

HEMMWIRKUNG ANTHOCYANREICHER BEERENEXTRAKTE UND DES ANTHOCYANIDINS DELPHINIDIN AUF KANZEROGENESE-ASSOZIIERTE REZEPTORTYROSINKINASEN

Nicole Teller^a, Wilko Thiele^{b,c}, Jonathan Sleeman^{b,c} and Doris Marko^a

^aInstitut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien, 1090 Wien, Österreich

^bForschungszentrum Karlsruhe, Institute of Toxicology and Genetics, 76021 Karlsruhe, Deutschland

^cMedical Faculty Mannheim, Centre for Biomedicine and Medical Technology, University of Mannheim, 68167 Mannheim, Deutschland

Tumore des Kolons und Rektums sind mit jährlich ca. 412.900 Neuerkrankungen in Europa weit verbreitet [1]. Neben genetischen Dispositionen und verschiedenen Umweltfaktoren wird vor allem auch dem Ernährungsverhalten ein maßgeblicher Beitrag an der kolorektalen Kanzerogenese zugeschrieben. So weist das amerikanische Institut für Krebsforschung (AICR) darauf hin, dass bis zu 45 % aller kolorektalen Tumore durch eine sogenannte „gesunde Lebensweise und Ernährung“ präventiv zu vermeiden wären [2].

Obwohl das Gesundheitsbewusstsein in der Bevölkerung in den letzten Jahren stark gestiegen ist, sind die Ernährungsgewohnheiten in den westlichen Industrienationen häufig durch einen geringen Konsum an Obst und Gemüse gekennzeichnet. Daher kommt der Identifizierung von Lebensmitteln und -inhaltsstoffen mit einem möglichen chemopräventiven Potential sowohl großes wissenschaftliches als auch wirtschaftliches Interesse zu. Eine solche Lebensmittelgruppe mit potentiell chemopräventiven Inhaltsstoffen stellen beispielweise Beeren sowie daraus hergestellte Produkte dar. Aus Beeren gewonnene Getränke, darunter vor allem Wein und auch Traubenfruchtsäfte, werden mit einem Pro-Kopf Verbrauch von 24,3 l bzw. 1,0 l pro Jahr in Deutschland in hohem Maße konsumiert [3, 4]. Beeren sowie daraus gewonnene Erzeugnisse enthalten hohe Konzentrationen an Polyphenolen (> 100 mg/100 g Frischgewicht) [5]. Polyphenole gelten als vielversprechende Klasse bioaktiver Inhaltsstoffe von Lebensmitteln mit postuliertem chemopräventivem Potential. Jedoch sind die zellulären Wirkmechanismen der Polyphenole bisher noch nicht vollständig geklärt.

Während der Kanzerogenese finden häufig Veränderungen der Aktivität und Expression von Schlüsselementen zellulärer Signaltransduktionskaskaden statt. Den Anfang dieser Kaskaden stellen Zelloberflächenrezeptoren der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) dar, die über nachgeschaltete Signalkettenelemente elementare zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese und Lymphangiogenese regulieren. Eine charakteristische Gemeinsamkeit der RTK ist ihre intrinsische Tyrosinkinaseaktivität; das heißt sie katalysieren den Transfer einer γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat auf eine Hydroxygruppe eines Tyrosinrestes innerhalb der Zielproteine. Eine Vielzahl an Tumoren wird mit der Überexpression und konstitutiven Aktivierung der Rezeptoren der epidermalen Wachstumsfaktorfamilie (ErbB) und der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorfamilie (VEGFR) assoziiert [6]. Kommt es zu Veränderungen in der Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren werden vor allem proliferationsassoziierte Signalkaskaden verändert. So konnte bereits in vitro gezeigt werden, dass dies zu unkontrolliertem Zellwachstum und der Verminderung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, führt. Die VEGFR-Familie spielt im Besonderen in der Tumorlymphangiogenese und der Tumorangiogenese eine Rolle. Durch die gesteigerte Aktivität des VEGFR3 wird vor allem die Lymphangiogenese, also die Bildung neuer Lymphgefäße aus bereits bestehenden, vorangetrieben [7]. Hingegen findet der als Blutangiogenese, oder lediglich als Angiogenese bezeichnete Prozess, vornehmlich über die Aktivierung des VEGFR2 statt.

Sowohl im Hinblick auf die Chemoprävention als auch auf die Tumorthherapie stellen sich die Rezeptoren der RTK-Familie daher als vielversprechende Zielelemente dar. Es konnten bereits ausgewählte Polyphenole und polyphenolreiche Extrakte als potente Inhibitoren der Aktivität verschiedener RTK identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung zweier kommerziell erhältlicher Beerenextrakte, das aus Blaubeeren (*Vaccinium myrtillus*) hergestellte Mirtocyan (Indena, Italien) und das aus den Pressrückständen von roten Weinbeeren gewonnene Oenocyanin (Bagnarese, Italien), hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aktivität wichtiger RTK untersucht. Die mengenmäßig dominierende Polyphenolklasse der ausgewählten Extrakte ist die der Anthocyane. Die Anthocyane sind die wichtigste Gruppe wasserlöslicher Farbpigmente in Pflanzen und tragen zur charakteristischen Rot- bis

Blaufärbung von vielen Früchten und Gemüse bei [8]. Die Aglyka selbst, die Anthocyanidine, kommen originär kaum in der Natur vor, sondern liegen in glykosidisch gebundener Form als Anthocyane vor. Eine mögliche Freisetzung der Anthocyanidine aus Anthocyanen während des Verdauungsprozesses wird jedoch unter den Bedingungen des Kolons postuliert.

Mirtocyan ist ein kommerziell erhältliches Nahrungsergänzungsmittel, in welchem Polyphenole der Klassen der Phenolcarbonsäuren, Flavonole, Flavanole und Anthocyane enthalten sind, wobei letztere die Hauptgruppe der im Extrakt enthaltenen Flavonoide mit 36 % ausmachen. Ebenso besitzt der Weinbeerenextrakt Oenocyanin als Hauptpolyphenolgruppe glykosylierte Anthocyane mit einem Gehalt von 22 %. Des Weiteren wurde die Wirkung des nicht originär in den Extrakten enthaltenen isolierten Aglykon, dem Anthocyanidin Delphinidin, auf die Aktivität der RTK untersucht.

Die vorliegenden Daten, die mittels „Enzyme linked immunosorbent Assay“ gewonnen wurden zeigen, dass die anthocyanreichen Beerenextrakte sowie Delphinidin die ErbB1-3-Rezeptoren, den VEGFR2, -3 sowie den IGF1R (Insulin ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor) im isolierten zellfreien System potent in ihrer Proteintyrosinkinaseaktivität (PTK) in Konzentrationen $\leq 12,9 \mu\text{g/ml}$ bzw. $\leq 10,5 \mu\text{M}$ hemmen können. Als kollektive Wirkqualität zeigten die polyphenolreichen Beerenextrakte und Delphinidin die potenteste Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR und der VEGFR2 innerhalb der getesteten Rezeptoren.

Nachfolgend wurden mittels Western Blot Analyse im zellulären System die aktivitätshemmenden Eigenschaften der Substanzen auf die Rezeptoren untersucht. Ihre Aktivierung erfolgt durch die Autophosphorylierung spezifischer intrazellulärer Tyrosinreste und stellt den ersten Schritt der Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade dar. Daher wurde untersucht, ob die Testsubstanzen, die sich als potente Hemmstoffe der isolierten Rezeptoren gezeigt haben, auch im intakten zellulären System die Autophosphorylierung der RTK hemmen können. Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus der Rezeptoren als Maß für deren Aktivität im Western Blot Assay und anschließender Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper betrachtet. Die Western Blot Untersuchungen belegten auch im zellulären System potente aktivitätshemmende Eigenschaften der Testsubstanzen, die demnach nicht auf das isolierte System beschränkt scheinen. Im zellulären Testsystem, der humanen

Vulvakarzinomzelllinie A431, konnte für Delphinidin und die getesteten Beerenextrakte eine Breitbandhemmung der Aktivität der ErbB-Rezeptoren durch Western Blot Analyse mit IC_{50} -Werten von $0,1 \mu\text{M}$ – $50 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{g/ml}$ – $185 \mu\text{g/ml}$ erfasst werden, wobei ein gemeinsames Hemmprofil ersichtlich wurde, das sich wie folgt darstellt:

ErbB3-Rezeptor > EGFR > ErbB2-Rezeptor.

Der ErbB3-Rezeptor, der eine elementare Rolle bei der Regulation des programmierten Zelltods, der Apoptose, über die Regulation des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges einnimmt, wurde dabei durch die Extrakte (IC_{50} -Werte: $\sim 100 \mu\text{g/ml}$) und Delphinidin ($0,1 \mu\text{M}$) am potentesten in seiner Aktivität gehemmt. Neben der gezeigten bevorzugten Hemmung der Aktivität des ErbB3-Rezeptors wurde gleichzeitig eine Verringerung des endogenen ErbB3-Rezeptorlevels durch Delphinidin in A431-Zellen ersichtlich. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Sensitivität des ErbB3-Rezeptors gegenüber polyphenolischen Verbindungen und insbesondere der Klasse der Anthocyane bzw. Anthocyanidine.

Zusätzlich wurde im zellulären System einer Schweineaorten-Endothelzelllinie (PAE) die Aktivitätshemmung des VEGFR2 und VEGFR3 mittels Immunopräzipitation und nachfolgender Immunodetektion untersucht. Dabei bedingten die anthocyanreichen Beerenextrakte und Delphinidin eine potente Hemmung des VEGFR2 mit IC_{50} -Werten von $50 \mu\text{g/ml}$ bzw. $50 \mu\text{M}$. Bei diesen Konzentrationen zeigte sich darüber hinaus eine vollständige Hemmung der Aktivität des Lymphangiogenese-regulierenden VEGFR3.

Zusammenfassend spiegeln die Untersuchungen wider, dass die anthocyanreichen Beerenextrakte und das Anthocyanidin Delphinidin als Breitbandhemmstoffe der RTK der ErbB- und VEGFR-Familie im isolierten und im zellulären System in konsumrelevanten Konzentrationen fungieren. Neben dieser Breitbandhemmung wurde für alle untersuchten Extrakte eine Präferenz in der Hemmung der Aktivität des ErbB3-Rezeptors identifiziert. Die anthocyanreichen Beerenextrakte und das Anthocyanidin Delphinidin wiesen darüber hinaus eine herausragende Wirkqualität gegenüber der Reduzierung der Aktivität des Lymphangiogenese-regulierenden VEGFR3 im zellulären System auf.

Die Wirkkonzentrationen der Beerenextrakte im zellulären System von ~ 50 µg/ml – 185 µg/ml könnten beispielsweise dabei durch den Konsum von frischen Beeren (mehrere 10 bis 100 mg Anthocyane/Verzehrportion) vor allem lokal im Darm erreicht werden, so dass ein chemopräventiver Einsatz solcher Extrakte vielversprechend scheint. Diese Hemmwirkung auf RTK scheint möglicherweise für das chemopräventive Potential anthocyanreicher Präparationen von Bedeutung sein.

-
- [1] Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 18(3), 581-592
- [2] World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Policy and Action for Cancer Prevention. Food, Nutrition, and Physical Activity: a Global Perspective Washington DC: AICR, 2009
- [3] Deutsches Weininstitut. Basisdaten zum Weinmarkt Deutschland, 2008
- [4] Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie. Homepage:
http://www.fruchtsaft.net/index.php?menu_sel=13&menu_sel2=3&menu_sel3=&menu_sel4=&msg=42
- [5] Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. (2008) Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr.* 138(3), 562-566
- [6] Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. (2006) The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta.* 1766(1), 120-139
- [7] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(5), 359-371
- [8] Wang LS, Stoner GD. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 269(2), 281-290