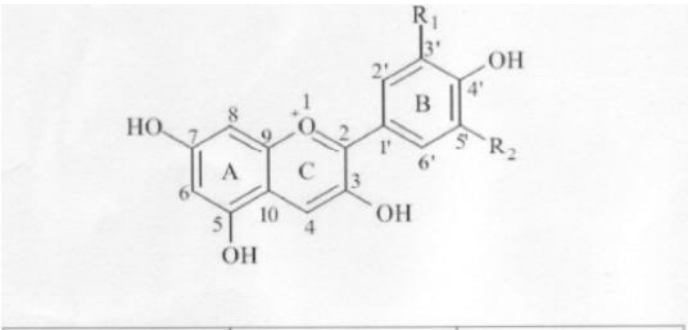
Leibniz Online 10/2011
Zeitschrift der Leibniz-Sozietät e. V.
ISSN 1863-3285
http://www.leibniz-sozietaet.de/journal/archive/10_11/Jacobasch_ua_1.pdf

G. Jacobasch, M. Florian, J. Hempel, H. Schneider

Hemmung der intestinalen Tumorentwicklung durch Cyanidin-3-O-Rutinosid

Einleitung und Zielstellung

Anthocyane sind wasserlösliche blau gefärbte sekundäre Pflanzenstoffe. Ihre Bezeichnung leitet sich von den griechischen Wörtern anthos (Blüte) und kyanos (blau) ab. Diese Verbindungen werden vorrangig in Beerenfrüchten, Blumen und einigen Gemüsearten gebildet. Über 400 Anthocyane lassen sich anhand ihrer Substituenten unterscheiden, die entweder Hydroxy- und Methylgruppen, Zucker oder organische Säuren sind, die an verschiedenen Stellen des Ringsystems gebunden werden können. Die Anzahl der Aglykone ist mit 18 verschiedenen Verbindungen wesentlich geringer. Die am häufigsten gebildeten Anthocyane sind Cyanidinverbindungen. Sie kommen besonders reichlich vor in Aronia, Holunder, Brombeeren, schwarzen Johannisbeeren, schwarzen Himbeeren, Kirschen und Rotkohl. Abb. 1 zeigt die Grundstruktur des Anthocyanidins und Beispiele für Substitutionen am C-und B-Ring des Moleküls von 6 häufigen Aglykonen. Durch die Esterbildung mit Zuckern (Glucose, Galactose, Rhamnose oder Arabinose) am C3- und/oder freien OH-Gruppen am C5, C7, C3′ und C5′ gewinnen die Verbindungen an Stabilität. Die Substitutionsmuster sind oft noch durch die Bindung mehrerer aneinander gereihter Zucker oder eine Veresterung mit verschiedenen organischen Säuren erweitert, dadurch nimmt die Stabilität der Verbindungen weiter zu. Charakteristisch für Anthocyane ist die positive Ladung in Position 1 des C-Ringes; dadurch wird das Aglykon zu einem Flavylium-Kation [1].



Name	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH_3	H
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH_3	H
Malvidin	OCH_3	OCH_3

Abb. 1 Grundstruktur der Anthocyane nach Wang und Stoner [3]

Durch den Nachweis einer Reihe gesundheitsfördernder Effekte, die überwiegend aus *In-vitro*-Experimenten abgeleitet wurden, nahm das Interesse an dieser Stoffklasse im letzten Jahrzehnt stark zu [2]. Die publizierten Befunde vieler Arbeiten beziehen sich auf Experimente mit Zellkulturen, bei denen Konzentrationen von Anthocyanen eingesetzt wurden, die z. T. um mehrere Größenordnungen höher waren als die, die *in vivo* erreichbar sind, was eine Übertragung der Ergebnisse auf *In-vivo*-Bedingungen einschränkt. Sie bildeten aber die Grundlage für das über viele Jahrzehnte vertretene Konzept der antioxidativen Effekte dieser Stoffklasse [3]. Um die Ergebnisse von *In-vivo*-Studien richtig einschätzen zu können, ist die Kenntnis der Stabilität von Anthocyanen im Gastrointestinaltrakt, ihre Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit im Organismus sowie der Umsatz von Anthocyanen durch die intestinale Mikrobiota und die dabei gebildeten Metaboliten erforderlich.

Die Struktur der Anthocyane hängt in wässrigen Lösungen entscheidend vom pH- Wert ab (Abb. 2). Während im sauren Milieu (pH <2) eine rot gefärbte Flavyliumstruktur vorliegt, tritt

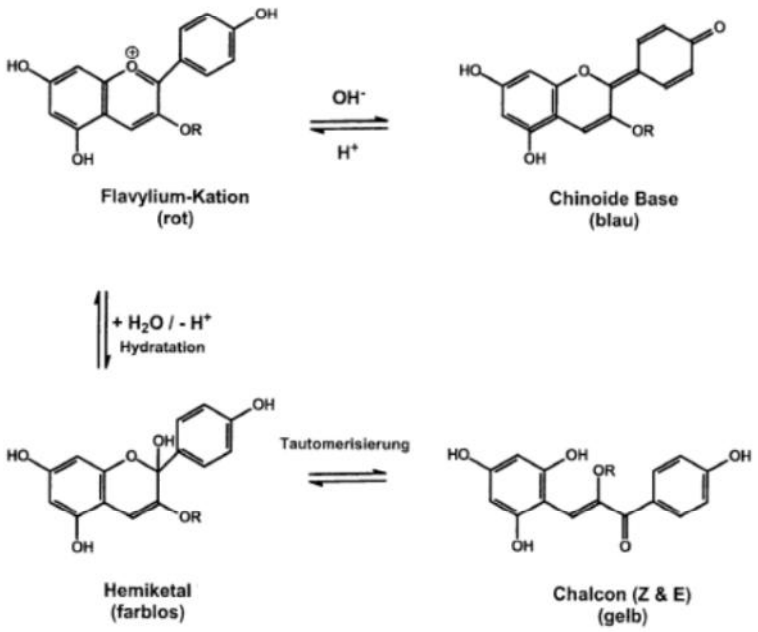


Abb. 2 Einfluss des pH-Wertes auf die Struktur und Färbung der Anthocyane nach Prior und Wu [2]

bei höheren pH-Werten eine blaue chinoide Basenform auf. Durch Hydratation kann das farblose Hemiketal gebildet werden, aus dem durch Tautomerisierung eine Öffnung des C-Ringes erfolgt, wodurch ein gelb gefärbtes Chalcon entsteht [1, 4].Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Stabilität von Aglykonen der Anthocyane geringer als die der anderen Flavonoide ist. Die genannten Faktoren entscheiden unter *In-vivo*-Bedingungen darüber, welcher Anteil der aufgenommenen Menge an Antocyanen bereits im Gastrointestinaltrakt instabil und damit unwirksam wird, welcher unresorbiert das Kolon erreicht, dort mikrobiell abgebaut und verwertet wird oder nach der Resorption über den Blutkreislauf von den Gewebszellen aufgenommen und systemisch wirkt.

Es ist nicht überraschend, dass die in der Literatur zu findenden Angaben von Anthocyankonzentrationen im Blutplasma stark variieren. Sie liegen im Bereich von 1 bis 100 nmol/L [2, 4, 5]. Realistisch sind Spiegel von 1-2 nmol/L. Die höchsten zellulären Konzentra-

tionen wurden in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Niere und in Zellen verschiedener Gehirnregionen festgestellt [5, 6, 7]. Die Ausscheidung von resorbierten Anthocyanen erfolgt in Form von glucuronidierten, methylierten, selten sulfatierten Metaboliten über die Niere mit dem Harn. Darüber hinaus gelangen Anthocyane und ihre Metabolite aus der Leber auch in den enterohepatischen Kreislauf und kommen damit wieder in Kontakt mit der intestinalen Mikrobiota.

Maximale Konzentrationen von Anthocyanen werden im Plasma 2 bis 3 Stunden nach ihrer oralen Aufnahme erreicht, die Halbwertszeit beträgt 1,5 bis 3 Stunden und die Wiederfindungsrate ist mit etwa 1 % sehr gering [8]. Die Resorption von Anthocyanen erfolgt schneller als die von Flavonolen. Sie beginnt im Magen, erreicht im Dünndarm ihr Maximum, ist aber auch noch im Kolon nachweisbar [9]. Anthocyane können aktiv als Glucoside oder nach einer Hydrolyse der β-glykosidischen Bindung und nachfolgender Glucuronidierung der Aglykone aufgenommen werden [10]. Eine rasche Resorption ist von Cyanidin-3-Glucosid und Cyanidin-3,5-diglucosid bekannt. Beide Verbindungen wurden in geringen Konzentrationen im Blutplasma nachgewiesen [5, 8, 11]. Es ist möglich, dass diese Cyanidinglucoside auch direkt über die Pfortader aufgenommen werden. Generell existieren zwei Resorptionsmechanismen:

1. Transport von Anthocyanglucosiden mit Hilfe eines Natrium-Glucose-Cotransporters in die Epithelzellen der Schleimhaut, wo sie durch zytosolische β-Glucosidasen hydrolysiert werden und anschließend glucuronidiert in den Blutkreislauf gelangen [11, 12]. Aglykone treten im Blutplasma nicht auf. Die Glucuronidierung wird durch UDP-Glucuronyltransferasen katalysiert. Diese Enzyme sind nicht nur in Enterozyten sondern auch in hoher Aktivität in Leber- und Nierenzellen vorhanden. Die in der Niere gebildeten Produkte werden direkt mit dem Harn ausgeschieden.
2. Hydrolyse von Anthocyanglycosiden durch eine Laktat Phlorizin Hydrolase, die in der Bürstensaummembran lokalisiert ist [13]. Die dabei freigesetzten Aglykone werden entweder im Darmlumen weiter abgebaut oder diffundieren in Enterozyten, von wo sie nach Glucuronidierung über die basolaterale Membran in die serologische Flüssigkeit gelangen. Bei einer Zufuhr von größeren Mengen an Anthocyanen, werden die freigesetzten Aglykone durch Methyltransferasen unter Nutzung von S-Methylmethionin als Cofaktor methyliert [8, 14, 15]. Über diesen Mechanismus schützt sich der Organismus vor einer zu hohen oxidativen Belastung. Methylierte Cyanidine treten auch in der Leber und in der Niere, nicht aber im Blutplasma auf [10].

Im Kolon werden Anthocyanverbindungen sehr schnell durch bakterielle β-D-Glucuronidasen oder β-D-Glucosidasen wieder dekonjugiert. Danach wird der C-Ring der Aglykone gespalten und zu Aldehyden und Phenolsäuren abgebaut. Diese werden entweder mit den Faeces ausgeschieden oder auch resorbiert und somit im Blutplasma nachweisbar. [16] (Abb. 3). Das am häufigsten gebildete Abbauprodukt ist die 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Diese Phenolsäure erreicht bereits 2 Stunden nach einer oralen Aufnahme von Anthocyanen maximale Werte im Kolon und im Blutplasma.

Das Ziel dieser Arbeit war es, an einem *In-vivo*-Modell die antikarzinogene Wirkung von Cyanidin-3-O-Rutinosid zu überprüfen und den dadurch zu erreichenden Effekt mit dem des Cyclooxygenaseinhibitors Sulindac und dem des Flavonols Quercetin zu vergleichen. Außerdem wurde versucht, die Abbauprodukte, die durch die intestinale Mikrobiota aus diesem Anthocyan gebildet werden, zu analysieren.

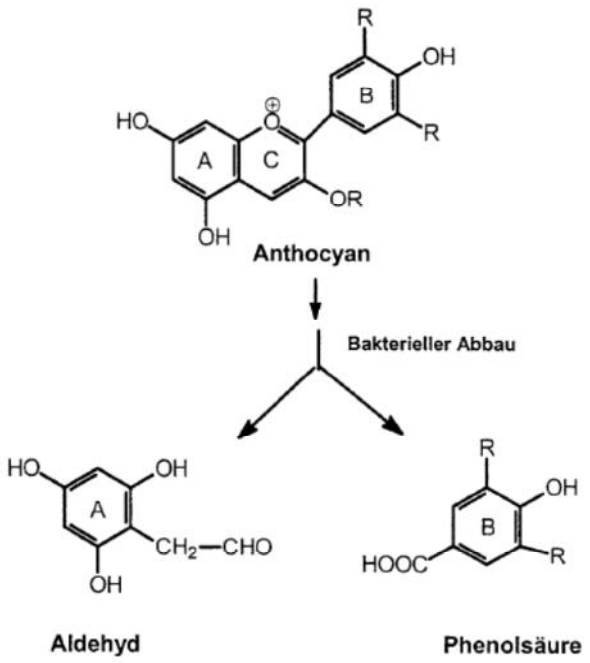


Abb. 3 Abbau der Anthocyane durch die intestinale Mikrobiota

Tiermodell

Als Tiermodell wurde die apc-Gen defekte Min^+/-Maus gewählt (C57BL67-Min^+/- Maus). Es ist ein klinisch relevantes Modell, dem ein hereditärer Defekt zugrunde liegt, der zur Entwicklung einer intestinalen Polyposis führt. Der apc-Gendefekt wurde durch eine Behandlung von männlichen Tieren C57BL/6JL (B6) mit Ethylnitroharnstoff erzeugt und durch Züchtung in die Keimbahn übertagen [17]. Es handelt sich um eine Punktmutation des murinen apc-Gens im Chromosom 1. Durch den erfolgten Basenaustausch im Codon 850 wird nicht mehr die Aminosäure Leuzin in die Polypeptidkette eingebaut sondern, da ein Stoppcodon entstanden ist, die Proteinsynthese an dieser Stelle abgebrochen. Die daraus resultierende Verkürzung umfasst fast zwei Drittel des APC-Proteins. Damit ist ein Verlust von mehreren funktionalen Domänen verbunden, die normalerweise Wechselwirkungen mit mehreren Proteinen eingehen, und dadurch Einfluss auf die chromosomale Stabilität, die Kontrolle des Zellzyklus, die Zelladhäsion u. a. Prozesse nehmen. Die apc-Gene von Maus und Mensch verfügen beide über 15 Exons und stimmen in der Aminosäuresequenz der APC-Proteine zu 92% überein [18]. Das APC-Protein ist eine Schlüsselverbindung im WNT-Signalweg. Heterozygote Min^+/-Mäuse entwickeln eine Polyposis mit mehr als 60 – 70 Adenomen, die aber, im Gegensatz zum Krankheitsbild beim Menschen, überwiegend im Dünndarm und nicht im Kolon lokalisiert sind. Im Dickdarm entstehen meistens nicht mehr als 2 Adenome (Abb. 4). Oft sind die Polypen gestielt wie in Abb. 4 dargestellt. Die Lebenserwartung der Min^+/-Mäuse beträgt maximal 120 Tage. Die ersten Symptome werden 5-6 Wochen nach der Geburt manifest. Die Min-Mäuse bleiben im Vergleich zu gesunden Tieren im Wachstum und im Gewicht deutlich zurück. Nicht alle Adenome entarten gleichzeitig, aber mit ihrer Anzahl erhöht sich das Risiko für die Herausbildung eines Karzinoms. Mit der Entdifferenzierung der zunächst kleinen

Adenome geht eine stärker werdende Blutung einher, die den Darminhalt dunkel färbt. Die Folge der Blutungen ist eine Verringerung des Hämatokritwertes und eine kompensatorische Zunahme an jungen erythroiden Zellen im Blut. Auch die Milzgewichte nehmen signifikant zu.

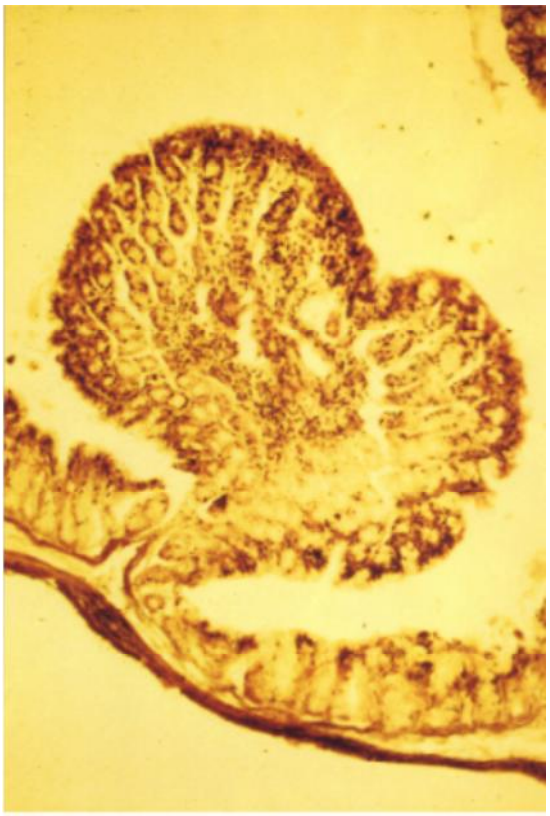


Abb. 4 Gestielter Darmpolyp der Min+/-Maus (Längsschnitt, HE-Färbung)

Das APC-Protein steht am Anfang einer Tumorkaskade, in der durch eine bevorzugte Zellteilung von Zellklonen mit mehreren mutierten Tumorgenen die Akkumulation von Mutationen rasch ansteigt. Da die Polyposis im Gegensatz zur FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) des Menschen bei den Min^{+}/-Mäusen vom Kolon in den Dünndarm verlagert ist, bietet dieses Modell die Möglichkeit, die antikarzinogene Wirkung von Anthocyanen weitgehend ohne Beeinflussung durch die intestinale Mikrobiota zu untersuchen.

Studiendesign und Methoden

Die Experimente wurden mit 5 Wochen alten Tieren gestartet. 20 Min^{+}/-Mäuse erhielten eine semisynthetische Standardkost; bei 8 Min^{+}/-Mäusen war sie zusätzlich mit Cyanidin-3-O-Rutinosid Chlorid (Keracyaninchlorid) angereichert. 180 mg (0,285 mmol) wurden für die Herstellung von 1 kg Futter verwendet, davon ließen sich in den fertigen Pellets nur noch 14,25mg (0,022mmol) wiederfinden, was die erwähnte Instabilität der Anthocyane unterstreicht. Bei 8 Min^{+}/-Mäusen war die Diät durch 14 Mikrogramm Quercetin ergänzt und bei weiteren 8 Min+/-Mäusen war dem Trinkwasser Sulindac in einer Dosierung von 270 mg/L zugesetzt.

Nach 65 Versuchstagen wurden die Mäuse getötet, die intestinalen Polypen gezählt und ihr Entdifferenzierungsgrad histologisch ermittelt. In einem weiteren Testansatz wurde die Meta-

bolisierung des Anthocyans durch die intestinale Mikrobiota geprüft. Dazu wurde eine frisch gewonnene Faecesprobe von einer gesunden männlichen Person verwendet, die eine normale Diät konsumierte. Diese wurde in einem Fermentationsmedium in Hungate-Gefäßen suspendiert, die bis zu 8 Stunden bei pH 7,2-7,5 bei 37 °C in einer anaeroben Arbeitsstation ($N_2/CO_2/H_2$ = 90:10:10) inkubiert wurden. Die Kontrollprobe enthielt keinen Zusatz von Anthocyanen, die Testprobe dagegen 4,1mg Keracyaninchlorid pro 100 mg Faeces. Nach 0 und 8 Stunden wurden Aliquots aus dem Inkubat entnommen, mit H_2/CO_2 (80:20, v/v) begast und sofort bei –20 °C eingefroren. Zur Analyse der Abbauprodukte des Anthocyans wurden die Proben in handwarmen Wasser aufgetaut, zentrifugiert, mit Ameisensäure versetzt und eine Filtration über PTFE vorgenommen. Die Anthocyanprodukte wurden auf einer C-18 Lichrospher Säule durch HPLC bei 20 °C unter Verwendung eines Acetonnitrilgradienten (von 10 bis 60 %) in 0,5 % Ameisensäure getrennt und mit einem Dioden-array Detektor identifiziert .

Ergebnisse und Diskussion

Auf Grund des relativ niedrigen Anthocyangehaltes im Futter stieg der Spiegel von Anthocyanglucuroniden im Blutplasma nur leicht an. Trotzdem war ein signifikanter antikarzinogener Effekt nachweisbar. Die Anzahl der Polypen war bei den Min^+/-Mäusen, deren Futter Anthocyan enthielt, um nahezu 70 % geringer als bei denen, die nur mit Standardfutter ernährt wurden (Tab. 1). Die Anzahl der Polypen nahm nur im Dünndarm und nicht im Kolon ab. Histologisch waren alle Polypen, die bei den Anthocyan-Mäusen zu finden waren, Adenome. Bei den Min^+/-Mäusen, deren Futter kein Anthocyan enthielt, wurden dagegen außer Adenomen 3 bis 5 Karzinome pro Tier identifiziert. Kein einziges Adenom war aber sowohl im Dünndarm als auch im Kolon von Min^+/-Mäusen festzustellen, die Sulindac mit dem Trinkwasser aufnahmen. Durch Quercetin wurde im Min^+/-Maus-Modell die Karzinogene noch effektiver als durch Cyanidin-3-O-Rutinosid gehemmt, allerdings in höheren Konzentrationen [19]. Diese Befunde unterstützen die Schlussfolgerung, dass die Unterdrückung der intestinalen Tumorentwicklung durch Flavonoide, wenn bereits eine Mutation im apc-Gen vorliegt, nur noch über systemische Effekte zu erreichen ist.

Tab.1 **Einfluss von Keracyaninchlorid, Quercetin und Sulindac auf die intestinale Polyposis von Min+/-Mäusen nach 70 Versuchstagen**

Anzahl der Polypen											
Standarddiät			Standarddiät + Keracyaninchlorid			Standarddiät + Quercetin			Standarddiät + Sulindac		
Mw	SD	n	Mw	SD	n	Mw	SD	n	Mw	SD	n
71	28	20	24	9	8	8	4,2	8	0	-	8

Werte sind Mittelwerte ± SD; n = 8 bzw. 20

Über 70 % aller sporadischen kolorektalen Karzinome des Menschen weisen eine Mutation im apc-Gen auf. Für den Stoffwechsel und die Differenzierung der Kolonepithelzellen ist die Resorption von Butyrat, einem Endprodukt der mikrobiellen Fermentation, essentiell. Der dafür verantwortliche Natrium-abhängige Monocarboxylattransporter-1 wird jedoch bereits

im Frühstadium der Entdifferenzierung, noch vor dem Auftreten von Mutationen im apc-Gen, inaktiviert. Ist dieses Ereignis eingetreten, ist eine Unterdrückung der Karzinogenese durch Flavonoide im Kolon nicht mehr möglich. Präventiv schützen Flavonoide jedoch auch die Epithelzellen der Dickdarmschleimhaut vor einer Entdifferenzierung. So konnte z.B. mit dem Azoxymethan- (AOM) Modell bei F344 Ratten gezeigt werden, dass durch eine 33-wöchige Zufuhr einer Diät, die 2.5, 5 oder 10 % lyophilisierte schwarze Himbeeren (Rubus occidentalis) enthielt, die Anzahl an Polypen konzentrationsabhängig um 42, 45 und 71 % gesenkt und die Bildung von Adenokarzinome um 28, 35 und 80 % unterdrückt werden konnte [20]. Auch die Anzahl der aberranten crypt foci (ACF) nahm in Abhängigkeit von der aufgenommenen Beerenmenge um 36, 24 bzw. 21 % ab. Eine weitere Studie wurde mit dem Dimethylhydrazin- (DMH) Modell mit F344 Ratten durchgeführt [21]. Hierbei wurden Anthocyane in Form von blauem Mais (5 % in der Diät) verwendet; 73 % der Flavonoide entfielen hierbei auf 8 verschiedene Cyanidinderivate. Auch sie bewirkten eine weitgehende Unterdrückung der kolorektalen Karzinogenese.

Diese Befunde unterstreichen, dass sowohl Flavonole als auch Anthocyane für eine Chemoprävention der intestinalen Karzinogenese geeignet sind. Die Wasserlöslichkeit der Anthocyane erleichtert ihren Einsatz. Wegen der hohen Instabilität sollten aber möglichst nur frisch geerntete Beeren oder frisch hergestellte Säfte vor einer Mahlzeit aufgenommen werden, um die für eine antikarzinogene Wirkung notwendige Konzentration an Anthocyanen im Blutplasma zu erreichen.

Wodurch lässt sich die antikarzinogene Wirkung von Anthocyanen erklären? Weitgehend auszuschließen ist die häufig diskutierte antioxidative Wirkung von Anthocyanen, denn 1. ist dafür die Konzentration im Blutplasma viel zu gering und 2. üben die vorwiegend im Plasma auftretenden Glucuronide der Anthocyane keine antioxidativen Effekte aus.

Rolle der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in der Karzinogenese

Ein frühes Ereignis in der intestinalen Karzinogenese ist die Hochregulation der COX-2 (Abb. 5). Während die COX-1 konstitutiv ist, wird die Expression der COX-2 nur bei einer Aktivierung des NF-κB-Weges induziert. Die COX-Isoenzyme kontrollieren die Umsetzung der ungesättigten Arachidonsäure zu Prostanoiden, die als Signalmoleküle in viele Stoffwechselwege eingreifen.

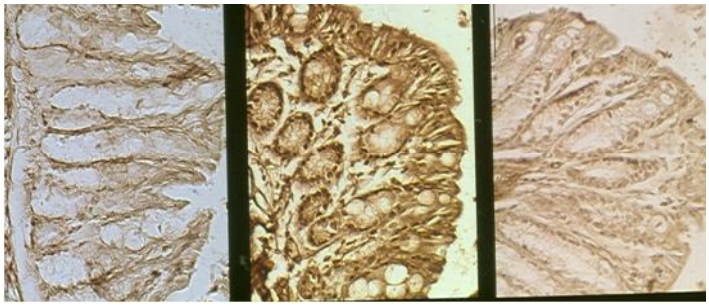


Abb. 5 Histochemischer Nachweis der COX-2 anhand der Immunreaktivität (POD/DAB).
Von links nach rechts: gesunde Balb c-Maus, Min+/-Maus, Min+/-Maus plus Sulindac

Sulindac, zählt zur Gruppe der nichtsteroidalen antiinflammatorischen Verbindungen (NSAID). Es unterdrückt nicht nur die Expression der COX-2 (Ptgs2-Gen) sondern hemmt auch vollständig die Entwicklung der Polyposis bei Min^{+}/-Mäusen (Tab. 1). Sulindac hat gegenüber wesentlich spezifischeren COX-2-Inhibitoren den Vorteil, dass seine Anwendung nicht mit kardiovaskulären Nebenwirkungen einhergeht. Sulindac wird deshalb auch weiter-

hin in der Therapie bei FAP-Patienten eingesetzt. Einen weiteren experimentellen Beleg für eine Schlüsselfunktion der COX-2 bei Entdifferenzierungsprozessen lieferten Studien, bei denen Apc Δ716 Mäuse mit Tieren gekreuzt wurden, die kein funktionelles Ptgs2-Gen hatten. Die Nachkommen dieser Tiere entwickelten wesentlich weniger und kleinere Polypen als die Apc Δ716 Mäuse. Auch eine Ausschaltung des Prostaglandinrezeptors EP2 senkte die Anzahl der Polypen [22]. Anthocyane können ebenso wie Quercetin die Induktion der COX-2 über verschiedene Wege verhindern. Gehemmt wird:

1. konzentrationsabhängig die Bildung von Entzündungsmediatoren, vor allem die des Tumornekrosefaktor α (TNFα) und die von Interleukin-1α (IL-1α) [23]. Dadurch wird der NF-κB-Weg gedrosselt und gleichzeitig die Bildung antiinflammatorischer Cytokine stimuliert.
2. Mit der Unterdrückung der Bildung von IL-1α entfällt dessen Stabilisierungseffekt auf die COX-2 mRNA, der auch durch das onkogene ras-Protein zustande kommen kann [24]. Diese Stabilisierung erfolgt über eine konservierte 116 Nukleotide umfassende AU-reiche Region (**A**U-**R**ich **E**lement = ARE), die in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der COX-2 mRNA lokalisiert ist.
3. Ein weiterer Angriffspunkt liegt bei den Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren, die ebenfalls über den NF-κB-Weg eine Expression der COX-2 bewirken [25]. Flavonoide beeinflussen direkt die Funktion der NF-κB-Proteine. Diese verfügen über eine zu einem Protoonkogen homologe Domäne mit einer Sequenz für ihre Kernlokalisation. Sie wird zu Beginn der Karzinogenese aktiviert und führt über die Erhöhung der NF-κB-Konzentration zur COX-2-Expression.
4. In Wechselwirkung mit dem NF-κB-Weg steht auch die Signalkaskade der AKT (Serin-Threonin-Proteinkinase B) und ERK (**E**xtrazellular **R**egulierte Mitogen Aktivierte Protein-**K**inase). Die Gene der AKT-Gruppe weisen eine Homologie zu einem viralen Onkogen auf, die zum Tragen kommt, wenn AKT die IκB-Kinase aktiviert [26]. Der Hemmfaktor IκB wird dann verstärkt phosphoryliert und kann somit durch das Proteasom abgebaut werden. Das hat zur Folge, dass der nun freigesetzte Transkriptionsfaktor NFκB in den Zellkern translozieren kann, dort an spezifische Motive von Zielgenen bindet, zu denen auch das Ptgs2-Gen zählt und damit die COX-2 hochreguliert wird. Anthocyane und Quercetin bewirken eine Hemmung der AKT- und ERK-Phosphorylierung. Dadurch wird nicht nur die Expression der COX-2 verhindert, sondern es werden auch die pathologisch gesteigerte Zellteilung und das Zellwachstum unterdrückt und die Aktivierung von Caspasen, die die Apoptose einleiten können, bleibt erhalten.

Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose

Flavonoide greifen auch in die Wechselwirkung der AKT mit dem WNT-Signalweg ein. Hier hemmt AKT die Phosphorylierung von β-Catenin, wodurch dieses zytosolische Protein nicht proteolytisch abgebaut werden kann und deshalb verstärkt in den Zellkern transportiert wird. Dadurch wird die Expression von Genen, die die Tumorbildung steigern, vorangetrieben. Unter diesen Bedingungen wird das Tumorwachstum außerdem durch Wachstumsfaktoren und das ras-Onkogen, die den PI3K/AKT-Signalweg aktivieren, verstärkt [27].

1. AKT beeinflusst auch die Kontrolle des Zellzyklus. Es aktiviert durch Phosphorylierung das Protoonkogen Mdm2 (**M**urine **d**ouble **m**inute Chromosom **2**). Dadurch werden die Kontrollfunktionen des p53 Proteins auf den Ablauf des Zellzyklus eingeschränkt
2. AKT hemmt außerdem Cyclin D 1. Dadurch wird der Kontrollmechanismus beim Übergang von der G_1- in die S-Phase aufgehoben und die Zellteilung beschleunigt.

Anthocyane können die Störung im Ablauf des Zellzyklus abschwächen, indem sie die Expression von p21WAF induzieren. Dieses Protein ist ein Inhibitor von Cyclin-CK-Komplexen und kann einen Stopp in der G1-Phase herbeiführen.

Charakteristisch in der Tumorentwicklung ist die Hemmung der Apoptose, die zu Wachstumsvorteilen bei Zellklonen mit Mutationen in Tumorgenen führt; denn sie werden nicht mehr durch die Apoptose eliminiert. Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen an Kolonschnitten von Min+/-Mäusen zeigen, dass die Apoptose im Verlaufe der Karzinogenese stark gehemmt wird und dieser Effekt durch Sulindac und Flavonoide verhindert werden kann (Abb. 6).

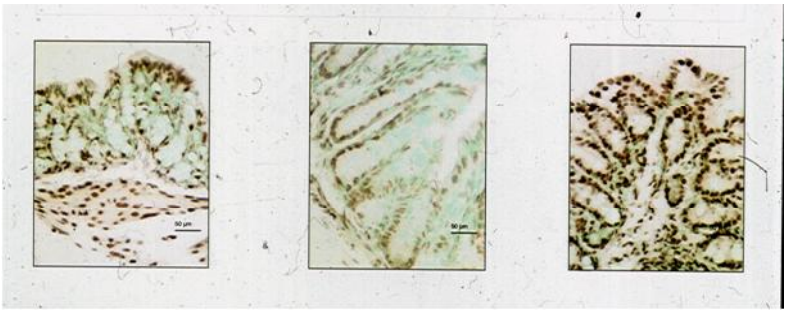


Abb. 6 Immunhistochemische Darstellung der Apoptoseintensität in Kolonschnitten (Klenow-Technik)
Von links nach rechts: gesunde Balbc-Maus, Min+/-Maus, Min+/-Maus plus Sulindac

Eine Apoptose kann über intrinsische (mitochondrial) und extrinsiche (FAS-Rezeptor, CD95, TNF-Rezeptor) Wege ausgelöst werden. Signale zur Initiierung der Apoptose können von unterschiedlichen Ereignissen ausgehen, ebenso ihre Hemmung. Ursachen für eine Verminderung der Apoptose in Tumorzellen können sein [27]:

1. ein Ausfall des TNF-Rezeptors, der für die Weiterleitung von Apoptosesignalen verantwortlich ist
2. eine verstärkte Expression von antiapoptotischen Genen durch Aktivierung des NF-κB-Weges
3. Tp53 Mutationen im fortgeschrittenen Tumorstadien, wodurch die Apoptosestimulation durch BCl-2 entfällt. Das Protoonkogen kann aber auch unabhängig von p53 durch miRNA gehemmt werden. Gegenspieler von BCl-2 ist das BAX-Protein. Seine Transkription wird durch den p53-Widtyp aktiviert, was zur Aufhebung der apoptotischen Wirkung von BCl-2 führt. Mutiertes p53 kann dagegen die Transkription von BAX nicht mehr realisieren. In beiden Fällen hat das zur Folge, dass eine Öffnung von Mitochondrienkanälen nicht mehr zustande kommt und damit der intrinsische Apoptoseweg ausgeschaltet wird. Bei einer Aktivierung des Signalweges der MAPK wird dagegen die Expression der Caspase 8 verhindert, über die eine Apoptose extrinsisch initiiert werden kann.

Anthocyane erhöhen in Tumorzellen das mitochondriale Membranpotential und induzieren die proapoptotischen BCL-2-Proteine BAX und BAD. Diese sind für die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran verantwortlich, durch die dann Cytochrom C ins Zytosol übertritt und eine intrazelluläre Proteolysekaskade in Gang setzt. Durch eine Phosphorylierung kann dabei die Caspase 9 aktiviert werden, die wiederum weitere Effektorcaspasen zur Einleitung der Apoptose aktiviert. Anthocyane können aber auch den extrinsischen Apoptoseweg erhöhen, indem sie die Expression von FAS und Fas-Ligand steigern. Durch die Bindung des Liganden an den Fas-Rezeptor kommt es zur Anlagerung eines Adaptermoleküls. An diesen Komplex bindet dann die Initiatorcaspase 8 und kann dadurch proteolytisch aktiviert werden und anschließend weitere Effektorcaspasen zur Einleitung der Apoptose in Gang setzen. Es ist zu vermuten, dass diese protektiven Effekte der Anthocyane vorrangig durch eine Blockierung des NF-κB-Weges sowie der AKT zustande kommen.

Angiogenese

Eine weitere Voraussetzung für das Wachstum von Tumorzellen ist die Aufrechterhaltung der erforderlichen Sauerstoffzufuhr. Das geschieht zum einen durch die Wanderung von Karzinomzellen in Randgebiete des Tumors oder ein verstärktes invasives Wachstum und zum anderen durch die Entwicklung neuer Blutgefäße. Erreicht die Sauerstoffversorgung kritische Werte (einen O_2-Partialdruck <40mmHg) nimmt die Aktivität von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) zu. Das sind basische Transkriptionsfaktoren, die an Promotoren von Zielgenen binden, die Hypoxie-regulierte Elemente (HREs) enthalten [28]. Diese Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer β-Untereinheit, an die je eine der 3 α-Untereinheiten bindet. Dadurch bilden sich die Dimere HIF-1α, HIF-2α und HIF-3α. Entscheidend für die HIF-Aktivität ist jeweils die α-Untereinheit. Bei einem hohen Sauerstoffangebot wird sie abgebaut, bei O_2-Mangel bleibt sie dagegen stabil und aktiv. Die Kontrolle erfolgt über Sauerstoffsensoren. Diese Funktion wird von Dioxygenasen ausgeübt. Dazu zählen

1. die Prolyl-Hydroxylasen (PHDs). Bei ausreichender Sauerstoffversorgung hydroxylieren sie in der HIF-1α-Untereinheit zwei Prolinreste. Dadurch wird der HIF-Faktor von einem Tumorsuppressorprotein erkannt und an ihn gebunden; in dieser Form kann er ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden.
2. Außerdem reguliert eine Asparagin-Hydroxylase die Aktivität der HIF-Untereinheit. Sie wird als HIF-1 inhibierender Faktor (FIH) bezeichnet. Dieses Enzym hydroxyliert einen Asparaginrest in einer Transaktivierungsdomäne von HIF-1α, die sich am C-Terminus befindet. In Tumoren, ebenso in gesunden Geweben nimmt bei unzureichender Sauerstoffzufuhr die Hydroxylierung von HIF-1α wieder ab, der Faktor wird dadurch stabilisiert und die HREs werden aktiviert [29]. Daraus resultiert eine Akkumulation und Dimerisierung von HIF-1β, was zu einer transkriptionalen Aktivierung von Zielgenen führt. Dabei können auch Wechselwirkungen mit Genen auftreten, deren Expression Voraussetzungen für ein progressives und invasives Tumorwachstum schaffen. Dazu zählen u. a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Faktoren für eine Zunahme der Erythropoese, Proteine für die extrazelluläre Matrix, die Proliferation und den Zellzyklus sowie Schlüsselenzyme für den Kohlenhydratstoffwechsel.

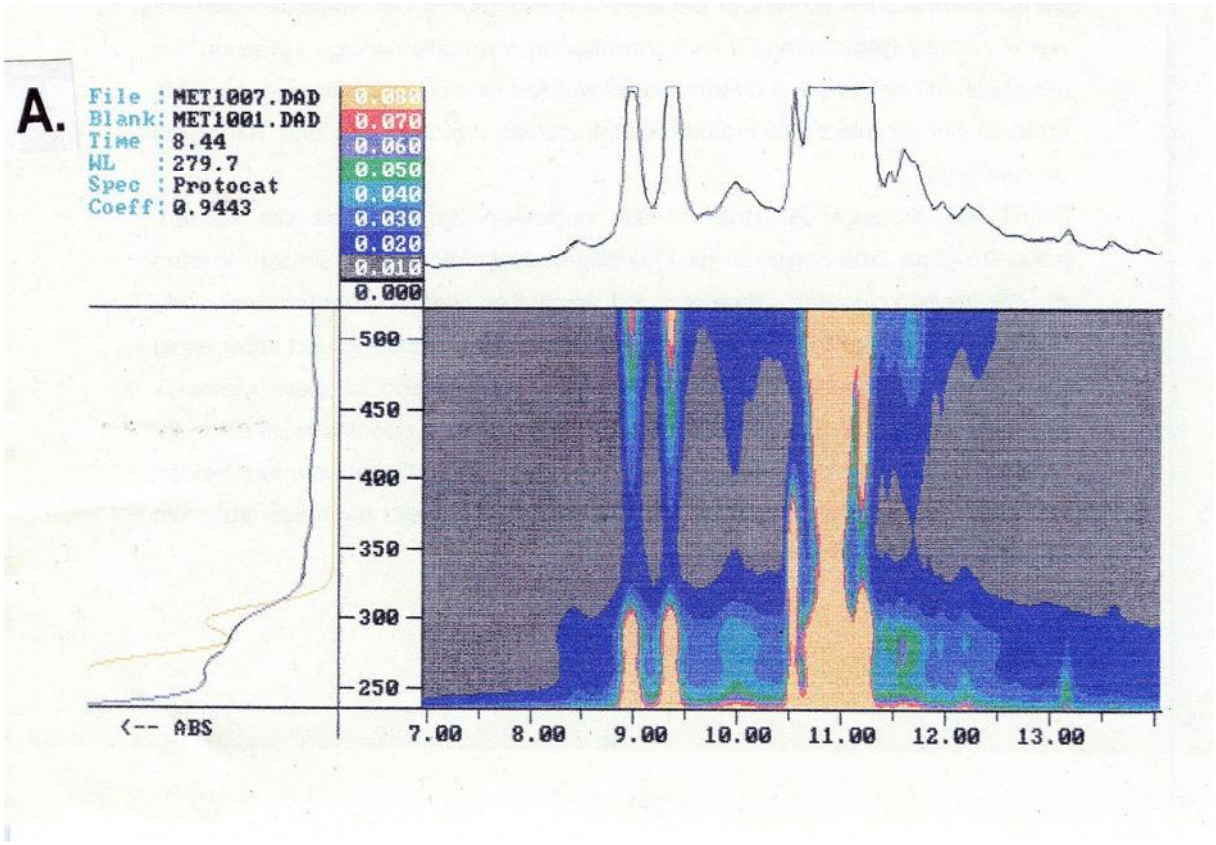
Können Flavonoide auch Mechanismen beeinflussen, die durch HIFs gesteuert werden? Ergebnisse liegen dazu bisher nur aus Untersuchungen mit Zellkulturen (z.B. HepG2 Zellen) vor. Sie wurden ausschließlich mit sehr hohen Quercetinkonzentrationen von 100 µM durchgeführt, die im Blutplasma nie erreicht werden [29]. Da jedoch das Aglykon Quercetin im neutralen pH-Bereich recht instabil ist und die Versuche sich über mehrere Stunden erstreckten, ist die aktuelle Quercetinkonzentration während der Versuchsdauer schwer einschätzbar. Aus den Ergebnissen dieser Studien wurde abgeleitet, dass Quercetin

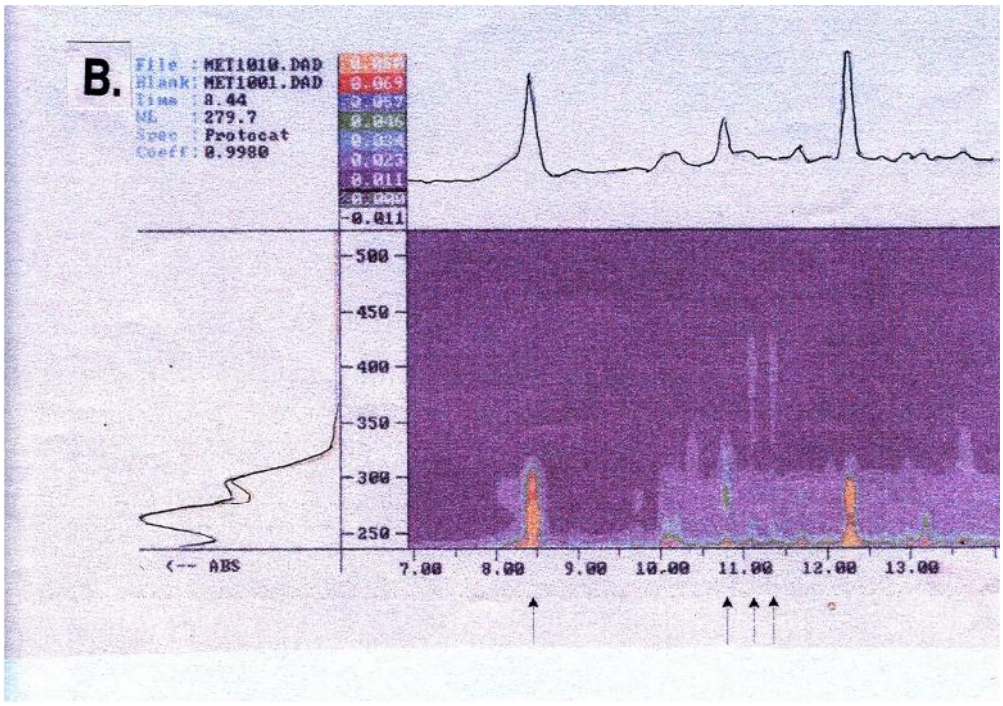
1. die Stabilität von HIF-1α durch Hemmung der Prolinhydroxylasen erhöht
2. die HIF-1-Aktivität hemmt durch Blockierung der MAPK-abhängigen Phosphorylierung von HIF-1α und die Akkumulation dieses Transkriptionsfaktors im Zellkern verringert
3. sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie die Zellzyklusprogression hemmt über eine HIF-1-abhängige Induktion des Cyklin abhängigen Inhibitors p2 1 WAF.

Aus den Befunden vergleichender Studien mit verschiedenen Flavoniden, außer Anthocyanen, wurde abgeleitet, dass die aufgezeigten positiven Effekte nur durch Quercetin bewirkt werden, da sie die Gegenwart von Hydroxylgruppen in der 3'- und 4'-Position im B-Ring erfordern [29]. Diese Bedingung würde aber auch Cyanidin erfüllen. Es ist deshalb zu vermuten, dass Cyanidin die gleichen positiven Effekte auf die Angiogenese ausüben kann wie Quercetin.

Intestinale Mikrobiota

Die bisher aufgezeigten antikarzinogenen Effekte kamen ausschließlich durch systemische Wirkungen von Flavonoiden nach ihrer Resorption zustande. Sie sind von solchen zu trennen, die auf die hohe Aktivität der intestinalen Mikrobiota zum Abbau von Anthocyanen zurückzuführen sind. Vergleiche der UV/VIS-Spektren von Proben, Kontrollen und Blindwerten zeigten, dass Keracyaninchlorid vollständig durch die intestinalen Bakterien unter anaeroben Bedingungen innerhalb von 8 Stunden abgebaut wird (Abb. 7). Die Abb. 7 A, B, C veranschaulichen den Abbau von Keracyaninchlorid durch Faeces des Menschen zum Zeitpunkt 0 (A) und nach 8 Stunden (B) sowie in zweifach autoklaviertem Faeces nach 8 Stunden (C). Die Ergebnisse sind dargestellt als Chromatogramm bei 279,7 nm und als Konturdiagramm von 240 bis 520 nm zwischen 7 bis 14 Minuten. Die Pfeile zeigen die Positionen der Abbauprodukte von Keracyaninchlorid an. Es wurden 4 Metabolite gefunden. Ein Metabolit hatte ein Absorptionsmaximum bei 260 und 294 nm, ein 2. Metabolit wies ein Maximum bei 281 nm auf. Die Metabolite 3 und 4 hatten ein Absorptionsmaximum bei 400 nm. Aus einem Vergleich mit Retentionszeiten und UV/VIS Spektren von mehreren verwendeten Standards konnte abgeleitet werden, dass das Hauptprodukt des mikrobiellen Abbaus bei 8,44 Minuten 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DBA) ist (Abb.7B). Die 3 übrigen Produkte konnten ohne Massenspektrometrie nicht identifiziert werden.





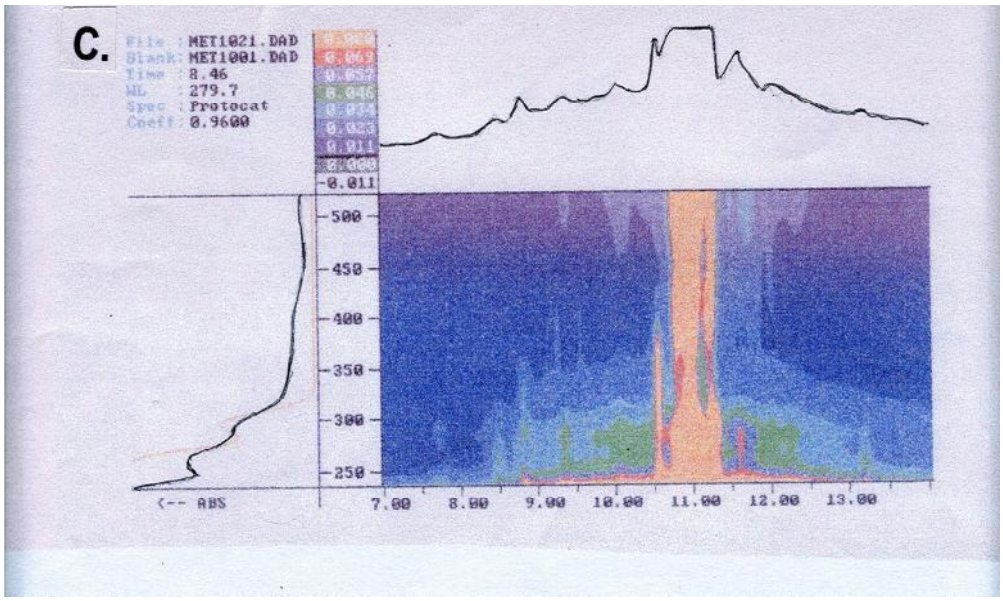


Abb. 7 UV/VIS Spektren und Konturdiagramme des mikrobiellen Abbaus von Keracyaninchlorid durch die intestinale Mikrobiota des Menschen

A: Oben: Inkubation der frischen Faecessuspension zum Zeitpunkt 0

B: Mitte: Inkubat der Faecessuspension nach 8 Stunden. Die Pfeile weisen auf die Positionen der Abbauprodukte des Keracyanins hin

C: Unten: Inkubat mit autoklavierter humaner Faecesprobe

Neuere HPLC/MS/MS-Befunde anderer Arbeitsgruppen ergaben eindeutig, dass 3.4-DBA das hauptsächliche Endprodukt beim mikrobiellen Abbau von Anthocyanen ist [30]. Auf diese durch die intestinale Mikrobiota gebildete Phenolsäure entfallen >70 % der oral aufgenommenen Menge an Anthocyanen. Sie wird nicht nur mit den Faeces (Konzentration etwa

2nmol/g) ausgeschieden, sondern kann auch bereits im Dünndarm und im Kolon resorbiert werden, wodurch eine relativ hohe Konzentration im Blutplasma erreicht wird. Sie kann bei der Ratte und beim Menschen ca. 8-fach höher sein als die der Cyaninglucuronide. Beim Menschen wurden im Blutplasma 3,4-BPA-Werte bis zu 500 nmol/L zwei Stunden nach einer oralen Aufnahme von Anthocyanen bestimmt [31]. Danach fällt der 3,4-DBA-Plasmaspiegel wieder rasch ab, schneller als der der Cyaninglucuronide. Da 3,4-DBA stark antioxidativ wirkt, hat der Nachweis dieser Phenolsäure im Blutplasma die Diskussion antikarzinogener Effekte durch Antioxidantien wieder belebt [31,32]. Gegen eine solche Interpretation spricht aber die Tatsache, dass Quercetin, dessen mikrobieller Abbau nicht zu 3.4-DBA führt, sogar stärkere antikarzinogene Wirkungen zeigt als Cyanidine.

Insgesamt belegen die Ergebnisse aber, dass die intestinale Mikrobiota über eine hohe Kapazität zum Abbau von Anthocyanen verfügt. Sie nutzt die Anthocyane als Substrate zum Energiegewinn und die Abbauprodukte als Bausteine für zahlreiche Synthesen. Anthocyane tragen deshalb ebenso wie andere mikrobiell gut abbaubare Flavonoide zur Stabilisierung einer nicht pathogenen intestinalen Mikrobiota bei und verstärken das Immunsystem.

Literatur

[1] C. A. Williams; R. J. Grayer: Anthocyanins and other flavonoids. Natl. Prod. Rep. **21**, 539-573 (2004).

[2] R. L. Prior; X. Wu: Anthocyanins: structural characteristics that result in uniquemetabolic pattern and biological activities. Free Radic. Res. **40**, 1014-1028 (2006).

[3] L. S. Wang; G. D. Stoner: Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Lett. **269**, 281-290 (2008).

[4] T. K. Mc Glie; M. C. Walton: The bioavailability and adsorption of anthocyanins: towards a better understanding. Mol. Nutr. Food Res. **51**, 702-713 (2007).

[5] T. Ichiyanagi; Y. Shida; M. M. Rahman *et al.*: Metabolic pathway of cyanidin 3-O-β-D-glucopyranoside in rats. J. Agric. Food Chem. **53**, 145-150 (2005).

[6] C. Andres-Lacueva; B. Shukitt-Hale; R. L. Galli *et al.*: Anthocyanins in aged blue berry-fed rats are found centrally and may enhance memory. Nutr. Neurosci. **8**, 111-120 (2005).

[7] S. Talavira; C. Felgines; O. Texier *et al.*: Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. J. Nutr. **133**, 4178-4182 (2003).

[8] C. D. Kay; G. J. Mazza; B. J. Holub: Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. J. Nutr. **135**, 2582-2588 (2005).

[9] S. Passamonti; U. Vrhovsek; A. Vanzo; F. Mattivi: The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. FEBS Lett. **544**, 210-215 (2003).

[10] C. Manach; G. Williamson; C. Morand *et al.*: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in human. I. Review of 97 bioavailability studies. J. Clin. Nutr. **81**, S230-S242 (2005).

[11] G. Mazza; C. D. Kay; T. Cottrell; B. J. Holub: Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. J. Agric. Food Chem. **50**, 7731-7737 (2002).

[12] F. Galvano; L. La Fauci; P. Vitaglione *et al.*: Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. Ann. Ist Super Sanita **43**, 382-393 (2007).

[13] C. D. Kay: Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in human. Nutr. Res. Rev. **19**, 137-146 (2006).

[14] P. C. H. Hollman: Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? J. Sci. Food Agric. **81**, 842-852 (2001).

[15] X. Wu; G. Cao; R. T. Prior: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. J. Nutr. **132**, 1865-1871 (2002).

[16] A. M. Aura; P. Martin-Lopez; K. A. O`Leary *et al.*: In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. Eur. J. Nutr. **44**, 133-142 (2005).

[17] A. R. Moser; H. C. Pitot; W. F. Dove: A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science **247**, 322-324 (1990).

[18] S. J. You; M. Ohmori; M. M. O. Pena *et al.*: Development abnormalities in multiple proliferative tissue of Apc $^{Min/+}$ mice. Int. J. Exp. Pathol. **87**, 227-236 (2006).

[19] G. Jacobasch: Gesundheitsfördernde Wirkungen von Flavonoiden. Sitzungsberichte der Leibniz-Sozietät **80**, 81-90 (2005).

[20] G. K. Harris; A. Gupta; R. G. Nines *et al.*: Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane induced colon cancer and 8-hydroxy-2-deoxy guanosine levels in the Fischer 344 rat. Nutr. Cancer **46**, 125-133 (2001).

[21] G. Lala; M. Malik; C. Zhao *et al.*: Anthocyanin-rich extract inhibit multiple biomarkers of colon cancer rats. Nutr. Cancer **54**, 84-93 (2006).

[22] M. Sonoshita; K. Takaku; N. Sasaki *et al.*: Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc (delta 716) knockout mice. Nat. Med. **7**, 1048-1051 (2001).

[23] K. T. Calamia: Current and future use of anti TNF agents in the treatment of autoimmune, inflammatory disorders. Adv. Exp. Med. Biol. 528, 545-549 (2003).

[24] J. Shao; H. Sheng; H. Inoue *et al.*:Cyclooxygenase-2-expression in coloncarcinoma cells. J. Biol. Chem. **275**, 33951-33956 (2000).

[25] M. Kaneuchi; M. Sasaki; Y. Tanaka *et al.*: Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and Cyclin D1. Int. J. Oncol. 22, 159-164 (2003).

[26] E. Tokunaga; E. Oki; A. Egashira *et al.*: Deregulation of the Akt pathway in human cancer. Curr. Cancer Drug Targets **8**, 27-36 (2008).

[27] C. Wagner; O. Müller: Molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag (2010).

[28] J. Pouysegur; F. Dayan; N. M. Mazure: Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumor regression. Nature **441**, 437-443 (2006).

[29] A. Bach; J. Bender-Sigel; D. Schrenk *et al.*: The antioxidant quercetin inhibits cellular proliferation via HIF-1-dependent induction of p21 Waf. Antiox. Redox Signal. **13**, 437-448 (2010).

[30] H. Keppler; H. U. Humpf: Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. Bioorg. Med. Chem. **13**, 5195-5205 (2005).

[31] P. Vitaglione; G. Donnanrumma; A. Napolitano *et al.*: Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. J. Nutr. **137**, 2043-2048 (2007).

[32] Y. Nakamura; K. Torikai; Y. Ohto *et al*.: A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. Carcinogenesis **21**, 1899- 1907 (2000).

Die Experimente wurden im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke durchgeführt

Adresse der Verfasser: G.K.Jacobasch@t-online.de

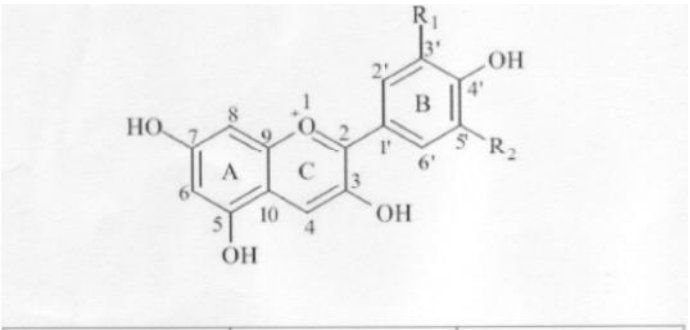
Leibniz Online 10/2011
Zeitschrift der Leibniz-Sozietät e. V.
ISSN 1863-3285
http://www.leibniz-sozietaet.de/journal/archive/10_11/Jacobasch_ua_1.pdf

G. Jacobasch, M. Florian, J. Hempel, H. Schneider

Hemmung der intestinalen Tumorentwicklung durch Cyanidin-3-O-Rutinosid

Einleitung und Zielstellung

Anthocyane sind wasserlösliche blau gefärbte sekundäre Pflanzenstoffe. Ihre Bezeichnung leitet sich von den griechischen Wörtern anthos (Blüte) und kyanos (blau) ab. Diese Verbindungen werden vorrangig in Beerenfrüchten, Blumen und einigen Gemüsearten gebildet. Über 400 Anthocyane lassen sich anhand ihrer Substituenten unterscheiden, die entweder Hydroxy- und Methylgruppen, Zucker oder organische Säuren sind, die an verschiedenen Stellen des Ringsystems gebunden werden können. Die Anzahl der Aglykone ist mit 18 verschiedenen Verbindungen wesentlich geringer. Die am häufigsten gebildeten Anthocyane sind Cyanidinverbindungen. Sie kommen besonders reichlich vor in Aronia, Holunder, Brombeeren, schwarzen Johannisbeeren, schwarzen Himbeeren, Kirschen und Rotkohl. Abb. 1 zeigt die Grundstruktur des Anthocyanidins und Beispiele für Substitutionen am C-und B-Ring des Moleküls von 6 häufigen Aglykonen. Durch die Esterbildung mit Zuckern (Glucose, Galactose, Rhamnose oder Arabinose) am C3- und/oder freien OH-Gruppen am C5, C7, C3′ und C5′ gewinnen die Verbindungen an Stabilität. Die Substitutionsmuster sind oft noch durch die Bindung mehrerer aneinander gereihter Zucker oder eine Veresterung mit verschiedenen organischen Säuren erweitert, dadurch nimmt die Stabilität der Verbindungen weiter zu. Charakteristisch für Anthocyane ist die positive Ladung in Position 1 des C-Ringes; dadurch wird das Aglykon zu einem Flavylium-Kation [1].



Name	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH_3	H
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH_3	H
Malvidin	OCH_3	OCH_3

Abb. 1 Grundstruktur der Anthocyane nach Wang und Stoner [3]

Durch den Nachweis einer Reihe gesundheitsfördernder Effekte, die überwiegend aus *In-vitro*-Experimenten abgeleitet wurden, nahm das Interesse an dieser Stoffklasse im letzten Jahrzehnt stark zu [2]. Die publizierten Befunde vieler Arbeiten beziehen sich auf Experimente mit Zellkulturen, bei denen Konzentrationen von Anthocyanen eingesetzt wurden, die z. T. um mehrere Größenordnungen höher waren als die, die *in vivo* erreichbar sind, was eine Übertragung der Ergebnisse auf *In-vivo*-Bedingungen einschränkt. Sie bildeten aber die Grundlage für das über viele Jahrzehnte vertretene Konzept der antioxidativen Effekte dieser Stoffklasse [3]. Um die Ergebnisse von *In-vivo*-Studien richtig einschätzen zu können, ist die Kenntnis der Stabilität von Anthocyanen im Gastrointestinaltrakt, ihre Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit im Organismus sowie der Umsatz von Anthocyanen durch die intestinale Mikrobiota und die dabei gebildeten Metaboliten erforderlich.

Die Struktur der Anthocyane hängt in wässrigen Lösungen entscheidend vom pH- Wert ab (Abb. 2). Während im sauren Milieu (pH <2) eine rot gefärbte Flavyliumstruktur vorliegt, tritt

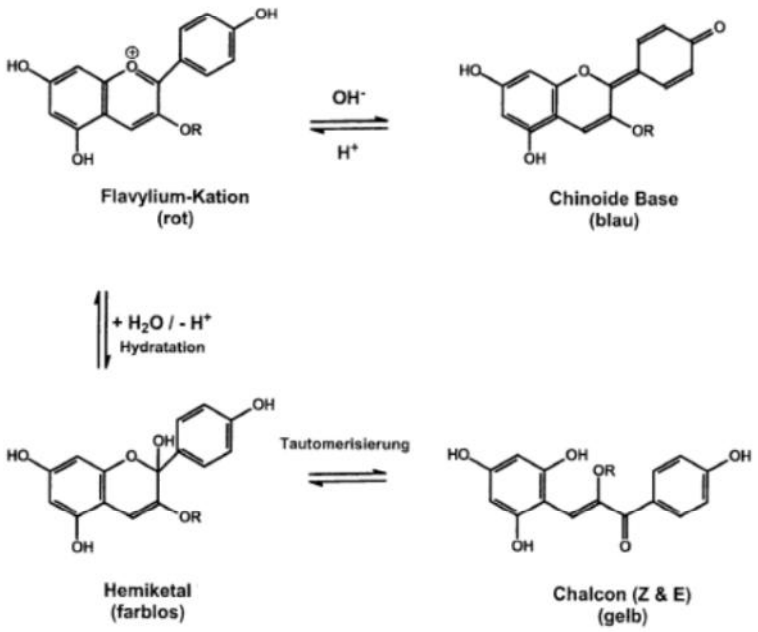


Abb. 2 Einfluss des pH-Wertes auf die Struktur und Färbung der Anthocyane nach Prior und Wu [2]

bei höheren pH-Werten eine blaue chinoide Basenform auf. Durch Hydratation kann das farblose Hemiketal gebildet werden, aus dem durch Tautomerisierung eine Öffnung des C-Ringes erfolgt, wodurch ein gelb gefärbtes Chalcon entsteht [1, 4].Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Stabilität von Aglykonen der Anthocyane geringer als die der anderen Flavonoide ist. Die genannten Faktoren entscheiden unter *In-vivo*-Bedingungen darüber, welcher Anteil der aufgenommenen Menge an Antocyanen bereits im Gastrointestinaltrakt instabil und damit unwirksam wird, welcher unresorbiert das Kolon erreicht, dort mikrobiell abgebaut und verwertet wird oder nach der Resorption über den Blutkreislauf von den Gewebszellen aufgenommen und systemisch wirkt.

Es ist nicht überraschend, dass die in der Literatur zu findenden Angaben von Anthocyankonzentrationen im Blutplasma stark variieren. Sie liegen im Bereich von 1 bis 100 nmol/L [2, 4, 5]. Realistisch sind Spiegel von 1-2 nmol/L. Die höchsten zellulären Konzentra-

tionen wurden in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Niere und in Zellen verschiedener Gehirnregionen festgestellt [5, 6, 7]. Die Ausscheidung von resorbierten Anthocyanen erfolgt in Form von glucuronidierten, methylierten, selten sulfatierten Metaboliten über die Niere mit dem Harn. Darüber hinaus gelangen Anthocyane und ihre Metabolite aus der Leber auch in den enterohepatischen Kreislauf und kommen damit wieder in Kontakt mit der intestinalen Mikrobiota.

Maximale Konzentrationen von Anthocyanen werden im Plasma 2 bis 3 Stunden nach ihrer oralen Aufnahme erreicht, die Halbwertszeit beträgt 1,5 bis 3 Stunden und die Wiederfindungsrate ist mit etwa 1 % sehr gering [8]. Die Resorption von Anthocyanen erfolgt schneller als die von Flavonolen. Sie beginnt im Magen, erreicht im Dünndarm ihr Maximum, ist aber auch noch im Kolon nachweisbar [9]. Anthocyane können aktiv als Glucoside oder nach einer Hydrolyse der β-glykosidischen Bindung und nachfolgender Glucuronidierung der Aglykone aufgenommen werden [10]. Eine rasche Resorption ist von Cyanidin-3-Glucosid und Cyanidin-3,5-diglucosid bekannt. Beide Verbindungen wurden in geringen Konzentrationen im Blutplasma nachgewiesen [5, 8, 11]. Es ist möglich, dass diese Cyanidinglucoside auch direkt über die Pfortader aufgenommen werden. Generell existieren zwei Resorptionsmechanismen:

1. Transport von Anthocyanglucosiden mit Hilfe eines Natrium-Glucose-Cotransporters in die Epithelzellen der Schleimhaut, wo sie durch zytosolische β-Glucosidasen hydrolysiert werden und anschließend glucuronidiert in den Blutkreislauf gelangen [11, 12]. Aglykone treten im Blutplasma nicht auf. Die Glucuronidierung wird durch UDP-Glucuronyltransferasen katalysiert. Diese Enzyme sind nicht nur in Enterozyten sondern auch in hoher Aktivität in Leber- und Nierenzellen vorhanden. Die in der Niere gebildeten Produkte werden direkt mit dem Harn ausgeschieden.
2. Hydrolyse von Anthocyanglycosiden durch eine Laktat Phlorizin Hydrolase, die in der Bürstensaummembran lokalisiert ist [13]. Die dabei freigesetzten Aglykone werden entweder im Darmlumen weiter abgebaut oder diffundieren in Enterozyten, von wo sie nach Glucuronidierung über die basolaterale Membran in die serologische Flüssigkeit gelangen. Bei einer Zufuhr von größeren Mengen an Anthocyanen, werden die freigesetzten Aglykone durch Methyltransferasen unter Nutzung von S-Methylmethionin als Cofaktor methyliert [8, 14, 15]. Über diesen Mechanismus schützt sich der Organismus vor einer zu hohen oxidativen Belastung. Methylierte Cyanidine treten auch in der Leber und in der Niere, nicht aber im Blutplasma auf [10].

Im Kolon werden Anthocyanverbindungen sehr schnell durch bakterielle β-D-Glucuronidasen oder β-D-Glucosidasen wieder dekonjugiert. Danach wird der C-Ring der Aglykone gespalten und zu Aldehyden und Phenolsäuren abgebaut. Diese werden entweder mit den Faeces ausgeschieden oder auch resorbiert und somit im Blutplasma nachweisbar. [16] (Abb. 3). Das am häufigsten gebildete Abbauprodukt ist die 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Diese Phenolsäure erreicht bereits 2 Stunden nach einer oralen Aufnahme von Anthocyanen maximale Werte im Kolon und im Blutplasma.

Das Ziel dieser Arbeit war es, an einem *In-vivo*-Modell die antikarzinogene Wirkung von Cyanidin-3-O-Rutinosid zu überprüfen und den dadurch zu erreichenden Effekt mit dem des Cyclooxygenaseinhibitors Sulindac und dem des Flavonols Quercetin zu vergleichen. Außerdem wurde versucht, die Abbauprodukte, die durch die intestinale Mikrobiota aus diesem Anthocyan gebildet werden, zu analysieren.

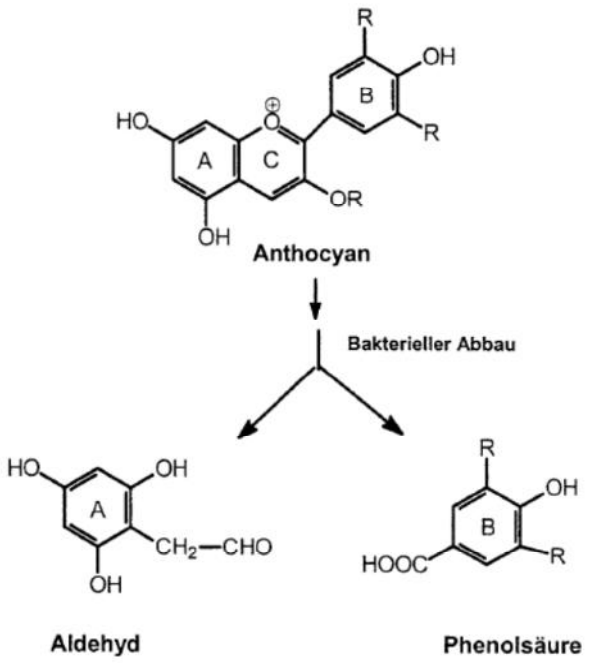


Abb. 3 Abbau der Anthocyane durch die intestinale Mikrobiota

Tiermodell

Als Tiermodell wurde die apc-Gen defekte Min^+/-Maus gewählt (C57BL67-Min^+/- Maus). Es ist ein klinisch relevantes Modell, dem ein hereditärer Defekt zugrunde liegt, der zur Entwicklung einer intestinalen Polyposis führt. Der apc-Gendefekt wurde durch eine Behandlung von männlichen Tieren C57BL/6JL (B6) mit Ethylnitroharnstoff erzeugt und durch Züchtung in die Keimbahn übertagen [17]. Es handelt sich um eine Punktmutation des murinen apc-Gens im Chromosom 1. Durch den erfolgten Basenaustausch im Codon 850 wird nicht mehr die Aminosäure Leuzin in die Polypeptidkette eingebaut sondern, da ein Stoppcodon entstanden ist, die Proteinsynthese an dieser Stelle abgebrochen. Die daraus resultierende Verkürzung umfasst fast zwei Drittel des APC-Proteins. Damit ist ein Verlust von mehreren funktionalen Domänen verbunden, die normalerweise Wechselwirkungen mit mehreren Proteinen eingehen, und dadurch Einfluss auf die chromosomale Stabilität, die Kontrolle des Zellzyklus, die Zelladhäsion u. a. Prozesse nehmen. Die apc-Gene von Maus und Mensch verfügen beide über 15 Exons und stimmen in der Aminosäuresequenz der APC-Proteine zu 92% überein [18]. Das APC-Protein ist eine Schlüsselverbindung im WNT-Signalweg. Heterozygote Min^+/-Mäuse entwickeln eine Polyposis mit mehr als 60 – 70 Adenomen, die aber, im Gegensatz zum Krankheitsbild beim Menschen, überwiegend im Dünndarm und nicht im Kolon lokalisiert sind. Im Dickdarm entstehen meistens nicht mehr als 2 Adenome (Abb. 4). Oft sind die Polypen gestielt wie in Abb. 4 dargestellt. Die Lebenserwartung der Min^+/-Mäuse beträgt maximal 120 Tage. Die ersten Symptome werden 5-6 Wochen nach der Geburt manifest. Die Min-Mäuse bleiben im Vergleich zu gesunden Tieren im Wachstum und im Gewicht deutlich zurück. Nicht alle Adenome entarten gleichzeitig, aber mit ihrer Anzahl erhöht sich das Risiko für die Herausbildung eines Karzinoms. Mit der Entdifferenzierung der zunächst kleinen

Adenome geht eine stärker werdende Blutung einher, die den Darminhalt dunkel färbt. Die Folge der Blutungen ist eine Verringerung des Hämatokritwertes und eine kompensatorische Zunahme an jungen erythroiden Zellen im Blut. Auch die Milzgewichte nehmen signifikant zu.

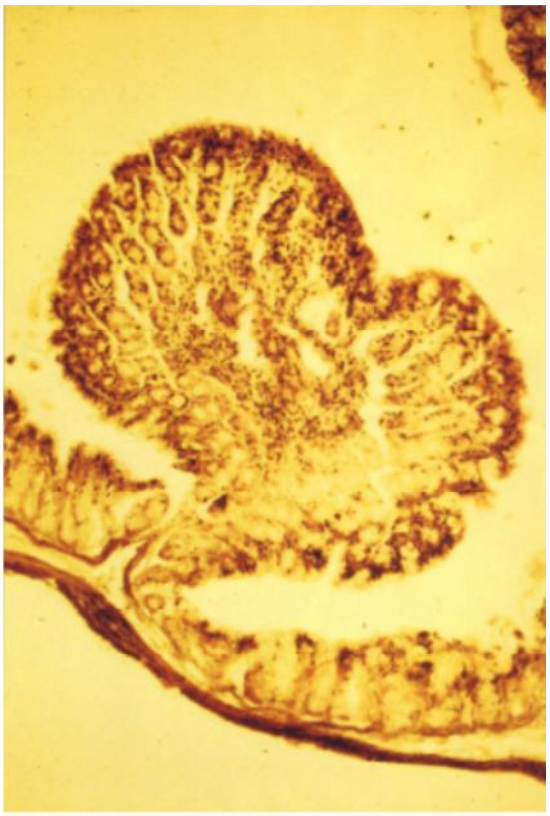


Abb. 4 Gestielter Darmpolyp der Min+/-Maus (Längsschnitt, HE-Färbung)

Das APC-Protein steht am Anfang einer Tumorkaskade, in der durch eine bevorzugte Zellteilung von Zellklonen mit mehreren mutierten Tumorgenen die Akkumulation von Mutationen rasch ansteigt. Da die Polyposis im Gegensatz zur FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) des Menschen bei den Min^{+}/-Mäusen vom Kolon in den Dünndarm verlagert ist, bietet dieses Modell die Möglichkeit, die antikarzinogene Wirkung von Anthocyanen weitgehend ohne Beeinflussung durch die intestinale Mikrobiota zu untersuchen.

Studiendesign und Methoden

Die Experimente wurden mit 5 Wochen alten Tieren gestartet. 20 Min^{+}/-Mäuse erhielten eine semisynthetische Standardkost; bei 8 Min^{+}/-Mäusen war sie zusätzlich mit Cyanidin-3-O-Rutinosid Chlorid (Keracyaninchlorid) angereichert. 180 mg (0,285 mmol) wurden für die Herstellung von 1 kg Futter verwendet, davon ließen sich in den fertigen Pellets nur noch 14,25mg (0,022mmol) wiederfinden, was die erwähnte Instabilität der Anthocyane unterstreicht. Bei 8 Min^{+}/-Mäusen war die Diät durch 14 Mikrogramm Quercetin ergänzt und bei weiteren 8 Min+/-Mäusen war dem Trinkwasser Sulindac in einer Dosierung von 270 mg/L zugesetzt.

Nach 65 Versuchstagen wurden die Mäuse getötet, die intestinalen Polypen gezählt und ihr Entdifferenzierungsgrad histologisch ermittelt. In einem weiteren Testansatz wurde die Meta-

bolisierung des Anthocyans durch die intestinale Mikrobiota geprüft. Dazu wurde eine frisch gewonnene Faecesprobe von einer gesunden männlichen Person verwendet, die eine normale Diät konsumierte. Diese wurde in einem Fermentationsmedium in Hungate-Gefäßen suspendiert, die bis zu 8 Stunden bei pH 7,2-7,5 bei 37 °C in einer anaeroben Arbeitsstation ($N_2/CO_2/H_2$ = 90:10:10) inkubiert wurden. Die Kontrollprobe enthielt keinen Zusatz von Anthocyanen, die Testprobe dagegen 4,1mg Keracyaninchlorid pro 100 mg Faeces. Nach 0 und 8 Stunden wurden Aliquots aus dem Inkubat entnommen, mit H_2/CO_2 (80:20, v/v) begast und sofort bei –20 °C eingefroren. Zur Analyse der Abbauprodukte des Anthocyans wurden die Proben in handwarmen Wasser aufgetaut, zentrifugiert, mit Ameisensäure versetzt und eine Filtration über PTFE vorgenommen. Die Anthocyanprodukte wurden auf einer C-18 Lichrospher Säule durch HPLC bei 20 °C unter Verwendung eines Acetonnitrilgradienten (von 10 bis 60 %) in 0,5 % Ameisensäure getrennt und mit einem Dioden-array Detektor identifiziert .

Ergebnisse und Diskussion

Auf Grund des relativ niedrigen Anthocyangehaltes im Futter stieg der Spiegel von Anthocyanglucuroniden im Blutplasma nur leicht an. Trotzdem war ein signifikanter antikarzinogener Effekt nachweisbar. Die Anzahl der Polypen war bei den Min^+/-Mäusen, deren Futter Anthocyan enthielt, um nahezu 70 % geringer als bei denen, die nur mit Standardfutter ernährt wurden (Tab. 1). Die Anzahl der Polypen nahm nur im Dünndarm und nicht im Kolon ab. Histologisch waren alle Polypen, die bei den Anthocyan-Mäusen zu finden waren, Adenome. Bei den Min^+/-Mäusen, deren Futter kein Anthocyan enthielt, wurden dagegen außer Adenomen 3 bis 5 Karzinome pro Tier identifiziert. Kein einziges Adenom war aber sowohl im Dünndarm als auch im Kolon von Min^+/-Mäusen festzustellen, die Sulindac mit dem Trinkwasser aufnahmen. Durch Quercetin wurde im Min^+/-Maus-Modell die Karzinogene noch effektiver als durch Cyanidin-3-O-Rutinosid gehemmt, allerdings in höheren Konzentrationen [19]. Diese Befunde unterstützen die Schlussfolgerung, dass die Unterdrückung der intestinalen Tumorentwicklung durch Flavonoide, wenn bereits eine Mutation im apc-Gen vorliegt, nur noch über systemische Effekte zu erreichen ist.

Tab.1 **Einfluss von Keracyaninchlorid, Quercetin und Sulindac auf die intestinale Polyposis von Min+/-Mäusen nach 70 Versuchstagen**

Anzahl der Polypen											
Standarddiät			Standarddiät + Keracyaninchlorid			Standarddiät + Quercetin			Standarddiät + Sulindac		
Mw	SD	n	Mw	SD	n	Mw	SD	n	Mw	SD	n
71	28	20	24	9	8	8	4,2	8	0	-	8

Werte sind Mittelwerte ± SD; n = 8 bzw. 20

Über 70 % aller sporadischen kolorektalen Karzinome des Menschen weisen eine Mutation im apc-Gen auf. Für den Stoffwechsel und die Differenzierung der Kolonepithelzellen ist die Resorption von Butyrat, einem Endprodukt der mikrobiellen Fermentation, essentiell. Der dafür verantwortliche Natrium-abhängige Monocarboxylattransporter-1 wird jedoch bereits

im Frühstadium der Entdifferenzierung, noch vor dem Auftreten von Mutationen im apc-Gen, inaktiviert. Ist dieses Ereignis eingetreten, ist eine Unterdrückung der Karzinogenese durch Flavonoide im Kolon nicht mehr möglich. Präventiv schützen Flavonoide jedoch auch die Epithelzellen der Dickdarmschleimhaut vor einer Entdifferenzierung. So konnte z.B. mit dem Azoxymethan- (AOM) Modell bei F344 Ratten gezeigt werden, dass durch eine 33-wöchige Zufuhr einer Diät, die 2.5, 5 oder 10 % lyophilisierte schwarze Himbeeren (Rubus occidentalis) enthielt, die Anzahl an Polypen konzentrationsabhängig um 42, 45 und 71 % gesenkt und die Bildung von Adenokarzinome um 28, 35 und 80 % unterdrückt werden konnte [20]. Auch die Anzahl der aberranten crypt foci (ACF) nahm in Abhängigkeit von der aufgenommenen Beerenmenge um 36, 24 bzw. 21 % ab. Eine weitere Studie wurde mit dem Dimethylhydrazin- (DMH) Modell mit F344 Ratten durchgeführt [21]. Hierbei wurden Anthocyane in Form von blauem Mais (5 % in der Diät) verwendet; 73 % der Flavonoide entfielen hierbei auf 8 verschiedene Cyanidinderivate. Auch sie bewirkten eine weitgehende Unterdrückung der kolorektalen Karzinogenese.

Diese Befunde unterstreichen, dass sowohl Flavonole als auch Anthocyane für eine Chemoprävention der intestinalen Karzinogenese geeignet sind. Die Wasserlöslichkeit der Anthocyane erleichtert ihren Einsatz. Wegen der hohen Instabilität sollten aber möglichst nur frisch geerntete Beeren oder frisch hergestellte Säfte vor einer Mahlzeit aufgenommen werden, um die für eine antikarzinogene Wirkung notwendige Konzentration an Anthocyanen im Blutplasma zu erreichen.

Wodurch lässt sich die antikarzinogene Wirkung von Anthocyanen erklären? Weitgehend auszuschließen ist die häufig diskutierte antioxidative Wirkung von Anthocyanen, denn 1. ist dafür die Konzentration im Blutplasma viel zu gering und 2. üben die vorwiegend im Plasma auftretenden Glucuronide der Anthocyane keine antioxidativen Effekte aus.

Rolle der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in der Karzinogenese

Ein frühes Ereignis in der intestinalen Karzinogenese ist die Hochregulation der COX-2 (Abb. 5). Während die COX-1 konstitutiv ist, wird die Expression der COX-2 nur bei einer Aktivierung des NF-κB-Weges induziert. Die COX-Isoenzyme kontrollieren die Umsetzung der ungesättigten Arachidonsäure zu Prostanoiden, die als Signalmoleküle in viele Stoffwechselwege eingreifen.

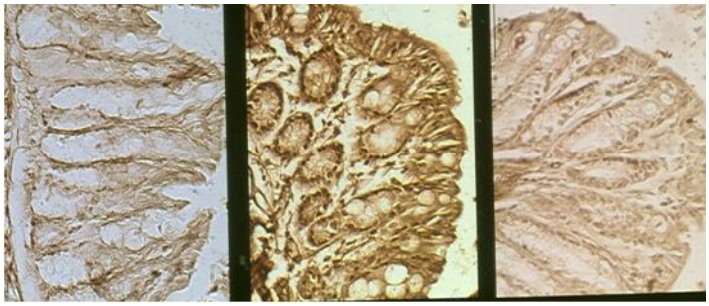


Abb. 5 Histochemischer Nachweis der COX-2 anhand der Immunreaktivität (POD/DAB).
Von links nach rechts: gesunde Balb c-Maus, Min+/-Maus, Min+/-Maus plus Sulindac

Sulindac, zählt zur Gruppe der nichtsteroidalen antiinflammatorischen Verbindungen (NSAID). Es unterdrückt nicht nur die Expression der COX-2 (Ptgs2-Gen) sondern hemmt auch vollständig die Entwicklung der Polyposis bei Min^{+}/-Mäusen (Tab. 1). Sulindac hat gegenüber wesentlich spezifischeren COX-2-Inhibitoren den Vorteil, dass seine Anwendung nicht mit kardiovaskulären Nebenwirkungen einhergeht. Sulindac wird deshalb auch weiter-

hin in der Therapie bei FAP-Patienten eingesetzt. Einen weiteren experimentellen Beleg für eine Schlüsselfunktion der COX-2 bei Entdifferenzierungsprozessen lieferten Studien, bei denen Apc Δ716 Mäuse mit Tieren gekreuzt wurden, die kein funktionelles Ptgs2-Gen hatten. Die Nachkommen dieser Tiere entwickelten wesentlich weniger und kleinere Polypen als die Apc Δ716 Mäuse. Auch eine Ausschaltung des Prostaglandinrezeptors EP2 senkte die Anzahl der Polypen [22]. Anthocyane können ebenso wie Quercetin die Induktion der COX-2 über verschiedene Wege verhindern. Gehemmt wird:

1. konzentrationsabhängig die Bildung von Entzündungsmediatoren, vor allem die des Tumornekrosefaktor α (TNFα) und die von Interleukin-1α (IL-1α) [23]. Dadurch wird der NF-κB-Weg gedrosselt und gleichzeitig die Bildung antiinflammatorischer Cytokine stimuliert.
2. Mit der Unterdrückung der Bildung von IL-1α entfällt dessen Stabilisierungseffekt auf die COX-2 mRNA, der auch durch das onkogene ras-Protein zustande kommen kann [24]. Diese Stabilisierung erfolgt über eine konservierte 116 Nukleotide umfassende AU-reiche Region (**A**U-**R**ich **E**lement = ARE), die in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der COX-2 mRNA lokalisiert ist.
3. Ein weiterer Angriffspunkt liegt bei den Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren, die ebenfalls über den NF-κB-Weg eine Expression der COX-2 bewirken [25]. Flavonoide beeinflussen direkt die Funktion der NF-κB-Proteine. Diese verfügen über eine zu einem Protoonkogen homologe Domäne mit einer Sequenz für ihre Kernlokalisation. Sie wird zu Beginn der Karzinogenese aktiviert und führt über die Erhöhung der NF-κB-Konzentration zur COX-2-Expression.
4. In Wechselwirkung mit dem NF-κB-Weg steht auch die Signalkaskade der AKT (Serin-Threonin-Proteinkinase B) und ERK (**E**xtrazellular **R**egulierte Mitogen Aktivierte Protein-**K**inase). Die Gene der AKT-Gruppe weisen eine Homologie zu einem viralen Onkogen auf, die zum Tragen kommt, wenn AKT die IκB-Kinase aktiviert [26]. Der Hemmfaktor IκB wird dann verstärkt phosphoryliert und kann somit durch das Proteasom abgebaut werden. Das hat zur Folge, dass der nun freigesetzte Transkriptionsfaktor NFκB in den Zellkern translozieren kann, dort an spezifische Motive von Zielgenen bindet, zu denen auch das Ptgs2-Gen zählt und damit die COX-2 hochreguliert wird. Anthocyane und Quercetin bewirken eine Hemmung der AKT- und ERK-Phosphorylierung. Dadurch wird nicht nur die Expression der COX-2 verhindert, sondern es werden auch die pathologisch gesteigerte Zellteilung und das Zellwachstum unterdrückt und die Aktivierung von Caspasen, die die Apoptose einleiten können, bleibt erhalten.

Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose

Flavonoide greifen auch in die Wechselwirkung der AKT mit dem WNT-Signalweg ein. Hier hemmt AKT die Phosphorylierung von β-Catenin, wodurch dieses zytosolische Protein nicht proteolytisch abgebaut werden kann und deshalb verstärkt in den Zellkern transportiert wird. Dadurch wird die Expression von Genen, die die Tumorbildung steigern, vorangetrieben. Unter diesen Bedingungen wird das Tumorwachstum außerdem durch Wachstumsfaktoren und das ras-Onkogen, die den PI3K/AKT-Signalweg aktivieren, verstärkt [27].

1. AKT beeinflusst auch die Kontrolle des Zellzyklus. Es aktiviert durch Phosphorylierung das Protoonkogen Mdm2 (**M**urine **d**ouble **m**inute Chromosom **2**). Dadurch werden die Kontrollfunktionen des p53 Proteins auf den Ablauf des Zellzyklus eingeschränkt
2. AKT hemmt außerdem Cyclin D 1. Dadurch wird der Kontrollmechanismus beim Übergang von der G_1- in die S-Phase aufgehoben und die Zellteilung beschleunigt.

Anthocyane können die Störung im Ablauf des Zellzyklus abschwächen, indem sie die Expression von p21WAF induzieren. Dieses Protein ist ein Inhibitor von Cyclin-CK-Komplexen und kann einen Stopp in der G1-Phase herbeiführen.

Charakteristisch in der Tumorentwicklung ist die Hemmung der Apoptose, die zu Wachstumsvorteilen bei Zellklonen mit Mutationen in Tumorgenen führt; denn sie werden nicht mehr durch die Apoptose eliminiert. Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen an Kolonschnitten von Min+/-Mäusen zeigen, dass die Apoptose im Verlaufe der Karzinogenese stark gehemmt wird und dieser Effekt durch Sulindac und Flavonoide verhindert werden kann (Abb. 6).

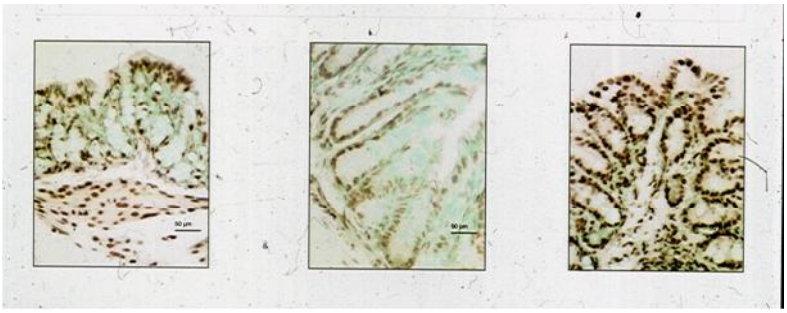


Abb. 6 Immunhistochemische Darstellung der Apoptoseintensität in Kolonschnitten (Klenow-Technik)
Von links nach rechts: gesunde Balbc-Maus, Min+/-Maus, Min+/-Maus plus Sulindac

Eine Apoptose kann über intrinsische (mitochondrial) und extrinsiche (FAS-Rezeptor, CD95, TNF-Rezeptor) Wege ausgelöst werden. Signale zur Initiierung der Apoptose können von unterschiedlichen Ereignissen ausgehen, ebenso ihre Hemmung. Ursachen für eine Verminderung der Apoptose in Tumorzellen können sein [27]:

1. ein Ausfall des TNF-Rezeptors, der für die Weiterleitung von Apoptosesignalen verantwortlich ist
2. eine verstärkte Expression von antiapoptotischen Genen durch Aktivierung des NF-κB-Weges
3. Tp53 Mutationen im fortgeschrittenen Tumorstadien, wodurch die Apoptosestimulation durch BCl-2 entfällt. Das Protoonkogen kann aber auch unabhängig von p53 durch miRNA gehemmt werden. Gegenspieler von BCl-2 ist das BAX-Protein. Seine Transkription wird durch den p53-Widtyp aktiviert, was zur Aufhebung der apoptotischen Wirkung von BCl-2 führt. Mutiertes p53 kann dagegen die Transkription von BAX nicht mehr realisieren. In beiden Fällen hat das zur Folge, dass eine Öffnung von Mitochondrienkanälen nicht mehr zustande kommt und damit der intrinsische Apoptoseweg ausgeschaltet wird. Bei einer Aktivierung des Signalweges der MAPK wird dagegen die Expression der Caspase 8 verhindert, über die eine Apoptose extrinsisch initiiert werden kann.

Anthocyane erhöhen in Tumorzellen das mitochondriale Membranpotential und induzieren die proapoptotischen BCL-2-Proteine BAX und BAD. Diese sind für die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran verantwortlich, durch die dann Cytochrom C ins Zytosol übertritt und eine intrazelluläre Proteolysekaskade in Gang setzt. Durch eine Phosphorylierung kann dabei die Caspase 9 aktiviert werden, die wiederum weitere Effektorcaspasen zur Einleitung der Apoptose aktiviert. Anthocyane können aber auch den extrinsischen Apoptoseweg erhöhen, indem sie die Expression von FAS und Fas-Ligand steigern. Durch die Bindung des Liganden an den Fas-Rezeptor kommt es zur Anlagerung eines Adaptermoleküls. An diesen Komplex bindet dann die Initiatorcaspase 8 und kann dadurch proteolytisch aktiviert werden und anschließend weitere Effektorcaspasen zur Einleitung der Apoptose in Gang setzen. Es ist zu vermuten, dass diese protektiven Effekte der Anthocyane vorrangig durch eine Blockierung des NF-κB-Weges sowie der AKT zustande kommen.

Angiogenese

Eine weitere Voraussetzung für das Wachstum von Tumorzellen ist die Aufrechterhaltung der erforderlichen Sauerstoffzufuhr. Das geschieht zum einen durch die Wanderung von Karzinomzellen in Randgebiete des Tumors oder ein verstärktes invasives Wachstum und zum anderen durch die Entwicklung neuer Blutgefäße. Erreicht die Sauerstoffversorgung kritische Werte (einen O_2-Partialdruck <40mmHg) nimmt die Aktivität von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) zu. Das sind basische Transkriptionsfaktoren, die an Promotoren von Zielgenen binden, die Hypoxie-regulierte Elemente (HREs) enthalten [28]. Diese Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer β-Untereinheit, an die je eine der 3 α-Untereinheiten bindet. Dadurch bilden sich die Dimere HIF-1α, HIF-2α und HIF-3α. Entscheidend für die HIF-Aktivität ist jeweils die α-Untereinheit. Bei einem hohen Sauerstoffangebot wird sie abgebaut, bei O_2-Mangel bleibt sie dagegen stabil und aktiv. Die Kontrolle erfolgt über Sauerstoffsensoren. Diese Funktion wird von Dioxygenasen ausgeübt. Dazu zählen

1. die Prolyl-Hydroxylasen (PHDs). Bei ausreichender Sauerstoffversorgung hydroxylieren sie in der HIF-1α-Untereinheit zwei Prolinreste. Dadurch wird der HIF-Faktor von einem Tumorsuppressorprotein erkannt und an ihn gebunden; in dieser Form kann er ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden.
2. Außerdem reguliert eine Asparagin-Hydroxylase die Aktivität der HIF-Untereinheit. Sie wird als HIF-1 inhibierender Faktor (FIH) bezeichnet. Dieses Enzym hydroxyliert einen Asparaginrest in einer Transaktivierungsdomäne von HIF-1α, die sich am C-Terminus befindet. In Tumoren, ebenso in gesunden Geweben nimmt bei unzureichender Sauerstoffzufuhr die Hydroxylierung von HIF-1α wieder ab, der Faktor wird dadurch stabilisiert und die HREs werden aktiviert [29]. Daraus resultiert eine Akkumulation und Dimerisierung von HIF-1β, was zu einer transkriptionalen Aktivierung von Zielgenen führt. Dabei können auch Wechselwirkungen mit Genen auftreten, deren Expression Voraussetzungen für ein progressives und invasives Tumorwachstum schaffen. Dazu zählen u. a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Faktoren für eine Zunahme der Erythropoese, Proteine für die extrazelluläre Matrix, die Proliferation und den Zellzyklus sowie Schlüsselenzyme für den Kohlenhydratstoffwechsel.

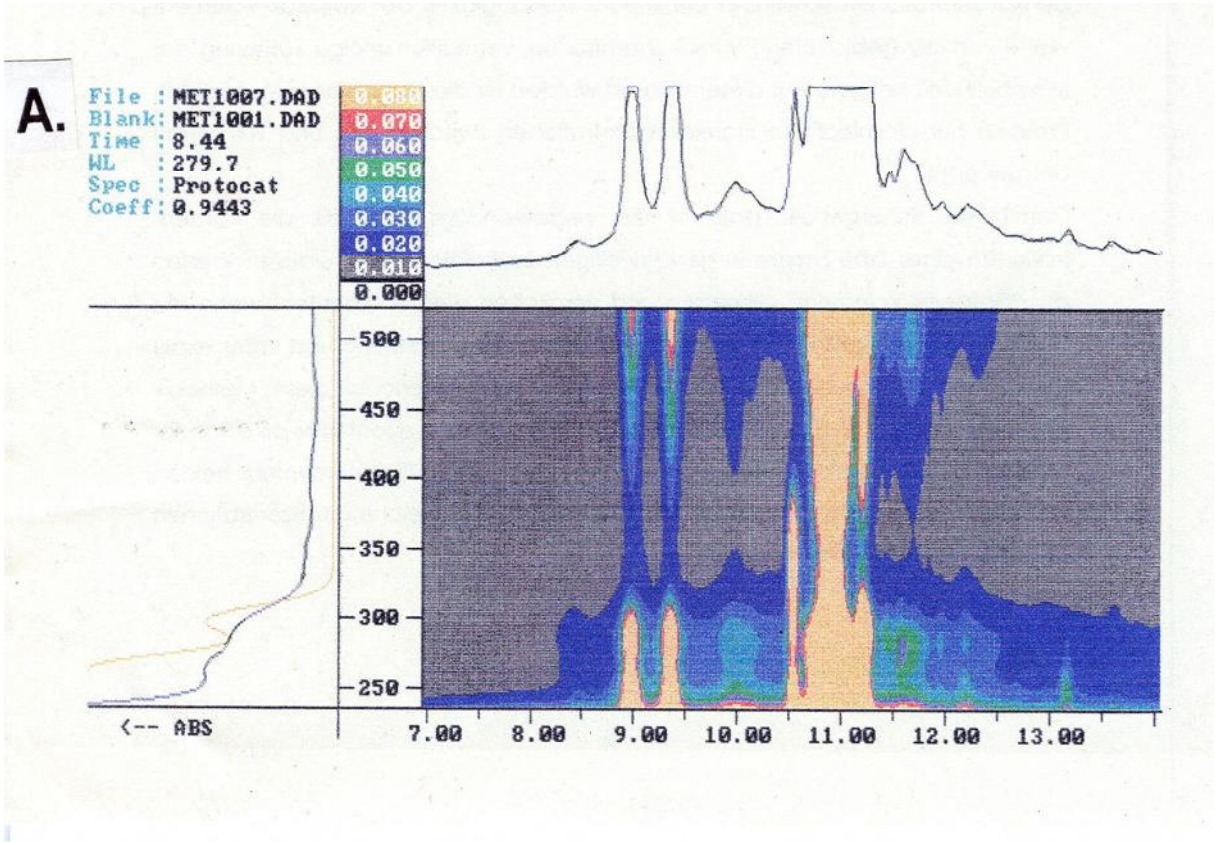
Können Flavonoide auch Mechanismen beeinflussen, die durch HIFs gesteuert werden? Ergebnisse liegen dazu bisher nur aus Untersuchungen mit Zellkulturen (z.B. HepG2 Zellen) vor. Sie wurden ausschließlich mit sehr hohen Quercetinkonzentrationen von 100 µM durchgeführt, die im Blutplasma nie erreicht werden [29]. Da jedoch das Aglykon Quercetin im neutralen pH-Bereich recht instabil ist und die Versuche sich über mehrere Stunden erstreckten, ist die aktuelle Quercetinkonzentration während der Versuchsdauer schwer einschätzbar. Aus den Ergebnissen dieser Studien wurde abgeleitet, dass Quercetin

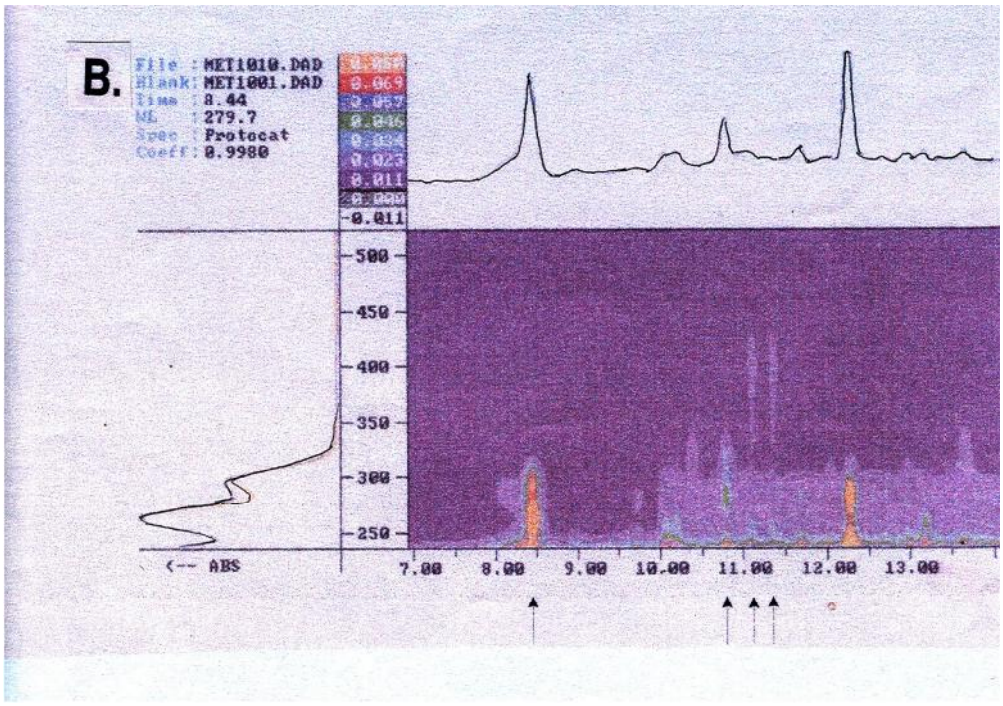
1. die Stabilität von HIF-1α durch Hemmung der Prolinhydroxylasen erhöht
2. die HIF-1-Aktivität hemmt durch Blockierung der MAPK-abhängigen Phosphorylierung von HIF-1α und die Akkumulation dieses Transkriptionsfaktors im Zellkern verringert
3. sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie die Zellzyklusprogression hemmt über eine HIF-1-abhängige Induktion des Cyklin abhängigen Inhibitors p2 1 WAF.

Aus den Befunden vergleichender Studien mit verschiedenen Flavoniden, außer Anthocyanen, wurde abgeleitet, dass die aufgezeigten positiven Effekte nur durch Quercetin bewirkt werden, da sie die Gegenwart von Hydroxylgruppen in der 3'- und 4'-Position im B-Ring erfordern [29]. Diese Bedingung würde aber auch Cyanidin erfüllen. Es ist deshalb zu vermuten, dass Cyanidin die gleichen positiven Effekte auf die Angiogenese ausüben kann wie Quercetin.

Intestinale Mikrobiota

Die bisher aufgezeigten antikarzinogenen Effekte kamen ausschließlich durch systemische Wirkungen von Flavonoiden nach ihrer Resorption zustande. Sie sind von solchen zu trennen, die auf die hohe Aktivität der intestinalen Mikrobiota zum Abbau von Anthocyanen zurückzuführen sind. Vergleiche der UV/VIS-Spektren von Proben, Kontrollen und Blindwerten zeigten, dass Keracyaninchlorid vollständig durch die intestinalen Bakterien unter anaeroben Bedingungen innerhalb von 8 Stunden abgebaut wird (Abb. 7). Die Abb. 7 A, B, C veranschaulichen den Abbau von Keracyaninchlorid durch Faeces des Menschen zum Zeitpunkt 0 (A) und nach 8 Stunden (B) sowie in zweifach autoklaviertem Faeces nach 8 Stunden (C). Die Ergebnisse sind dargestellt als Chromatogramm bei 279,7 nm und als Konturdiagramm von 240 bis 520 nm zwischen 7 bis 14 Minuten. Die Pfeile zeigen die Positionen der Abbauprodukte von Keracyaninchlorid an. Es wurden 4 Metabolite gefunden. Ein Metabolit hatte ein Absorptionsmaximum bei 260 und 294 nm, ein 2. Metabolit wies ein Maximum bei 281 nm auf. Die Metabolite 3 und 4 hatten ein Absorptionsmaximum bei 400 nm. Aus einem Vergleich mit Retentionszeiten und UV/VIS Spektren von mehreren verwendeten Standards konnte abgeleitet werden, dass das Hauptprodukt des mikrobiellen Abbaus bei 8,44 Minuten 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DBA) ist (Abb.7B). Die 3 übrigen Produkte konnten ohne Massenspektrometrie nicht identifiziert werden.





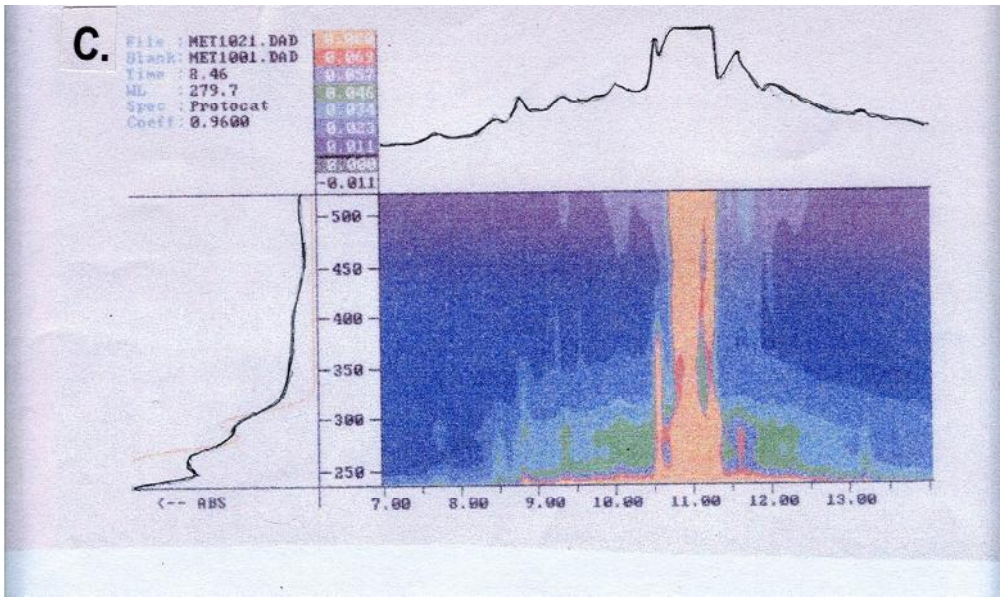


Abb. 7 UV/VIS Spektren und Konturdiagramme des mikrobiellen Abbaus von Keracyaninchlorid durch die intestinale Mikrobiota des Menschen

A: Oben: Inkubation der frischen Faecessuspension zum Zeitpunkt 0

B: Mitte: Inkubat der Faecessuspension nach 8 Stunden. Die Pfeile weisen auf die Positionen der Abbauprodukte des Keracyanins hin

C: Unten: Inkubat mit autoklavierter humaner Faecesprobe

Neuere HPLC/MS/MS-Befunde anderer Arbeitsgruppen ergaben eindeutig, dass 3.4-DBA das hauptsächliche Endprodukt beim mikrobiellen Abbau von Anthocyanen ist [30]. Auf diese durch die intestinale Mikrobiota gebildete Phenolsäure entfallen >70 % der oral aufgenommenen Menge an Anthocyanen. Sie wird nicht nur mit den Faeces (Konzentration etwa

2nmol/g) ausgeschieden, sondern kann auch bereits im Dünndarm und im Kolon resorbiert werden, wodurch eine relativ hohe Konzentration im Blutplasma erreicht wird. Sie kann bei der Ratte und beim Menschen ca. 8-fach höher sein als die der Cyaninglucuronide. Beim Menschen wurden im Blutplasma 3,4-BPA-Werte bis zu 500 nmol/L zwei Stunden nach einer oralen Aufnahme von Anthocyanen bestimmt [31]. Danach fällt der 3,4-DBA-Plasmaspiegel wieder rasch ab, schneller als der der Cyaninglucuronide. Da 3,4-DBA stark antioxidativ wirkt, hat der Nachweis dieser Phenolsäure im Blutplasma die Diskussion antikarzinogener Effekte durch Antioxidantien wieder belebt [31,32]. Gegen eine solche Interpretation spricht aber die Tatsache, dass Quercetin, dessen mikrobieller Abbau nicht zu 3.4-DBA führt, sogar stärkere antikarzinogene Wirkungen zeigt als Cyanidine.

Insgesamt belegen die Ergebnisse aber, dass die intestinale Mikrobiota über eine hohe Kapazität zum Abbau von Anthocyanen verfügt. Sie nutzt die Anthocyane als Substrate zum Energiegewinn und die Abbauprodukte als Bausteine für zahlreiche Synthesen. Anthocyane tragen deshalb ebenso wie andere mikrobiell gut abbaubare Flavonoide zur Stabilisierung einer nicht pathogenen intestinalen Mikrobiota bei und verstärken das Immunsystem.

Literatur

[1] C. A. Williams; R. J. Grayer: Anthocyanins and other flavonoids. Natl. Prod. Rep. **21**, 539-573 (2004).

[2] R. L. Prior; X. Wu: Anthocyanins: structural characteristics that result in uniquemetabolic pattern and biological activities. Free Radic. Res. **40**, 1014-1028 (2006).

[3] L. S. Wang; G. D. Stoner: Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Lett. **269**, 281-290 (2008).

[4] T. K. Mc Glie; M. C. Walton: The bioavailability and adsorption of anthocyanins: towards a better understanding. Mol. Nutr. Food Res. **51**, 702-713 (2007).

[5] T. Ichiyanagi; Y. Shida; M. M. Rahman *et al.*: Metabolic pathway of cyanidin 3-O-β-D-glucopyranoside in rats. J. Agric. Food Chem. **53**, 145-150 (2005).

[6] C. Andres-Lacueva; B. Shukitt-Hale; R. L. Galli *et al.*: Anthocyanins in aged blue berry-fed rats are found centrally and may enhance memory. Nutr. Neurosci. **8**, 111-120 (2005).

[7] S. Talavira; C. Felgines; O. Texier *et al.*: Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. J. Nutr. **133**, 4178-4182 (2003).

[8] C. D. Kay; G. J. Mazza; B. J. Holub: Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. J. Nutr. **135**, 2582-2588 (2005).

[9] S. Passamonti; U. Vrhovsek; A. Vanzo; F. Mattivi: The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. FEBS Lett. **544**, 210-215 (2003).

[10] C. Manach; G. Williamson; C. Morand *et al.*: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in human. I. Review of 97 bioavailability studies. J. Clin. Nutr. **81**, S230-S242 (2005).

[11] G. Mazza; C. D. Kay; T. Cottrell; B. J. Holub: Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. J. Agric. Food Chem. **50**, 7731-7737 (2002).

[12] F. Galvano; L. La Fauci; P. Vitaglione *et al.*: Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. Ann. Ist Super Sanita **43**, 382-393 (2007).

[13] C. D. Kay: Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in human. Nutr. Res. Rev. **19**, 137-146 (2006).

[14] P. C. H. Hollman: Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? J. Sci. Food Agric. **81**, 842-852 (2001).

[15] X. Wu; G. Cao; R. T. Prior: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. J. Nutr. **132**, 1865-1871 (2002).

[16] A. M. Aura; P. Martin-Lopez; K. A. O`Leary *et al.*: In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. Eur. J. Nutr. **44**, 133-142 (2005).

[17] A. R. Moser; H. C. Pitot; W. F. Dove: A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science **247**, 322-324 (1990).

[18] S. J. You; M. Ohmori; M. M. O. Pena *et al.*: Development abnormalities in multiple proliferative tissue of Apc $^{Min/+}$ mice. Int. J. Exp. Pathol. **87**, 227-236 (2006).

[19] G. Jacobasch: Gesundheitsfördernde Wirkungen von Flavonoiden. Sitzungsberichte der Leibniz-Sozietät **80**, 81-90 (2005).

[20] G. K. Harris; A. Gupta; R. G. Nines *et al.*: Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane induced colon cancer and 8-hydroxy-2-deoxy guanosine levels in the Fischer 344 rat. Nutr. Cancer **46**, 125-133 (2001).

[21] G. Lala; M. Malik; C. Zhao *et al.*: Anthocyanin-rich extract inhibit multiple biomarkers of colon cancer rats. Nutr. Cancer **54**, 84-93 (2006).

[22] M. Sonoshita; K. Takaku; N. Sasaki *et al.*: Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc (delta 716) knockout mice. Nat. Med. **7**, 1048-1051 (2001).

[23] K. T. Calamia: Current and future use of anti TNF agents in the treatment of autoimmune, inflammatory disorders. Adv. Exp. Med. Biol. 528, 545-549 (2003).

[24] J. Shao; H. Sheng; H. Inoue *et al.*:Cyclooxygenase-2-expression in coloncarcinoma cells. J. Biol. Chem. **275**, 33951-33956 (2000).

[25] M. Kaneuchi; M. Sasaki; Y. Tanaka *et al.*: Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and Cyclin D1. Int. J. Oncol. 22, 159-164 (2003).

[26] E. Tokunaga; E. Oki; A. Egashira *et al.*: Deregulation of the Akt pathway in human cancer. Curr. Cancer Drug Targets **8**, 27-36 (2008).

[27] C. Wagner; O. Müller: Molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag (2010).

[28] J. Pouysegur; F. Dayan; N. M. Mazure: Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumor regression. Nature **441**, 437-443 (2006).

[29] A. Bach; J. Bender-Sigel; D. Schrenk *et al.*: The antioxidant quercetin inhibits cellular proliferation via HIF-1-dependent induction of p21 Waf. Antiox. Redox Signal. **13**, 437-448 (2010).

[30] H. Keppler; H. U. Humpf: Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. Bioorg. Med. Chem. **13**, 5195-5205 (2005).

[31] P. Vitaglione; G. Donnanrumma; A. Napolitano *et al.*: Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. J. Nutr. **137**, 2043-2048 (2007).

[32] Y. Nakamura; K. Torikai; Y. Ohto *et al*.: A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. Carcinogenesis **21**, 1899- 1907 (2000).

Die Experimente wurden im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke durchgeführt

Adresse der Verfasser: G.K.Jacobasch@t-online.de

Zurück zum Inhaltsverzeichnis