [32] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte im Western Blot gezeigt werden, dass Caspase 9 gespalten wird, was indizierte, dass Flavon über den intrinsischen Weg Apoptose induziert. Es konnte allerdings auch die Spaltung von Caspase 8 nachgewiesen werden, einer Caspase, die eigentlich am Anfang des extrinsischen Wegs steht. Es war aus vorausgegangenen Studien zur Erforschung apoptotischer Abläufe bekannt, dass sowohl intrinsischer als auch extrinsischer Weg miteinander verlinkt sind und sich gegenseitig verstärken. So spaltet Caspase 8 unter anderem bid, welches wiederum die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien induziert. Bid gehört zu den Proteinen der bcl₂-Familie, welche ebenfalls für die Regulation der Apoptose verantwortlich sind. Pro-Caspase 8 wird selbst aber auch durch Caspase 3 aktiviert, so dass es auch bei der mitochondrialen Apoptose zur Spaltung der Caspase 8 kommt, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt als beim extrinsischen Weg. [28; 32; 38; 42] Vermutlich wird also die Aktivierung der Caspase 8 durch Flavon nicht direkt induziert, sondern indirekt über den intrinsischen Weg.

Im Rahmen der Versuchsreihe ließ sich auch die Spaltung von Caspase 2 nachweisen, welche ebenfalls zu den Apoptose

induzierenden Caspasen gehört. Die Stellung dieser Caspase im Prozess der Apoptose ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass sie in die Regulation der intrinsischen Kaskade involviert ist und in ihrer aktiven Form die Freisetzung proapoptotischer Proteine, wie z. B. Cytochrom C aus den Mitochondrien verursacht.^[14; 28; 37] Die Freisetzung wird zum einen direkt durch Caspase 2 getriggert, zum anderen spaltet Caspase 2 wie auch Caspase 8 bid, welches seinerseits wiederum proapoptotische Proteine aus den Mitochondrien freisetzt. ^[49] Es ist hingegen auch berichtet worden, dass Caspase 2 in den Mitochondrien lokalisiert ist und im Rahmen der Permeabilitätssteigerung freigesetzt wird.^[11] Wie es zur Spaltung, bzw. Aktivierung der Caspase 2 kommt, ist jedoch noch nicht geklärt. Eine Theorie besagt, dass Caspase 2 wie Caspase 8 über die Bindung von Liganden an *death receptors* aktiviert wird, dadurch kommt es zur Bildung von Dimeren, gefolgt von autokatalytischer Spaltung.^[49]

Im weiteren Verlauf aktiviert Caspase 2 unter anderem Caspase 9, sowie Caspase 3, welche ihrerseits Caspase 2 vermutlich im Sinne einer Verstärkungsschleife spaltet. Weiterhin wurde in einer vorausgegangenen Studie gezeigt, dass in manchen Zellen Caspase 2 die Freisetzung von Caspase 8 verursacht, unter anderem wenn Apoptose durch Ceramide oder Etoposide induziert wurde. ^[2; 11; 14; 25; 28; 37; 45] In Zellen der Linie HCT 116, die mit Flavon behandelt wurden, konnte sowohl die Spaltung von Caspase 2 als auch von Caspase 8 gezeigt werden.^[49] Ob dabei die Spaltung beider Caspasen durch Flavon induziert wurde, oder ob die Spaltung der Caspase 8 sequentielle Folge der Caspase 2-Spaltung ist, lässt sich nicht eindeutig sagen.

Die Rolle der Caspase 10 im Prozess der Apoptose wird kontrovers

diskutiert. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Caspase 10 ähnlich wie Caspase 8 über die Bindung von Liganden an *death receptors* durch Formation eines DISC aktiviert wird. Caspase 10 ist also auch eine Initiator-Caspase, die auf ähnliche Weise wie Caspase 8 – jedoch unabhängig von dieser – Apoptose induziert. Die Caspasen 10 und 8 können sich nicht gegenseitig aktivieren, als Initiator-Caspase spaltet und prozessiert Caspase 10 die Caspasen 3 und 6. Es wurde allerdings auch berichtet, dass in den sog. Typ II Zellen Caspase 10 nach Induktion des mitochondrialen Wegs gespalten wird. Diese Spaltung ist durch bcl_2 inhibierbar. [5; 21] Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den mit Flavon behandelten Zellen nachgewiesen werden, dass Caspase 10 gespalten wurde. Da sich Zellen der Linie HCT 116 wie Typ II Zellen verhalten, bestätigt sich dadurch die Vermutung, dass Caspase 10 in die mitochondriale Kaskade involviert ist.

Um die Regulation der Caspase 10 im Rahmen der Apoptoseinduktion durch Flavon präziser zu untersuchen, wurden weitere Versuche durchgeführt, in denen spezifisch ausgewählte Caspasen inhibiert wurden. Dabei zeigte sich, dass durch den Breitspektrum-Inhibitor Z-VAD-fmk, der die Caspasen 1, 3, 4 und 7 inhibiert, die Spaltung der Caspase 10 aufgehoben werden konnte. Wurden lediglich die Caspase 3 (mittels z-DQMD-fmk) oder die Caspase 4 (mittels LEVD-cho) inhibiert, war die Spaltung der Caspase 10 weiterhin nachweisbar. Nach Hemmung der Caspasen 1 und 4 (mittels Ac-YVAD-cmk) ließ sich die Spaltung der Caspase 10 nicht mehr zeigen. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass entweder Caspase 7 oder Caspase 1 in die Aktivierung der Caspase 10 involviert war. Es ließ sich nicht ausschließen, dass Caspase 7 Caspase 10 spaltet. Dies erschien jedoch unwahrscheinlich, da sie als Effektor-Caspase erst viel später in der Kaskade aktiviert wird.

Wahrscheinlicher war demnach ein bestehender Zusammenhang der Spaltung der Caspase 10 mit Caspase 1. Nach der bisherigen Studienlage spielt Caspase 1 in der Regulation der Apoptose eine untergeordnete Rolle. Ihre Aktivierung findet im Rahmen von Entzündungsprozessen statt. [5; 31] Es lässt sich jedoch vermuten, dass es sich hierbei um eine Verknüpfung zwischen Apoptose und Entzündung handelt.

Regulation von Proteinen der bcl₂-Familie durch Flavon

Da in die Regulation der Apoptose auch Proteine der bcl₂-Familie involviert sind, die insbesondere im Rahmen des mitochondrialen Wegs eine wichtige Rolle spielen, wurde in Versuchen zu dieser Arbeit auch die Wirkung von Flavon auf bcl₂ untersucht. Bcl₂ gehört zu den Proteinen mit antiapoptotischer Wirkung. Es wird von Mitochondrien exprimiert und ist in Zellen an der äußeren Membran der Mitochondrien sowie am endoplasmatischen Retikulum und am Nukleus (Kernmembran) lokalisiert. Bei Induktion der Apoptose über den intrinsischen Weg nimmt die Permeabilität der Mitochondrienmembran zu, dadurch werden intramitochondriale Proteine ins Zytoplasma freigesetzt. Bcl₂ stabilisiert die Mitochondrienmembran und verhindert, dass diese unspezifisch permeabel wird. Auf diese Weise verzögert bzw. verhindert es in Typ II Zellen die Freisetzung von Cytochrom C, welches wiederum mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 das Apoptosom bildet. Weiterhin inhibiert bcl₂ ebenfalls die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien. [9; 32; 38]

Es konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung der Zellen mit Flavon die bcl₂-Expression deutlich herunterreguliert wurde. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass Flavon über Induktion des

mitochondrialen Wegs Apoptose auslöst.

Freisetzung von AIF (Apoptosis inducing factor) durch Flavon

Neben der caspase-anhängigen Apoptose existieren auch caspasen-unabhängige Apoptosewege. Hierbei stellt AIF ein Schlüsselprotein dar. Es gehört zur Gruppe der Flavoproteine und ist im intermembranären Raum der Mitochondrien lokalisiert. Unter Einfluss zytotoxischer Stimuli kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, AIF wird freigesetzt und transloziert zum Nukleus. Dort induziert es die Kondensation von Chromatin und die Fragmentierung der DNA. [4; 9; 46]

Da Flavon Apoptose über den mitochondrialen Weg in HCT116 Zellen induziert, wurde in weiteren Versuchen zu dieser Arbeit untersucht, ob auch die Expression von AIF durch Flavon beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass AIF zeitabhängig freigesetzt wird. Das würde bedeuten, dass Flavon auch unabhängig von Caspasen Apoptose induziert. Da allerdings die Apoptose durch den Breitspektrum-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk nahezu vollständig inhibiert werden konnte, schien es unwahrscheinlich, dass die Freisetzung von AIF im Rahmen der Apoptoseinduktion durch Flavon eine tragende Rolle spielt.

4.3 Flavon induziert einen Zellzyklusarrest in Kolonkarzinomzellen

Die Reduktion der Zellzahl, die durch Flavon verursacht wird, war zum einen auf Apoptose zurückzuführen. Andererseits bestand die Möglichkeit, dass Flavon außerdem einen Zellzyklusarrest induziert. Dieser Arrest konnte mittels FACScan-Analysen bewiesen werden.

Flavon verursacht einen Arrest in der G₂/M-Phase

Ziel der Zellteilung ist es, die genetische Information vollständig und fehlerfrei an die Tochterzellen weiterzugeben. Der Zellzyklus ist eine komplexe Folge von Prozessen, in die Schutz- und Kontrollmechanismen integriert sind. Diese sollen gewährleisten, dass Zellen mit fehlerhafter DNA entweder repariert oder gegebenenfalls eliminiert werden. So regulieren spezifische Proteine, dass die Proliferation nur in Anwesenheit bestimmter Stimuli, wie z. B. Wachstumsfaktoren stattfindet. Werden Zellschäden detektiert, wird ein Zellzyklusarrest induziert. Kann der Schaden behoben werden, proliferiert die Zelle regulär weiter. Ansonsten wird die Zelle durch Apoptose eliminiert.

Flavon induziert einen Arrest in der G₂/M-Phase, also nach Replikation der DNA-Stränge und bevor die Zelle in die Teilungsphase eintritt.

Für die Regulation des Zellzyklus sind spezifische Proteine zuständig, unter anderem die sogenannten Cyklin-abhängigen Kinasen (CDKs), deren Aktivität wiederum von den jeweiligen Zyklinen abhängig ist. Inwiefern diese durch Flavon beeinflusst werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer untersucht.

4.4 Ausblick in die Forschungsergebnisse nach 2005

In den folgenden Jahren entstanden viele weitere Arbeiten, die sich mit dem Themenkomplex der hier vorliegenden Arbeit beschäftigt haben. Bezugnehmend auf diese Arbeit sind vor allem zwei Gebiete von besonderem Interesse.

Zum einen die Wirkung von natürlichen aber auch synthetisch hergestellten Flavonoiden auf andere Zelllinien, insbesondere karzinomatös entartete, sowie die Möglichkeit Flavonoide therapeutisch als Chemotherapeutika oder als Adjuvantien einzusetzen. Zum anderen wurde die Entwicklung weiterer Substanzen untersucht, die man zur Behandlung eines Kolonkarzinoms einsetzen kann.

So untersuchte beispielsweise die Arbeitsgruppe um L. Sewing die Wirkung des Bisphosphonats Zoledronsäure (ZOL) auf Kolonkarzinomzellen der Linie HCT 116. Bislang war eine inhibierende Wirkung auf Knochenmetastasen unterschiedlicher Tumore bekannt. Andere Untersuchungen hatten einen Effekt auf die Entstehung von Primärtumoren und viszerale Metastasen gezeigt. L. Sewing konnte nachweisen, dass Zoledronsäure apoptotisch auf HCT 116 Zellen wirkt sowie ein Zellzyklus-Arrest induziert [39].

Weitere potentielle Substanzen sind die 3-O-Acetyl Oleanolsäure [56] und Denbinobin, welches Apoptose über die Zerstörung der DNA sowie die Ausschüttung von AIF induziert [6]. Auch Fisetin, eine Substanz die wie Flavon in Früchten und Gemüse vorkommt, induziert Apoptose in Kolonkarzinomzellen, jedoch über die Aktivierung von death-receptors sowie über den mitochondrialen Weg [27].

Zahlreiche Arbeiten beschäftigten sich mit der Wirkung von Flavonoiden auf diverse Karzinom-Zelllinien. So konnte im Rahmen einer Studie die Induktion von Apoptose und Hemmung des Zellwachstums durch Flavon in Mamma-Karzinomzellen der Linie MDA-MB-468 gezeigt werden. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte auch nachgewiesen werden, dass Flavon eine veränderte Genexpression hervorruft [48].

Flavonoide sind natürlich vorkommende Substanzen, können jedoch auch künstlich synthetisiert werden. Auch für diese synthetisch hergestellten Flavonoide konnten apoptotische Mechanismen gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe um H. Liu konnte auf Leberkarzinom-Zellen der Linie HepG-2 durch ein synthetisches Flavonoid die Induktion der Apoptose sowohl über death-receptors als auch über den mitochondrialen Weg nachweisen. Weiterhin sah die Forschergruppe die Möglichkeit, synthetisch hergestellte Flavonoide als potente Therapeutika gegen Leberzellkerzinome einzusetzen [30].

Andere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Möglichkeit durch Flavonoide in die Entstehung von Metastasen einzugreifen. CD 26 ist ein Protein, welches die Entstehung von Metastasen unterdrückt. In vielen Karzinomzellen ist dieses Protein runterreguliert unter anderem in Kolonkarzinomzellen. Für Apigenin, ein Flavonoid welches in Blattgemüse vorhanden ist, konnte nachgewiesen werden, dass es die Expression von CD 26 Proteinen in Kolonkarzinomzellen der Linie HT 29 hochreguliert [26]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass Flavonoide die Potenz mancher Chemotherapeutika erhöhen.

Nachdem viele Studien die in vitro Wirkung der Flavonoiden bewiesen

hatten, beschäftigten sich Arbeitsgruppen auch mit der in vivo Wirkung der Flavonoide. Es konnte gezeigt werden, dass im Kolongewebe von Mäusen, die mit Flavon behandelt worden waren, weniger abnormale Krypten nachweisbar waren und die Entstehung von Mikroadenomen unterdrückt wurde [53].

5 Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome gehören in der westlichen Welt zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Menschen. Bestimmte Lebensgewohnheiten wie körperliche Inaktivität, Rauchen, Alkohol und insbesondere auch die Ernährung haben einen maßgeblichen Einfluß auf die Entstehungshäufigkeit dieser Tumoren. Obst und Gemüse scheinen eine protektive Wirkung hinsichtlich der Entwicklung gastrointestinaler Malignome zu haben. Dies ist insbesondere auf ihren Gehalt an Flavonoiden zurückzuführen, von denen über 4000 unterschiedliche in Obst und Gemüse nachgewiesen wurden.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Flavons 2-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-one auf die Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß Flavon den Zellzyklus in der G₂/M Phase arretiert und eine zytotoxische Wirkung auf HCT 116 Zellen ausübt.

Diese zytotoxische Wirkung war durch einen Breitspektrum-Caspasehemmer blockierbar, womit gezeigt werden konnte, daß Flavon in der Lage ist, eine caspase-abhängige Apoptose zu induzieren. HCT 116 Zellen sind sogenannte Typ II Zellen, in denen eine Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg vermittelt wird. Weitere Experimente mit spezifischen Caspaseantikörpern und Caspasehemmern ergaben, dass Flavon in der Lage ist, diesen intrinsischen Apoptoseweg zu induzieren. Nach Inkubation von HCT 116 Zellen kommt es zu einer verminderten Expression des antiapoptotischen, mitochondrialen Proteins bcl₂ sowie einer Aktivierung der Caspasen 9, 3, 8, 2, und 10. Normalerweise werden die Caspasen 8 und 10 über den extrinsischen Weg, vermittelt durch

death receptors aktiviert. Da dieser Weg in HCT 116 Zellen vermutlich nicht aktiviert werden kann, wird Caspase 8 am ehesten über Caspase 2 aktiviert, was als Möglichkeit aus früheren Arbeiten bekannt ist. Caspase 10 wird am ehesten über Caspase 1 aktiviert, welche vor allem bei Entzündungen eine Rolle spielt, aber wohl auch als Bindeglied zwischen Entzündung und Apoptose dient.

Flavon ist darüberhinaus in der Lage, caspaseunabhängige Apoptosewege zu aktivieren. So führte eine Inkubation von HCT 116 Zellen mit Flavon zu einer Freisetzung des *apoptosis-inducing factors (AIF)*, einem mitochondrialen, proapoptotischen Protein, das zu einer Fragmentierung der DNA und einer Chromatinkondensation führt.

Da die Flavon-induzierte Apoptose jedoch fast vollständig durch den Breitspektrum Caspasehemmer VAD-fmk hemmbar war, scheint eine caspase-unabhängige Apoptose bei der zytotoxischen Wirkung von Flavon eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AIF – apoptosis inducing factor

Apaf 1 – apoptotic proteinase activating factor 1

APC – Adenoma Polyposis Coli

APS – Ammoniumpersulfat

CDK – cyclin dependent kinase

COX2 – cyclooxygenase 2

DISC – death inducing signaling complex

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – Desoxyribonukleinsäure

DTT – Dithiothreitol

FACS – Fluorescence activated cell sorting

FADD – Fas-associating protein with death domain

FAP – familiäre adenomatöse polyposis coli

Flavon - 2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one

HNPPC – hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinomsyndrom

mRNA – messenger Ribonukleinsäure

MTT – methylthiazoletetrazolium

nfkB – nuclear transcription factor kappa B

PBS- phosphate buffered saline

PI – propidium iodid

RNA – Ribonukleinsäure

TEMED- tetramethylethyldiamin

TNF – tumor necrosis factor

TNF-R – tumor necrosis factor-receptor

7 Literaturverzeichnis

1. Adams JM, Cory S: The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322
2. Baliga BC, Read SH, Kumar S: The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death and Differentiation* 2004; 11: 1234
3. Calomme M, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D: Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Medica* 1996; 62: 222
4. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami Kroemer G: Apoptosis inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 2002; 84: 215
5. Chen M, Wang J: Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7: 313
6. Chen TH, Pan SL, Guh JH, Chen CC, Huang YT, Pai HC, Teng CM: Denbinobin induces apoptosis by apoptosis-inducing factor releasing and DNA damage in human colorectal cancer HCT-116 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008; 378: 447
7. Cova D, De Angelis L, Giavarini F, Palladini G, Perego R: Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1992; 30: 29
8. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ: Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological Reviews* 2003; 193: 10
9. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri, KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G: Mitochondrio-nuclear transcription of AIF in apoptosis and necrosis. *The FASEB Journal* 2000; 14: 729
10. Duthie SJ, Dobson VL: Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *European Journal of Nutrition* 1999; 38: 28
11. Enoksson M, Robertson JD, Gogvadze V, Bu P, Kropotov A, Zhivotovsky B, Orrenius S: Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 49575
12. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309
13. Green DR: Apoptotic Pathways: The roads to ruin. *Cell* 1998; 94: 695
14. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *The*

Journal of Biological Chemistry 2002; 277: 13430

15. Herzog A, Kindermann B, Doring F, Daniel H, Wenzel U: Pleiotropic molecular effects of the pro-apoptotic dietary constituent flavone in human colon cancer cells identified by protein and mRNA expression profiling. *Proteomics* 2004; 4: 2455
16. Hill et al: Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet* 1978
17. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M: Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187: 587
18. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995; 62: 1276
19. Johnson IT: New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutation Research* 2004; 551: 9
20. King RA, Bursill DB: Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 67: 867
21. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A: Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 46639
22. Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, et al.: Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* 1997; 146: 223
23. Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004
24. Kuo SM: Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal Caco-2 cells. *Life Sciences* 1998; 63: 2323
25. Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y: Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 2002; 297: 1352
26. Lefort EC, Blay J: The dietary flavonoid apigenin enhances the activities of the anti-metastatic protein CD26 on human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2011; 28: 337
27. Lim do Y, Park JH: Induction of p53 contributes to apoptosis of HCT-116 human

- colon cancer cells induced by the dietary compound fisetin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296: 1060
28. Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, Tang MJ, Chang WC, Lin YS: Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide- and etoposide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 40755
29. Lincz LF: Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death. *Immunology and Cell Biology* 1998; 76: 1
30. Liu H, Dong A, Gao C, Tan C, Xie Z, Zu X, Qu L, Jiang Y: New synthetic flavone derivatives induce apoptosis of hepatocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18: 6322
31. Martinon F, Tschopp J: Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117: 561
32. Özören N, E-Deiry WS: Defining characteristics of types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 2002; 4: 551
33. Peterson J, Dwyer J: Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. *Journal Am Diet Assoc* 1998; 98: 677
34. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Bandner G, Hess RD: Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 1996; 13: 1605
35. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM: Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiologic Reviews* 1993; 15: 499
36. Potter JD: Risk factors for colon neoplasia – Epidemiology and Biology. *European Journal of Cancer* 1995; 31A: 1033
37. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S: Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 29803
38. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al.: Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The Embo Journal* 1998; 17: 1675
39. Sewing L, Steinberg F, Schmidt H, Göke R: The bisphosphonate zoledronic acid inhibits the growth of HCT-116 colon carcinoma cells and induces tumor cell apoptosis. *Apoptosis.* 2008; 13: 782
40. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN: Eating patterns and risk of colon cancer. *American Journal of Epidemiology* 1998; 148: 4
41. Slattery ML, Potter JD, Friedman GD, Ma KN, Edwards S: Tobacco use and colon cancer. *International Journal of Cancer* 1997; 70: 259

42. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ: Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* 1999; 144: 281
43. Stein CJ, Colditz GA: Modifiable risk factors for cancer. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 299
44. Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD: Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *American Journal of Epidemiology* 1994; 139: 1
45. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al 1: Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189: 381
46. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al 2: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441
47. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312
48. Ullmannova V, Popescu NC: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 2007; 31: 110
49. Wagner KW, Engels IH, Devereaux QL: Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 335047
50. Wang J, Lenardo MJ: Molecules involved in cell death and peripheral tolerance. *Immunology* 1997; 9: 818
51. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H: Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 2000; 60: 3823
52. Williamson G, Faulkner K, Plumb GW. Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. *European Journal of Cancer Prev.* 1998; 7: 17
53. Winkelmann I, Diehl D, Oesterle D, Daniel H, Wenzel U: Flavone induces changes in intermediary metabolism that prevent microadenoma formation in colonic tissue of carcinogen-treated mice. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54: 18
54. Witte JS, Longnecker MP, Bird CL, Lee ER, Frankl HD, Haile RW: Relation of vegetable, fruit, and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *American Journal of Epidemiology* 1996; 144: 1015
55. Xu X, Wang HJ, Murphy PA, Cook L, Hendrich S: Daidzein is a more bioavailable

soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *Journal of Nutrition* 1994; 124: 825

56. Yoo KH, Park JH, Cui EJ, Kim KI, Kim JY, Kim J, Hong SG, Baek NI, Chung IS: 3-O-Acetyloleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Colon Carcinoma HCT-116 Cells. *Phytother Res.* 2012 Feb 23. doi: 10.1002/ptr.4616

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg:

Dr. Adamkiewicz	Prof. Dr. Krause
Prof. Dr. Arnold	Prof. Dr. Kretschmer
Prof. Dr. Barth	Prof. Dr. Krieg
Prof. Dr. Dr. Basler	Prof. Dr. Kroll
Prof. Dr. Baum	Prof. Dr. Lang
PD Dr. Becker	Prof. Dr. Lill
PD Dr. Christiansen	Dr. Dr. Mandrek
Dr. Czubayko	Prof. Dr. Moll
Prof. Dr. Daut	Dr. Müller
Prof. Dr. Eilers	Prof. Dr. Mutters
Prof. Dr. Feuser	Prof. Dr. Oertel
PD Dr. Fritz	Prof. Dr. Dr. Remschmidt
PD Dr. Gerdes	Prof. Dr. Renz
Prof. Dr. Geus	Prof. Dr. Richter
Prof. Dr. Gotzen	Prof. Dr. Schmidt
Prof. Dr. Griss	Prof. Dr. Seitz
Prof. Dr. Gudermann	Prof. Dr. Seyberth
Prof. Dr. Hofmann	Prof. Dr. Studer
Prof. Dr. Jungclas	Prof. Dr. Weihe
Prof. Dr. Klenk	Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Koolman	Prof. Dr. Wulf

Meine akademischen Lehrer in Kempten:

Dr. Angeli	Dr. Markmiller
Prof. Dr. Haller	PD Dr. Sterk

8.2 Danksagung

Ohne die Hilfe einer ganzen Reihe von Menschen wäre mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Göke für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der notwendigen Materialien und Laborräume bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Harald Schmidt, für seine Hilfe zu jeder Tageszeit, für sein Wissen, seine Ratschläge und seine engelsgleiche Geduld. Ohne ihn wäre mir die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich immer überall unterstützt und in meinem Tun bestärkt haben, gilt ebenso mein Dank wie meinem Bruder Paul, der niemals aufgehört hat, an diese Arbeit zu glauben und mit seinem Drängeln Recht behalten hat.

Danke Marc.

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Untersuchungen zu den Wirkungen von Flavon auf humane Kolonkarzinomzellen“

im Zentrum für Innere Medizin, Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie unter der Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Göke ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht: Apoptosis 2005; 10: 611 – 617