



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Apfelextrakte als Modulatoren der DNA-Methylierung
und Induktoren der Nrf2-ARE assoziierten
antioxidativen Abwehr“

Verfasser

Diplom Lebensmittelchemiker Volker Blust

angestrebter akademischer Grad

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:
Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:
Betreuerin:

A 091 419
Chemie
Univ.-Prof. Dr. Doris Marko

Für meine Eltern und Maik

“Experience is what you get when you didn’t get what you wanted.”
Randy Pausch

Prüfungskommission:

Prof. Dr. M. Cichna-Markl (Vorsitz)

Prof. Dr. D. Marko

Prof. Dr. L. Lehmann

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen März 2008 und Mai 2009 an der Universität Karlsruhe (TH), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie und wurde an der Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie im Februar 2012 vollendet.

Ich danke Fr. Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des interessanten Themas sowie die wertvollen Hilfestellungen für das Gelingen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich den Gutachtern Fr. Prof. Dr. M. Cichna-Markl und Fr. Prof. Dr. L. Lehmann für die Übernahme der Beurteilung meiner Arbeit.

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Der Kolonkanzerogeneseprozess	3
2.2	DNA-Methylierung	4
2.2.1	DNA-Methyltransferasen.....	6
2.2.2	Epigenetische Genregulation.....	9
2.2.3	Hypermethylierung	11
2.2.4	Hypomethylierung.....	13
2.2.5	Inhibitoren der DNA-Methylierung	13
2.2.6	Das Tumorsuppressorgen p16 ^{INK4a}	15
2.3	Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen.....	18
2.3.1	Nrf2-ARE Signalweg.....	20
2.3.2	ARE regulierte Gene	23
2.3.3	Aktivatoren von Phase-II Enzymen.....	30
2.4	Polyphenole	34
2.4.1	Flavonoide	34
2.4.2	Phenolcarbonsäuren.....	40
2.4.3	Biotransformation der Polyphenole durch die mikrobielle Darmflora	42
2.4.4	Polyphenolreiche Apfelsaft-/ Apfeltresterextrakte	44
2.4.5	Chemopräventives Potential von Apfelinhaltsstoffen im Kolon.....	48
2.4.6	Bildung von H ₂ O ₂ im Zellkulturmedium.....	50
3	Problemstellung.....	52
4	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1	Modulation der DNA-Methylierung durch Apfelpolyphenole	54
4.1.1	Wachstumshemmende Eigenschaften von Apfelpolyphenolen.....	54
4.1.2	Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die DNA-Methylierung von p16 ^{INK4a} <i>in vitro</i>	58
4.1.3	Modulation der Transkription und Expression von p16 ^{INK4a} durch Apfelpolyphenole ...	66

Inhaltsverzeichnis

4.1.4	Pilotstudie zur Modulation der DNA-Methylierung von p16 ^{INK4a} in Typ-II Diabetikern	71
4.2	Antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaft- und Apfeltresterextrakten	78
4.2.1	Biologische Aktivität von Apfelsaft- und Apfeltresterextrakten	79
4.2.2	Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs und dessen nachgeschaltete Gentranskription durch AT 4.....	89
4.2.3	Identifizierung bioaktiver Inhaltsstoffe des AT 4	95
4.2.4	Verdauungsmimetischer Ansatz zur Simulation der gastrointestinalen Passage.....	125
4.3	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse.....	142
5	Zusammenfassung	161
6	Material und Methoden	165
6.1	Zellkultur	165
6.1.1	Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	165
6.1.2	Mediumwechsel bei Monolayerkulturen.....	165
6.1.3	Passagieren von Monolayerkulturen.....	165
6.1.4	Einfrieren und Lagern von Zellen.....	167
6.1.5	Auftauen von Zellen	167
6.1.6	Mykoplasmascreening.....	168
6.1.7	Zellzahlbestimmung	169
6.2	Sulforhodamin B-Assay	170
6.3	Untersuchung der Expression von p16 ^{INK4a}	171
6.3.1	Zellinkubation.....	171
6.3.2	Gewinnung der Zellproteine	171
6.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	172
6.3.4	Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (disk SDS-PAGE).....	173
6.3.5	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran und Detektion mittels spezifischer Antikörper (Western Blot).....	176
6.4	Isolierung der genomischen DNA und Gesamt-RNA.....	177
6.5	Bestimmung des Methylierungsstatus und der Transkription von p16 ^{INK4a}	180
6.5.1	Zellinkubation.....	181
6.5.2	Zellaufarbeitung.....	181

Inhaltsverzeichnis

6.5.3	Bisulfitmodifikation	181
6.5.4	Methylierungsspezifische PCR von p16 ^{INK4a}	183
6.6	Transkriptionsanalyse mittels quantitativer Realtime PCR	186
6.6.1	Zellinkubation	186
6.6.2	Reverse Transkription	187
6.6.3	Quantitative Realtime PCR	187
6.7	Dichlorofluorescein (DCF)-Assay	189
6.8	Glutathionbestimmung	191
6.8.1	Zellinkubation	191
6.8.2	Zellaufarbeitung	191
6.8.3	Messung von tGSH	192
6.8.4	Proteinbestimmung mittels Bichinchinoninsäure (BCA)	193
6.9	<i>In vitro</i> Batch Fermentation	194
6.10	Comet Assay	197
6.10.1	Zellinkubation	198
6.10.2	Vorbereiten der Objektträger	198
6.10.3	Zellaufarbeitung	199
6.10.4	Einbettung der Zellen in Agarose	199
6.10.5	Zelllyse	199
6.10.6	Enzymbehandlung (optional)	200
6.10.7	Alkalisierung und Elektrophorese	200
6.10.8	Neutralisation, Färben und Auswertung	200
6.11	Materialienverzeichnis	202
6.12	Geräteverzeichnis	206
7	Literaturverzeichnis	209
8	Anhangsverzeichnis	242

II. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A431	humane Vulvakarzinomzelllinie
ARE	antioxidatives responsives Element
AT 4, AT 9	Apfeltresterextrakt
5-Aza-dC	5-Aza-2'-desoxycytidin
BAE	Bohnapfelextrakt
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
C	Cytosin
C5	Position C-5 von Cytosin
Caco2	humane Kolonkarzinomzelllinie
CAT	Katalase
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
CGA	n-Chlorogensäure
CNC	Cap'n'Collar
CpA	Cytosin-phosphatidyl-Adenosin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CpT	Cytosin-phosphatidyl-Thymin
Cul	Cullin-Protein
CYP	Cytochrom P450
dC	Desoxycytidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH-DA	Dichlorofluorescein-diacetat
DMBA	Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
E2F	Transkriptionsfaktor E2
EpRE	electrophile responsive element
Erk	Extrazellulär regulierte Kinase
FI	Fluoreszenzintensität
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GCL-C	γ -Glutamylcysteinligase, katalytische Untereinheit
GCL-M	γ -Glutamylcysteinligase, modulatorische Untereinheit
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GST	Glutathion-S-transferase
HDAC	Histondeacetylase
HepG2	humane Hepatokarzinomzelllinie
HO	Hämoxygenase
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
mA	Miliampere
MAPKK	mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade
MBD	methyl-bindende Domäne
MeCP	Methyl-CpG-bindende Proteine
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR
MWCO	molecular weight cut-off
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
Neh	Nrf2-ECH-homology region

Abkürzungsverzeichnis

NES	Nuclear exporting signal
NFkB	nukleärer Faktor kappa B
NLS	Nuclear localisation signal
NQO1	NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase 1
Nrf2	Nuclear factor E2-related factor 2
OH8dG	8-Hydroxyguanosin
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	proliferation cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
qPCR	quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGLT1	Natrium-abhängiger Glukosetransporter 1
SOD	Superoxiddismutase
SSA	Sulfosalicylsäure
T	Thymin
tBH	tert.-Butylhydroperoxid
tBHQ	tert.-Butylhydrochinon
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TF	Transkriptionsfaktor
TSG	Tumorsuppressorgen
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator

1 Einleitung

Epidemiologische Studien machen deutlich, dass ein Großteil der Tumorerkrankungen auf exogene Faktoren wie Umwelteinflüsse oder die Ernährung zurückzuführen sind [Farmer et al., 2003; Key et al., 2004]. In Europa zählt der kolorektale Krebs neben Tumoren der Prostata und Lunge bei Männern, sowie Brustkrebs bei Frauen zu den häufigsten Krebsneuerkrankungen [Ferlay et al., 2010]. Besonders im Zuge der Kolonkanzerogenese scheint den Ernährungsgewohnheiten eine bedeutende Rolle zuzukommen [Bingham et al., 2003; Norat et al., 2005; Miller et al., 2010]. So wird laut National Cancer Institute (NCI) eine vorwiegend vegetabile Ernährung, die durch einen geringen Konsum von rotem Fleisch und Alkohol gekennzeichnet ist, mit einem geringeren Risiko an Krebs zu erkranken angesehen [NCI, 2011].

Auch in der Gesellschaft wird der Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln mit einem positiven gesundheitlichen Aspekt in Verbindung gebracht. In vielen europäischen Ländern zählen Äpfel (*Malus* sp., Rosaceae), mit einem durchschnittlichen pro Kopf Verbrauch von 19,2 kg/Jahr, zu den am meisten konsumierten Obstsorten [Statistik-Austria, 2009/10]. Ein Großteil der Apfelernte wird zur Herstellung von Apfelsaft herangezogen, wobei alleine in Deutschland jährlich etwa 100 000 - 300 000 t Naßtrester als Pressrückstand anfallen [Binnig, 2001]. Äpfel stellen aufgrund ihres hohen Polyphenolanteils eine reichhaltige Quelle für sekundäre Pflanzenstoffe dar, die im Hinblick auf eine potentielle chemopräventive Wirkung seit mehreren Jahren im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stehen [Kahle et al., 2005a; Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007b; Gerhäuser, 2008]. Insbesondere für Polyphenole, die während der Apfelsaftherstellung im Trester zurückbleiben, würde eine weitere Nutzung z.B. in Form von Nahrungsergänzungsmitteln oder in funktionellen Lebensmitteln zu einer zusätzlichen Wertschöpfung aus den Nebenprodukten führen.

Als ein Mechanismus der Chemoprävention wird die Reaktivierung hypermethylierter Tumorsuppressorgene diskutiert [Yoo und Jones, 2006]. Für Sojaisoflavone und Polyphenole aus grünem Tee konnte bereits ein demethylierendes Potential *in vitro* gezeigt werden [Fang et al., 2003; Lee et al., 2005]. Der Einsatz von komplexen Pflanzenextrakten hinsichtlich einer Änderung der DNA-Methylierung ist bisher noch wenig untersucht und Stand aktueller Forschung. Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit war der Einfluss von Apfelpolyphenolen auf

den Methylierungsstatus und die Expression des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29, sowie *in vivo* im Rahmen einer Pilotstudie an Typ-II Diabetes Patienten.

Eine weitere Strategie der Chemoprävention stellt die Aktivierung der zelleigenen Abwehrsysteme zum Schutz der Zelle vor oxidativen Noxen dar [Hayes et al., 1999; Hayes und McLellan, 1999]. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress als Initiator der Kanzerogenese wurde bereits mehrfach beschrieben [Guyton und Kensler, 1993; Toyokuni, 1998]. Zahlreiche *in vitro* Studien haben sich bereits mit der Wirkung von Apfelsaftextrakten auf die Induktion der antioxidativen Abwehr beschäftigt, jedoch ist für polyphenolreiche Extrakte aus entpektinisiertem Apfeltrester die Datenlage bisher unzureichend [Bellion et al., 2008; Veeriah et al., 2008; Soyalan et al., 2011]. Daher wurden als weiterer Aspekt dieser Arbeit im Rahmen des FEI/AiF geförderten Projekts: „Bioaktive Inhaltsstoffe mit gesundheitsförderndem Potenzial aus Nebenprodukten der Apfelsaftherstellung und der Apfelpektinengewinnung: *in vitro* Charakterisierung des Wirkprofils und Anreicherung wertgebender Komponenten (AiF-FV 15617 N)“ entsprechende Extrakte auf ein antioxidatives Potential, im Sinne einer Aktivierung der zellulären Abwehr, untersucht. Die Ergebnisse sollen insbesondere für zukünftige *in vivo* Untersuchungen Anhaltspunkte hinsichtlich Wirkprinzip und Identität der Inhaltsstoffe liefern, um ein chemopräventives Potential der Tresterinhaltsstoffe besser beurteilen zu können.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Der Kolonkanzerogeneseprozess

Mit einer durchschnittlichen Erkrankungsrate in Österreich von jährlichen ca. 2800 Fällen gehört der kolorektale Krebs sowohl bei Männern, als auch bei Frauen zu den häufigsten Krebsarten [Statistik-Austria, 2008]. Die Kanzerogenese beschreibt einen mehrstufigen Prozess, bei dem die gesunde Darmmukosa eine Reihe genetischer und epigenetischer Veränderungen erfährt, die zur Entstehung eines Karzinoms führen (Abbildung 1). Dieser Verlauf dauert meist mehrere Jahre und lässt sich in die drei Phasen Initiation, Promotion und Progression gliedern. Während der Initiation ist die gesunde Zelle Kanzerogenen unterschiedlicher Natur (physikalisch, chemisch) ausgesetzt. Durch Mutationen und epigenetische Modifikationen, zu denen die DNA-Methylierung zählt, wird die Transformation einer gesunden Zelle zu einer hyperproliferierenden, präneoplastischen Zelle begünstigt (Adenombildung).

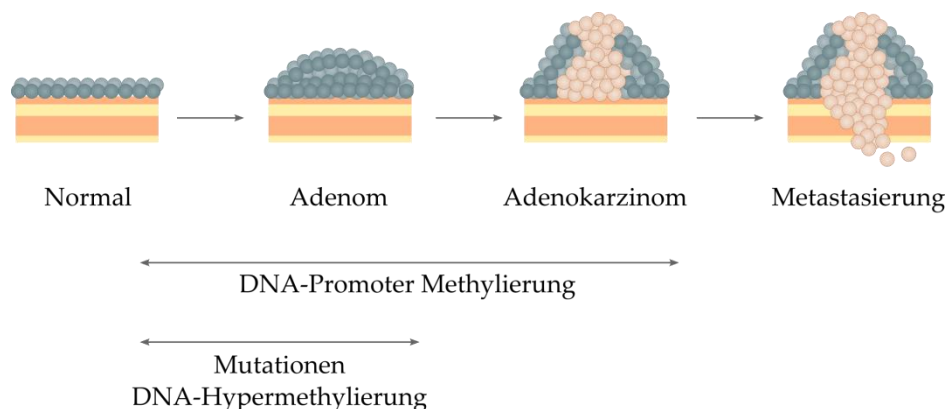


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kolonkanzerogenese [modifiziert nach Gerhäuser, 2008].

Die Ausbildung einer initiierten Zelle ist irreversibel und abhängig von der Dosis des Kanzerogens. Die Promotionsphase ist im Vergleich zur Initiation durch ein vermehrtes Zellwachstum und einem verringerten programmierten Zelltod (Apoptose) gekennzeichnet. Diese Stufe ist reversibel und kann durch ein Entfernen des Stimulus der zur Tumorpromotion führt unterbrochen werden. Während der dritten Phase, der Progression, führen molekulare und

zelluläre Veränderungen irreversibel zum Übergang in einen malignen Phänotyp (Karzinombildung).

Generell ist eine Erkrankung an Krebs mit einer hohen Sterblichkeitsrate verbunden. Der kolorektale Krebs zählt jedoch zu den Krebserkrankungen die stark durch exogene Faktoren beeinflusst werden. So wird häufig ein Zusammenhang zwischen Lebensstil, Umweltfaktoren und vor allem der Ernährung mit der Inzidenz an Darmkrebs zu erkranken beschrieben. Es konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass ein erhöhter Konsum an rotem Fleisch, sowie ein Mangel an Ballaststoffen, an Obst und Gemüse die Entstehung von Dickdarmkrebs begünstigen [Norat et al., 2005; Koushik et al., 2007]. Insbesondere phenolischen Verbindungen, die in Obst und Gemüse enthalten sind, wird ein chemopräventives Potential zugeschrieben (siehe Kapitel 2.4) [Gerhäuser, 2008].

2.2 DNA-Methylierung

Während der Entwicklung von Vorläuferzellen zu somatischen Zellen findet eine Differenzierung statt, die es der Zelle ermöglicht unterschiedliche Funktionen auszuüben. Dies geschieht über ein unterschiedliches Expressionsmuster des genetischen Materials. Folglich besitzt das humane Genom Informationen in zwei unterschiedlichen Formen, den genetischen und epigenetischen (epi: griech. „auf“, „über“, „zusätzlich“). Die genetische Information ist bestimmt durch die Basenabfolge und liefert die Matrizen für die Proteinsynthese. Die Epigenetik hingegen gibt eine Art Anweisung, ob die genetische Information verwendet werden soll und ermöglicht der Zelle Gene je nach Bedarf ein- und auszuschalten [Robertson, 2001]. Dieser Prozess wird erreicht, indem das genetische Material modifiziert wird, ohne die Nukleotidsequenz zu beeinflussen. Epigenetische Modifikationen können in drei Subtypen unterteilt werden: DNA-Methylierung, Histonmodifikation und Umgestaltung der Chromatinstruktur.

Die DNA-Methylierung stellt eine der wichtigsten chemischen Modifikationen an Basen der DNA dar. Sie wurde 1948 erstmals in DNA aus Kalbsthymus entdeckt und beschrieben [Hotchkiss, 1948]. Die DNA-Methylierung kann an der N6 Position von Adenin und an den Positionen N4 und C5 von Cytosin auftreten. Stereochemisch gesehen befindet sich die Methylgruppe in allen Fällen in der großen Furche der DNA-Doppelhelix und besitzt somit keinen Einfluss auf die Basenpaarung der Nukleotide [Hermann et al., 2004]. In höheren Eu-

karyoten wird beinahe ausschließlich eine Modifikation am C5 des Cytosins beobachtet. Analysen des Genoms haben ergeben, dass die C5-Methylierung des Cytosins nicht gleichmäßig erfolgt. So besitzt die DNA Regionen, die stark methyliert sind, unterbrochen durch kaum methylierte Abschnitte [Bird, 1986]. Im Vergleich zum restlichen Genom treten diese Anhäufungen vor allem in Form der Dinukleotide 5' CpG 3' (CpG = Cytosin-phosphatidyl-Guanosin) auf und werden deshalb auch CpG-Inseln genannt. CpA (Cytosin-phosphatidyl-Adenosin) und CpT (Cytosin-phosphatidyl-Thymidin) Dinukleotide spielen in der Epigenetik eine untergeordnete Rolle [Ramsahoye et al., 2000]. Die CpG-Inseln sind für gewöhnlich 0,5 - 5 kbp lang und treten alle 100 kbp bevorzugt in Promotorregionen auf [Das und Singal, 2004; Saxonov et al., 2006]. Annähernd die Hälfte aller Gene des Säuger-genoms besitzen CpG-Inseln, wobei ein einfacher Chromosomensatz etwa 45000 davon beinhaltet [Antequera und Bird, 1993]. Eine Gemeinsamkeit dieser Abschnitte ist, dass sie GC-reich (60 - 70 %) sind und sowohl in nicht-regulierten Genen („housekeeping“-Gen), als auch in Genen mit gewebsspezifischen Funktionen auftreten [Singal und Ginder, 1999].

In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass primitive Keimzellen und embryonale Stammzellen sich entwickeln können, ohne ein erkennbares DNA-Methylierungsmuster aufzuweisen. Sobald die Stammzellen sich jedoch differenzieren ist die DNA-Methylierung essentiell für eine korrekte Weiterentwicklung, da sie unter anderem regelt welche Gene exprimiert werden sollen [Lei et al., 1996; Jaenisch, 1997]. So weisen beispielsweise Gene, die für die genomische Prägung (Imprinting) mitverantwortlich sind, einen besonders hohen Methylierungsgrad auf. Grad und Anzahl der Methylierung innerhalb eines Genabschnitts üben einen großen Einfluss auf die Regulation der Gentranskription der Zelle aus. Ein besonderer Fall stellt hier die Hypermethylierung dar, bei der die CpG-Inseln der Promotorregion überwiegend methyliert vorliegen. Durch die Hypermethylierung entsprechender Promotorbereiche ist es der Zelle nicht mehr möglich die betroffenen Gene zu transkribieren (siehe Kapitel 2.2.2). Damit ist die DNA-Methylierung ein wichtiger Mechanismus der epigenetischen Transkriptionskontrolle [Deaton und Bird, 2011].

In der DNA-Doppelhelix ist Cytosin die komplementäre Base zu Guanin. Untersuchungen haben gezeigt, dass in CpG-Dinukleotiden sowohl der „sense“, als auch der komplementäre „antisense“ DNA-Strang methyliert vorliegen (Abbildung 2). Kommt es nun vor der Zellteilung zur Trennung und anschließenden Verdoppelung der DNA-Einzelstränge ist in jedem

Mutterstrang das ursprüngliche Methylierungsmuster gespeichert. Die Tochterstränge werden anschließend von einer bestimmten Enzymklasse, den DNA-Methyltransferasen (DNMT), methyliert. DNMT binden im Bereich der Replikation und methylieren gemäß dem Leitstrang den neu synthetisierten Tochterstrang. Dadurch wird die Homologie der Methylierung über mehrere Zellgenerationen hinweg gesichert [Robertson, 2001].

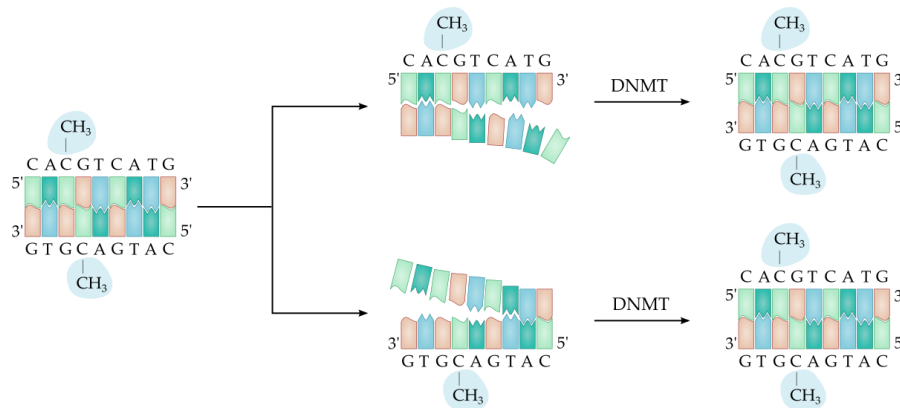


Abbildung 2: Erhaltung des Methylierungsmusters nach der DNA-Replikation, katalysiert durch DNA-Methyltransferase 1 (DNMT) [Modifiziert nach Finnegan et al., 1998].

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass das Methylierungsmuster in Tumorzellen stark von dem nicht entarteter Zellen des gleichen Typs abweicht. Meist ist in Tumoren eine globale Hypomethylierung, was zu einer verstärkten Expression von Onkogenen führt, (siehe Kapitel 2.2.4) und eine regionsspezifische Hypermethylierung (siehe Kapitel 2.2.3) zu finden [Das und Singal, 2004]. Die hypermethylierten CpG-Inseln befinden sich wie zuvor erwähnt bevorzugt in den Promotorabschnitten, so dass die Expression der betroffenen Gene drastisch reduziert ist. Diese Veränderungen der DNA sind reversibel, aber sehr stabil und werden nach der DNA-Replikation an die Tochterzelle weitergegeben. Handelt es sich bei den betroffenen DNA-Sequenzen um Gene der DNA-Reparatur oder der Zellzykluskontrolle, kann die Hypermethylierung schwerwiegende Folgen für die Zelle haben und die Entstehung eines Tumors begünstigen [Robertson, 2001].

2.2.1 DNA-Methyltransferasen

Die Methylierung am C5 des Cytosins wird durch die Enzymfamilie der DNMT katalysiert. Bisher konnten mehrere Isoenzyme identifiziert werden, darunter DNMT1, DNMT3A und DNMT3B, die in Säugetieren den größten Einfluss auf die DNA-Methylierung besitzen

(Abbildung 3) [Das und Singal, 2004]. Generell wird bei der DNA-Methylierung unterschieden ob sie *de novo* erfolgt, oder ob das Methylierungsmuster nach der Replikation vervollständigt wird. DNMT1 besitzt eine 10 – 40-fach höhere Affinität zu hemimethylierter (zur Hälfte methyliert) DNA im Vergleich zu unmethylierter DNA und ist deshalb häufig in proliferierenden Zellen exprimiert [Pradhan et al., 1997; Pradhan et al., 1999].

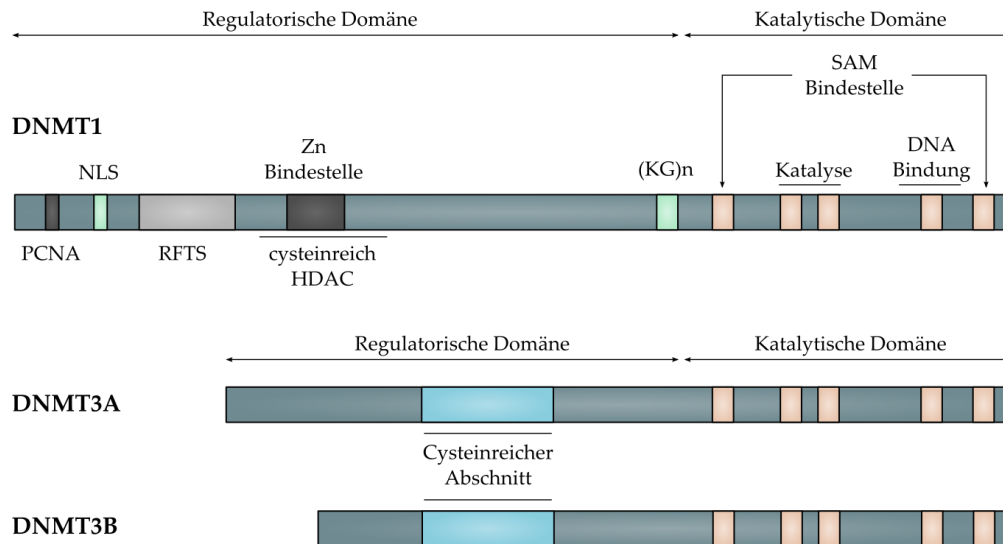


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B [modifiziert nach Robertson, 2001]. PCNA, proliferation cell nuclear antigen; NLS, nuclear localize signal; HDAC, histondeacetylase, (KG)n, Lysin-Glycin-repeated region; SAM, S-adenosyl methionin; RFTS, region foci targeting sequence.

In Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass DNMTs verschiedene Domänen zur Lokalisierung des Replikationskomplexes besitzen und mit dem nukleären Ringklemmprotein (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), das die DNA während der Replikation umgibt, interagieren [Leonhardt et al., 1992; Liu et al., 1998c]. Aus diesem Grund wird DNMT1 oft auch als „erhaltende“ (maintenance) DNMT bezeichnet, da sie für die Kopie des Methylierungsmusters vom parentalen Strang auf den Tochterstrang nach der Replikation zuständig ist. Untersuchungen an DNMT1-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass DNMT1 für eine korrekte Embryonalentwicklung, Imprinting und Inaktivierung des X-Chromosoms essentiell ist. In seltenen Fällen übernehmen bei einem Fehlen von DNMT1 die Isoenzyme DNMT3A/B bis zu einem gewissen Grad dessen Aufgaben [Rhee et al., 2000].

Die Gensequenzen der DNMT3 Familie sind hoch konserviert und stimmen in ihrer Aminosäurezusammensetzung zu etwa 95 % überein [Xie et al., 1999]. In Tierstudien mit DNMT3 und DNMT1 Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass DNMT3 unter anderem für die

de novo Methylierung verantwortlich ist [Lei et al., 1996; Okano et al., 1999]. Tatsächlich besitzt DNMT3 eine gleiche Präferenz für hemimethylierte und unmethylierte DNA. Die katalytische Aktivität von DNMT3 ist im Vergleich zu DNMT1 etwa 20-fach geringer [Okano et al., 1998]. Aufgrund dessen übernimmt DNMT1 hauptsächlich die Aufgabe der „erhalten- den“ (maintenance) und DNMT3A/B der *de novo* Methylierung. DNMT3A methyliert spezifisch nicht-CpG Dinukleotide wie CpA und CpT. Eine genaue Funktion von CpA und CpT ist bislang noch nicht bekannt [Ramsahoye et al., 2000].

Für die Übertragung einer Methylgruppe auf das C5 von Cytosin verwenden alle DNMT als Cofaktor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Die Methylgruppe von SAM ist mit einem Sulfoniumion verbunden. Dies führt strukturell bedingt zu einer thermodynamischen Destabilisierung des Moleküls und bewirkt, dass das relativ inerte Methylthiol des Methionins gut angreifbar für Nukleophile wie Stickstoff, Sauerstoff und Carbanionen wird [Hermann et al., 2004].

Die Reaktion beginnt, indem das Enzym das Cytosin aus der DNA-Helix, über ein so genanntes „Base-Flipping“, nach außen dreht. Hierbei werden die Wasserstoffbrücken zwischen Cytosin und seiner komplementären Base Guanin aufgebrochen und die Base über das Phosphatrückgrat gedreht, bis sie dem aktiven Zentrum des Enzyms zugewandt ist. Nun erfolgt der nukleophile Angriff einer Thiolgruppe des Enzyms am C6 des Cytosins (Abbildung 4).

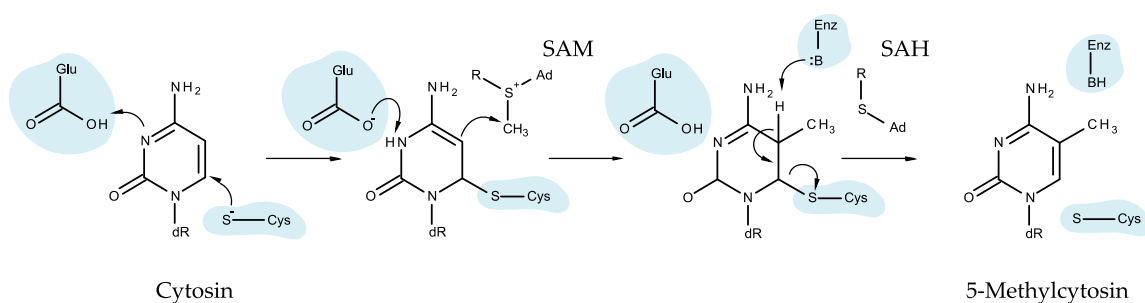


Abbildung 4: Mechanismus der Methylierung von Cytosin durch DNA-Methyltransferasen [modifiziert nach Hermann et al., 2004]. Glu, Glutaminrest; Cys, Cysteinrest; SAM, S-Adenosyl-L-Methionin; SAH, S-Adenosyl-L-Homocystein; Ad, Adenin; dR, Desoxyribose

Dies führt nun zum elektrophilen Angriff der Methylgruppe von SAM am C5 von Cytosin. Unter Abspaltung eines Protons entsteht schließlich das 5-Methylcytosin. Der Mechanismus der Methylgruppenübertragung ist für jede DNA-Methyltransferase identisch [Jeltsch, 2002].

Neben der DNMT-Familie gibt es auch eine Reihe demethylierender Enzyme. Zu ihren Aufgaben gehört das spezifische Ausschneiden methylierter Cytosine und Einfügen eines nicht-methylierten Cytosins [Das und Singal, 2004; Hermann et al., 2004].

Die eukaryotische Zelle ist darauf angewiesen ihr Methylierungsmuster zu verändern, oder fehlgeleitete Methylierungen wieder rückgängig zu machen. Die Demethylierung kann einerseits aktiv oder passiv erfolgen. Bei der passiven Variante wird der Tochterstrang nach der DNA Replikation weniger bis nicht mehr methyliert. Nach Durchlaufen mehrerer Zellzyklen nimmt so der Methylierungsgrad schrittweise ab. Bei der aktiven Demethylierung wird das 5-Methylcytosin mit Hilfe von DNA-Glykosylasen enzymatisch erkannt, ausgeschnitten und durch ein Cytosin ersetzt [Gehring et al., 2009].

2.2.2 Epigenetische Genregulation

Der Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und einer verringerten Gentranskription wurde schon häufig beschrieben [Jones et al., 1998; Jones und Takai, 2001]. Hypermethylierte Promotoren sind meist in ihrer Transkriptionsfunktion stark herunterreguliert oder stillgelegt, in einer verdichteten Chromatinstruktur verpackt und mit hypoacetylierten Kernhistonen assoziiert [Eden et al., 1998; Jones und Laird, 1999]. Eine verringerte Gentranskription kann auftreten, wenn CpG-reiche Regionen des Promotors stark methyliert vorliegen. Einige Transkriptionsfaktoren (TF), wie Aktivator Protein 2 (AP-2), cAMP responsives Element bindendes Protein (CREB), E2F oder der nukleäre Faktor kappa B (NFkB) besitzen CpG-reiche Abschnitte in ihrer Promotorregion, die für eine Bindung mit TF vorgesehen sind [Tate und Bird, 1993]. Durch die geringere Affinität der TF zu stark methylierten DNA-Abschnitten kommt es wiederum zu einer Abnahme der Transkription (Abbildung 5a).

Eine weitere Möglichkeit die Gentranskription zu modulieren ist die Bindung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MeCP), sogenannten Repressorproteinen [Lewis et al., 1992]. MeCP2 wurde als erstes identifiziert. Diese Proteine besitzen zwei Domänen. Die Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) erkennt ein symmetrisch methyliertes CpG Dinukleotid und eine Transkriptionsrepressor-Domäne, die mit weiteren Proteinen interagiert [Nan et al., 1997]. Die Bindung von MBD an ein CpG-Dinukleotid ist sehr sensitiv. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein methyliertes CpG-Dinukleotid ausreichen kann um MBD zu rekrutieren, unabhängig von der restlichen Basenabfolge [Lewis et al., 1992; Nan et al., 1993]. MeCP

verhindern die Transkription durch eine sterische Hinderung der Anlagerung weiterer TF (Abbildung 5b). Darüber hinaus sind MeCP in der Lage Histondeacetylasen zu rekrutieren [Jones et al., 1998; Nan et al., 1998]. Diese können Acetylreste von acetyliertem Lysin vom N-terminalen Histonende entfernen. Aufgrund der Deacetylierung erhält die Aminosäure Lysin eine positive Ladung. Dies erhöht die Affinität des Histonendes für das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA. Aufgrund der stärkeren Anziehung von Histon und DNA führt dies zu einer dichter gepackten Chromatinstruktur (Abbildung 5c). Aufgrund der stärkeren Bindung der Histone an die DNA folgt eine Blockierung der DNA für TF und die Polymerase, woraufhin die DNA-Transkription vermindert wird [Robertson und Wolffe, 2000].

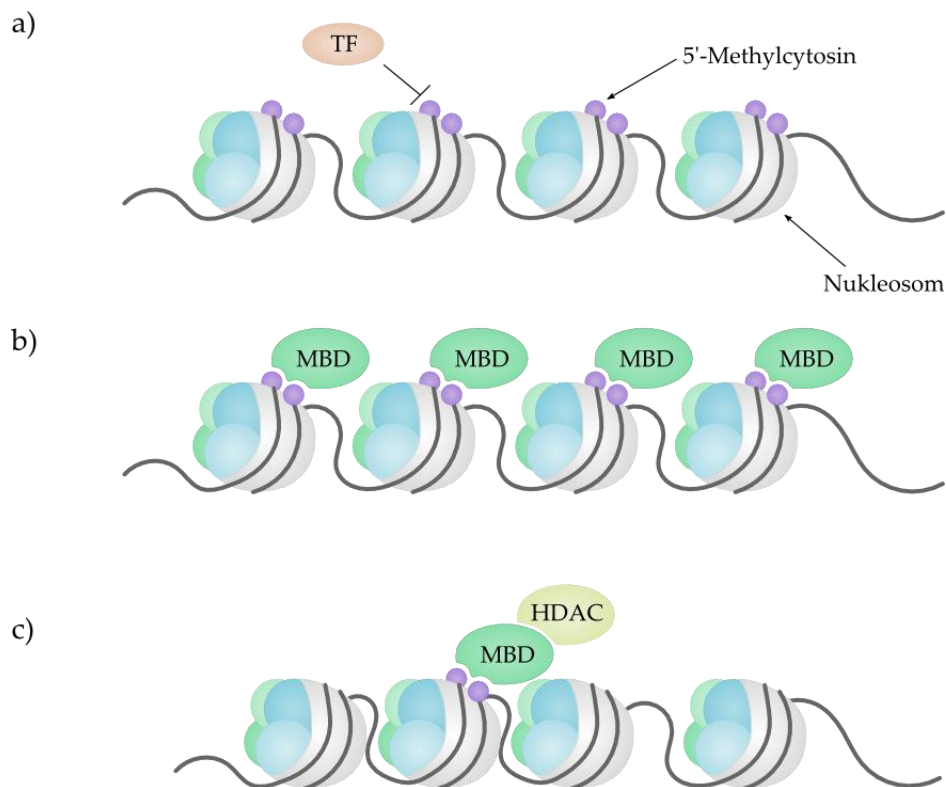


Abbildung 5: Mögliche Mechanismen der Repression durch „Methyl-CpG-bindende“ Domänen (MBD) an der DNA und Modifikation von Histonproteinen innerhalb eines Nukleosoms [modifiziert nach Wade, 2001]. a) Transkriptionsfaktoren (TF) können sich aufgrund verringerter Affinität zu methylierten DNA Sequenzen nicht an die Promotorregion anlagern b) MBD verhindern durch Binden an methylierte DNA-Sequenzen die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren c) MBD rekrutieren Histondeacetylasekomplexe (HDAC) und führen zu einer verdichteten Chromatinstruktur.

2.2.3 Hypermethylierung

In den letzten Jahren ist die Kenntnis krebsrelevanter Gene, deren Promotor im Gegensatz zum nicht-transformierten Gegenstück hypermethyliert vorliegt, stetig gestiegen (Tabelle 1). Eine Hypermethylierung tritt meist in CpG/GpC reichen DNA-Abschnitten, mit der Länge von 1 kb, üblicherweise in der Promotorregion oder nahe des 5'-Endes eines Gens auf. In vielen Tumorarten ist die Hypermethylierung für die epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG), von Genen der Zellzyklusregulation, der DNA-Reparatur oder der Apoptose verantwortlich. Für die Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) 2A/2B, von E-cadherin, humanem Fehlpaarungsreparaturgen (hMLH1) und Retinoblastoma 1 (Rb1) ist ebenfalls eine verstärkte Promotormethylierung in vielen Krebsarten beschrieben [Mizuno et al., 2001].

Tabelle 1: Gene mit anormalem Methylierungsgrad in verschiedenen Krebsarten [Luczak und Jagodzinski, 2006].

Gen	Funktion	Krebstyp	Literatur
APC	Signaltransduktion	Kolon	Hiltunen et al., 1997
CDH1	Zell-Zell Adhäsion	Brust, Prostata, Kolon	Graff et al., 1995; Darwanto et al., 2003
CDKN2A (p16 ^{INK4a})	Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen	Kolon, Lymphom	Herman et al., 1995
hMLH1	DNA Reparatur	Kolon	Veigl et al., 1998
RB1	Transkriptionsrepressor	Retinoblastom	Stirzaker et al., 1997
sFRP1	Signaltransduktion	Kolon	Suzuki et al., 2004
VHL	Angiogenese	Niere, Kolon	Morrissey et al., 2001

Jones und Takai [2001] zeigten, dass in gewissen Fällen methylierte Gene die Gentranskription sowohl erhöhen, als auch erniedrigen können. Es hängt lediglich davon ab, ob die Methylierung positiv oder negativ regulierende Elemente einer Signaltransduktionskaskade inaktiviert. Obwohl eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in nahezu allen Tumoren vorkommt, ist sie bei gewissen Genen jedoch tumorspezifisch. Aufgrund dessen ist Gegenstand aktueller Forschung den Methylierungsgrad einzelner Gene als potenziellen Biomarker für bestimmte Tumore heranzuziehen.

Es stellt sich die Frage, warum eine verstärkte Methylierung während der Kanzerogenese auftritt. Gene, die bei kolorektalem Krebs häufig durch eine dichte Promotormethylierung gekennzeichnet sind, scheinen für diese Veränderung prädisponiert durch den Alterungsprozess [Toyota et al., 1999]. Es zeigte sich, dass diese Gene in normalem Gewebe wenig methyliert vorliegen. Mit zunehmendem Alter steigt der Methylierungsgrad stetig an und erreicht in Krebszellen ein Maximum.

Eine erhöhte Transkription und Expression von DNMT1/3A/3B korreliert häufig mit einer Hypermethylierung CpG-reicher Promotorregionen und ist mit einem kompletten Verlust der Proteinexpression entsprechender Gene in Krebszellen beschrieben [Mizuno et al., 2001; Rhee et al., 2002]. Dennoch kann dies nicht der einzige Grund für die verstärkte Methylierung sein, denn neben der regionalen spezifischen Hypermethylierung von Promotoren besteht meist zusätzlich eine globale Hypomethylierung der DNA, die nicht ohne Weiteres mit einer erhöhten Expression von DNMTs erklärt werden kann [Lengauer et al., 1997; Baylin et al., 1998; Robertson et al., 1999].

Da die Hypermethylierung schon in einem sehr frühen Stadium der Kanzerogenese nachweisbar ist, werden betroffene Gene mehrfach als Tumormarker herangezogen. Durch Überprüfung des Methylierungsstatus mittels methylierungsspezifischer PCR können hypermethylierte Gene in Gewebeproben nachgewiesen werden [Herman et al., 1996]. Park et al. [2007] zeigten, dass einzelne Tumorarten spezifische Methylierungsmuster aufweisen. Die Frage, warum gewisse Gene in Tumoren hypermethyliert vorliegen und manche wiederum nicht, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein Grund dafür könnte ein Vorteil während der natürlichen Selektion der Tumorzelle sein. Durch das Abschalten von spezifischen Genen sichert sie sich einen Überlebensvorteil, der sich schließlich durchsetzt. Die Zelle besitzt verschiedene Mechanismen sich vor einer CpG-Hypermethylierung zu schützen. Durch Veränderungen der Chromatinstruktur wird beispielsweise der Zugang von DNA-Methyltransferasen zur DNA verhindert. Zusätzlich ist die Zelle in der Lage, die DNA bis zu einem gewissen Grad zu demethylieren. Die Möglichkeiten einer Hypermethylierung entgegenzuwirken sind jedoch eingeschränkt [Das und Singal, 2004].

2.2.4 Hypomethylierung

Eine globale Hypomethylierung genomischer DNA stellt eine weitere Form von Methylierungsdefekten dar und konnte in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden. Sie ist im Gegensatz zur Hypermethylierung nicht nur auf CpG-Dinukleotide beschränkt und wird mit der Überexpression von Protoonkogenen, Wachstumsfaktoren und Mediatoren der Zellproliferation, Invasion und Metastasierung in Verbindung gebracht. Hierbei kommt es zu einer Expression von Genen, die in nicht entarteten Zellen normalerweise stillgelegt sind. Die Expression von tumorrelevanten Genen wie beispielsweise Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und Heparanase werden aufgrund einer DNA-Hypomethylierung induziert [Szyf et al., 2004; Steele et al., 2005].

Die Ursachen zur Entstehung einer globalen Hypomethylierung sind bisher noch unklar. Es wird vermutet, dass eine Störung zellulärer Vorgänge zur Übertragung von Methylgruppen besteht. Die Tatsache, dass Hypomethylierung und Hypermethylierung nebeneinander in vielen Tumorarten auftreten spricht jedoch gegen eine Veränderung der DNMT-Aktivität [Luczak und Jagodzinski, 2006].

2.2.5 Inhibitoren der DNA-Methylierung

Die Methylierung am C5 des Cytosins spielt eine entscheidende Rolle in der Epigenetik und Kontrolle der Genexpression. Wie bereits erwähnt ist diese Methylierung vor allem in der Promotorregion tumorrelevanter Gene zu finden (Kapitel 2.2.2). Aufgrund von Hypermethylierung kommt es zu einer Stilllegung dieser Gene.

Die epigenetische Information in Form der DNA-Methylierung muss jedoch nach jeder Zellteilung aktiv durch DNMT wiederhergestellt werden. Diesen Schritt macht sich die moderne Tumorthherapie zu nutze. Eine Reaktivierung dieser Gene durch Unterbinden der Methylierung stellt ein vielversprechendes Gebiet, sowohl der Krebsprävention, als auch der Chemotherapie dar [Chuang et al., 2005; Stresemann et al., 2006].

Zu den am besten untersuchten Inhibitoren der DNMT gehören 5-Azacytidin (5-Aza-C) und 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) die in Abbildung 6 dargestellt sind. Sie wurden schon in den 80er Jahren beschrieben und gehören zur Klasse der nukleosidanalogen Methylierungsinhibitoren [Bender et al., 1998]. Aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft mit Cytidin wer-

den sie bei der Replikation ebenfalls in die DNA eingebaut. DNA-Methyltransferasen erkennen 5-Aza-C/dC als natürliche Substrate und versuchen eine Methylgruppe zu übertragen. Dabei entsteht eine stabile kovalente Enzym-Substratbindung. Durch den strukturellen Unterschied der Analoga zu Cytidin kann die kovalente Bindung jedoch nicht mehr gelöst werden, worauf das Enzym an der DNA gebunden bleibt und im weiteren Verlauf abgebaut wird [Bender et al., 1998].

In vitro Untersuchungen zeigten, dass bei Konzentrationen von 10 μ M 5-Aza-C etwa 5 % des Gesamtcytidins der neu synthetisierten DNA durch 5-Aza-C ausgetauscht wurde. Die daraus folgende Bindung und Degradierung der DNA-Methyltransferasen führte zu einer Verringerung der DNA-Methylierung um 80 - 85 % [Santi et al., 1984]. 5-Aza-C und 5-Aza-dC sind beide zytotoxisch und ihre Wirkungen sind nicht nur auf die Reaktion mit DNA-Methyltransferasen beschränkt. Wegen ihrer Ribonukleosidstruktur werden sie ebenfalls in RNA eingebaut und haben einen Einfluss auf die Proteintranslation [Santi et al., 1984].

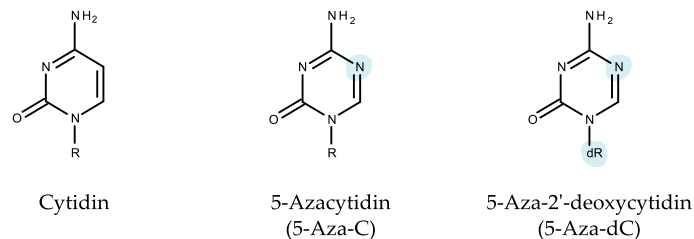


Abbildung 6: Cytidin und seine analogen DNA-Methyltransferaseinhibitoren. R, Ribose; dR, Deoxyribose; C, Cytidin; dC, Desoxycytidin.

Da nukleosidanaloge Inhibitoren *per se* oft zytotoxisch sind, gewinnen nichtnukleoside Demethylierungsagenzien wie (-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG), Hydralazin und Procainamid zunehmend an Bedeutung [Lee und Zhu, 2006]. Sie werden nicht in die DNA eingebaut, sondern verringern über einen primären oder sekundären Mechanismus die Aktivität der DNA-Methyltransferasen. Procainamid stört beispielsweise die Interaktion zwischen Enzym und Substrat. EGCG, ein Polyphenol, welches vor allem in grünem Tee enthalten ist, inhibiert über einen sekundären Mechanismus die Methyltransferasen. Fang et al. [2003] haben gezeigt, dass pflanzliche Polyphenole die DNA Methylierung beeinflussen können und so ein chemoprotektives Potential besitzen. Viele Polyphenole besitzen eine Catecholstruktur (siehe Kapitel 2.4). Dies macht sie zum Substrat der Catechol-O-Methyltransferase (COMT), einem Enzym des Fremdstoffmetabolismus. Das Enzym überträgt eine Methylgruppe vom

Cosubstrat S-Adenosylmethionin (SAM) auf phenolische Hydroxylgruppen. SAM wird dabei in S-Adenosylhomocystein (SAH) überführt. SAH gilt als nicht-kompetitiver Inhibitor der DNA-Methyltransferasen. Somit kommt es bei einer Metabolisierung von Polyphenolen durch die COMT zu einer Akkumulation von SAH und im Folgenden zur unterdrückten Methylierung neu synthetisierter DNA nach der Replikation [Fang et al., 2003]. Ob die Inhibition der Methyltransferasen durch steigende SAH-Level durch eine allosterische Hemmung, oder aufgrund einer geringeren Verfügbarkeit von SAM zustande kommt, kann nicht eindeutig beantwortet werden.

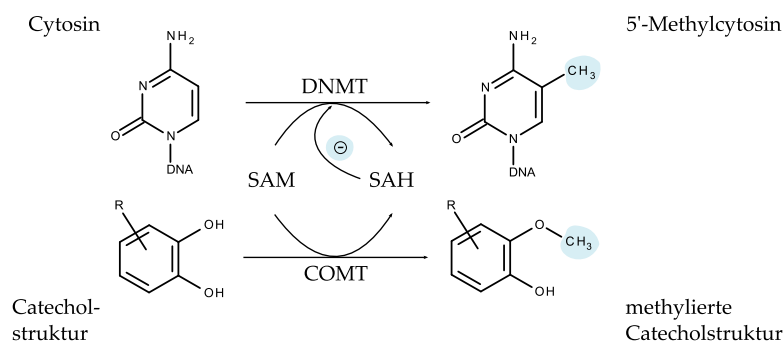


Abbildung 7: SAH Feedback-Inhibition der DNMT nach Lee und Zhu [2006]. COMT, Catechol-O-Methyltransferase; DNMT, DNA-Methyltransferase; SAH, S-Adenosylhomocystein; SAM, S-Adenosylmethionin.

Bezüglich eines demethylierenden Potentials ist die Wirkstärke der nicht-nukleosiden Methylierungsinhibitoren, im direkten Vergleich zu 5-Aza-C / 5-Aza-2'-dC, signifikant geringer. Da Polyphenole jedoch in oft konsumierten Lebensmitteln wie z.B. Obst, Gemüse und grünem Tee vorkommen, ist ein protektiver Effekt durch die Aufnahme kleiner Mengen über einen längeren Zeitraum hinweg nicht auszuschließen [Fang et al., 2003].

2.2.6 Das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}

Das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} wurde 1993 von Xiong et al. das erste Mal beschrieben. Das Protein besitzt mehrere Isoformen, die mit dem Buchstaben a - d abgekürzt werden, wobei die Ziffern hinter dem „p“ jeweils die Größe in Kilodalton (kD) angibt. Sie werden zur INK4-Familie gezählt, da alle CDK 4 und 6 inhibieren [Xiong et al., 1993]. Somit kommt den Proteinen der INK4 Familie eine Schlüsselfunktion beim Übergang der Zelle von der G1- in

die S-Phase zu. In der Literatur ist p16^{INK4a} ebenfalls unter den Namen CDKN2a (zyklinabhängiger Kinaseinhibitor) oder MTS1 (multipler Tumorsuppressor 1) zu finden.

Das humane p16^{INK4a} Gen ist auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 lokalisiert und codiert ein Protein mit einer Länge von 156 Aminosäuren und einer Größe von ca. 16 kDA. Es beinhaltet vier Ankyrin-Wiederholungen für Protein-Protein Wechselwirkungen [Ruas und Peters, 1998]. Diese Ankyrin-Sequenzen bilden eine konkave Struktur und binden die nicht-katalytische Domäne der CDK/Zyklus D Enzymkomplexe, die für die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) und das Durchlaufen des Zellzyklus verantwortlich sind [Brotherton et al., 1998; Russo et al., 1998].

Der Zellzyklus besitzt Kontrollpunkte (Restriktionspunkte), an denen ein fehlerfreies Ablau-
fen des Zellzyklus überprüft wird. Sie befinden sich in der G1-Phase, am Übergang von G2 zu M (G2/M-Kontrollpunkt) und in der M-Phase (Spindelkontrollpunkt). Das Passieren der Kontrollpunkte erfolgt durch periodische Aktivierung spezifischer Serin-Threonin-Proteinkinasen mit einer regulatorischen (Zyklus) und katalytischen Untereinheit (CDK). Für das Fortschreiten des Zellzyklus sind diese Kinasen essentiell.

Im Gegensatz zu Einzellern verbleiben Säugerzellen in einem Ruhezustand (G0-Phase) und proliferieren nur auf extrazelluläre Signale hin. D-Zykline sind die ersten bekannten Zykline, die synthetisiert werden, wenn Zellen mit Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Der Komplex aus CDK4/6 und Zyklus-D ist darüber hinaus für die Phosphorylierung von Rb verantwortlich (Abbildung 8).

Das Rb-Protein reguliert die Zellproliferation, indem es Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F bindet und ablöst, die einen Übergang in die S-Phase bewirken [Jin et al., 1995]. Das p16^{INK4a}-Protein bindet kompetitiv an das aktive Zentrum von CDK4 und CDK6 und verhindert somit die Anlagerung an ein D-Zyklus. Auch bei bereits assoziierten CDK/D-Zykluskomplexen senken INK4-Proteine deren Enzymaktivität ohne die bestehenden Komplexe aufzuheben [Ruas und Peters, 1998]. Ein Anstieg von p16^{INK4a} führt zur Akkumulation von inhibiertem CDK/p16-Komplex und zu einem Verlust von CDK/Zyklus-D. Als Folge wird freies Zyklus-D nach Ubiquitinierung dem proteosomalen Abbau zugeführt [Diehl et al., 1997]. E2F liegt nicht mehr frei als Transkriptionsfaktor vor und die Zelle kann den Restriktionspunkt nicht überschreiten. Es folgt ein vorübergehender Zellzyklusarrest in G1 [Rocco und Sidransky, 2001].

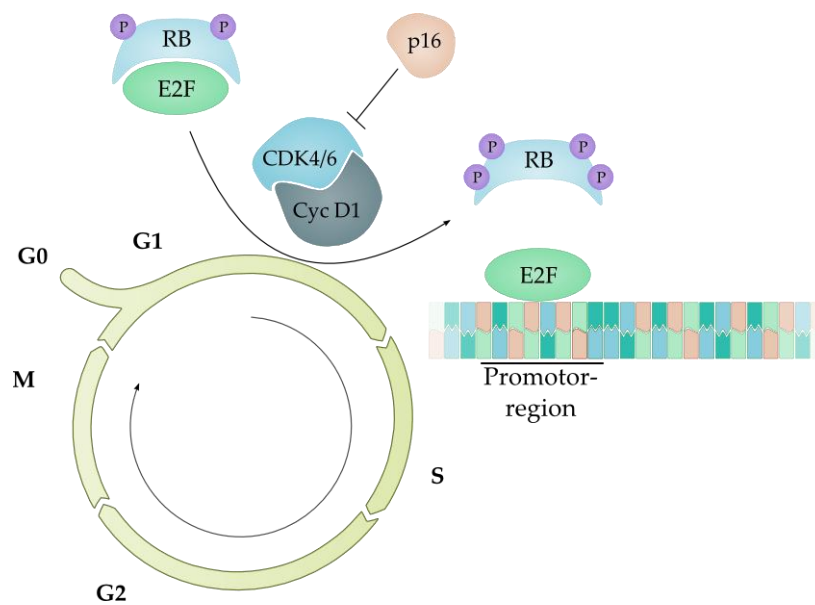


Abbildung 8: Einfluss von p16^{INK4a} (CDKN2a) beim Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase. Durch Bindung der Zyklin D1 (Cyc D1) an die Zyklin-abhängige Kinasen (CDK) 4 und 6 kommt es zur Phosphorylierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressorproteins (RB) und Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F [modifiziert nach Ruas und Peters, 1998]. G0/1/2, Ruhephasen (gap); S, Synthesephase; M, Mitosephase.

Aufgrund der Aufgabe von p16^{INK4a} bei der Kontrolle des Zellzyklus zeigt sich deutlich die Eigenschaft als Tumorsuppressor. Zahlreiche Studien an primären Tumoren zeigten eine inverse Korrelation zwischen p16^{INK4a} und phosphoryliertem Rb [Guo et al., 2000; Kato et al., 2000; Moller et al., 2000]. So sind in vielen Tumorzelllinien und Tumoren Gene der INK4-Familie, allen voran p16^{INK4a}, durch Methylierung GC-reicher Abschnitte der Promotorregion stillgelegt [Reed et al., 1995]. Hypermethylierung von p16^{INK4a} konnte bereits in prämaligen Stadien der Kanzerogenese nachgewiesen werden. Der damit einhergehende Verlust der Expression erlaubt der Zelle kritische Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus zu passieren. Genetische Veränderungen, die im weiteren Verlauf zur Immortalisierung der Zelle führen werden nicht mehr erkannt [Belinsky et al., 1998; Nuovo et al., 1999; Wong et al., 1999].

2.3 Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen

Für Organismen, die unter aeroben Bedingungen leben, ist die Exposition gegenüber freien Radikalen unvermeidbar. Freie Radikale sind häufig Sauerstoffverbindungen und besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen. Diese sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) umfassen eine Vielzahl teilweise reduzierter Sauerstoffmetabolite, die im Vergleich zu molekularem Sauerstoff eine erhöhte Reaktivität aufweisen. Sie können zum einen endogen bei Stoffwechselprozessen oder durch exogene Einflüsse wie Strahlung, Ernährung oder Luftverschmutzung gebildet und aufgenommen werden. Endogen stellt die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette in den Mitochondrien die größte Quelle an ROS dar, in der normalerweise Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Dies geschieht über insgesamt vier Reaktionsschritte bei denen jeweils ein Elektron übertragen wird. Etwa 5 % des inhalierten O_2 wird in ROS wie beispielsweise Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($\cdot OH$) überführt. Molekularer Sauerstoff weist zwei ungepaarte Elektronen mit parallelem Spin auf. Daher wird er häufig als Diradikal angesehen, besitzt jedoch aufgrund der hohen Aktivierungsbarriere keine erhöhte Reaktivität gegenüber anderen Molekülen.

Aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten der Radikale stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung diese zu eliminieren. Das Hydroxylradikal besitzt unter den genannten ROS mit die höchste Reaktivität und reagiert unmittelbar am Entstehungsort mit benachbarten Molekülen ab. Eine gezielte Detoxifizierung ist in diesem Fall nur eingeschränkt möglich. Im Gegensatz dazu ist das Superoxidradikalanion mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden relativ stabil. Aus toxikologischer Sicht ermöglicht dies eine Diffusion weg vom Bildungsort und eine Schädigung anderer Zellbestandteile.

Oxidativer Stress ist definiert als Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Erstgenannten. Dies führt intrazellulär zu einem Anstieg von freien Radikalen. Intrazelluläre ROS reagieren unspezifisch mit allen Zellbestandteilen, darunter Membranlipide, Nukleinsäuren und Proteine. Diese Reaktionen können zu einer veränderten Membranfluidität, gestörten Transportvorgängen, Verlust der Enzymaktivität oder DNA-Schäden führen. Da ROS häufig im Bereich von Membranen gebildet werden (z.B. Mitochondrium) stellt die Lipidperoxidation eine der häufigsten Veränderungen dar [Halliwell

und Gutteridge, 1990]. Vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind gegenüber einer Oxidation besonders anfällig [Toyokuni, 1998].

Ferner sind ROS in der Lage mit DNA zu interagieren und führen zu DNA-Strangbrüchen, Modifikationen an Purin-, Pyrimidinbasen, dem Desoxyriboserrückgrat und zu DNA-Quervernetzungen [Klaunig und Kamendulis, 2004]. Persistente DNA-Schäden, die die Transkription und Signaltransduktionskaskaden beeinflussen, konnten in vielen Tumoren nachgewiesen werden [Herrlich et al., 1992]. So wurde für das Hydroxylradikal gezeigt, dass es zu oxidierten DNA-Läsionen führt wenn es in der Nähe der DNA gebildet wird [Marnett, 2000]. Darüber hinaus zeigt H_2O_2 , ein Precursor des Hydroxylradikals, ebenfalls ähnliche Eigenschaften, trotz geringerer Reaktivität [Guyton und Kensler, 1993; Barber und Harris, 1994]. Die wohl bekannteste oxidierte Base ist 8-Hydroxydesoxyguanosin (OH8dG). Diese Modifikation ist in vielen mutierten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zu finden und führt zu einer Transversion der DNA-Base G nach T [Shibutani et al., 1991; Moriya, 1993; Hussain und Harris, 1998].

In der Literatur werden eine Vielzahl von Krankheiten mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht - dazu gehören Alzheimer, Parkinson, Arteriosklerose und Krebs [Sies, 1993; Weitzman et al., 1994]. Um diesen Erkrankungen vorzubeugen besitzt die Zelle mehrere Mechanismen zur Regulation des endogenen Redoxstatus. Dieser Schutzmechanismus besteht zum einen aus niedermolekularen Verbindungen (small molecules), die befähigt sind freie Radikale abzufangen. Hierzu zählen Ascorbinsäure, α -Tocopherol, und reduziertes Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH). α -Tocopherol befindet sich in der Zellmembran und Plasmalipoproteinen. Dort besitzt es eine Funktion als Unterbrecher der Lipidperoxidation [Blake et al., 1987]. Hierbei entsteht ein Tocopherolradikal und kann im weiteren Verlauf mithilfe von GSH, unter Bildung von oxidiertem GSH (GSSG), wieder zu α -Tocopherol reduziert werden. Ascorbinsäure ist unter anderem an der Entgiftung von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 über die Haber-Weiss Reaktion beteiligt [Halliwell und Gutteridge, 1990].

Neben zelleigenen Antioxidantien, wie Glutathion besitzt die Zelle eine Reihe von antioxidativ wirksamen und detoxifizierenden Enzymen. Die Hauptaufgabe dieses Enzymapparats ist eine Umwandlung von lipophilen Xenobiotika in einen hydrophilen Metabolit. Sie gehören zu den Phase-I und Phase-II Reaktionen der Biotransformation. Die Phase-I Reaktionen (Funktionalisierungsreaktionen) werden meist durch Cytochrom-P450 abhängige Monooxy-

genasen katalysiert. Zu den Enzymen des Phase-II Metabolismus (Konjugationsreaktionen) zählen die Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT), Enzyme der Glutathionhomöostase und Oxidoreduktasen. Sie bilden einen sich gegenseitig unterstützenden Verteidigungsmechanismus gegen ROS und hochreaktive Intermediate. Im Fall von oxidativem Stress wirken sie entweder direkt mit den Radikalen, teilweise unter Verwendung von Kofaktoren wie GSH, oder sind an der Synthese weiterer Antioxidantien beteiligt.

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Reihe dieser detoxifizierenden Enzyme, durch die Gabe verschiedener Xenobiotika, induzierbar sind und auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. So besitzen sie in ihrer Promotorregion funktionelle Elemente, welche die Transkription maßgeblich beeinflussen. Zu diesen Elementen zählt mitunter das Antioxidative Responsive Element (ARE), auch als Elektrophiles Responsives Element (EpRE) bekannt [Rushmore et al., 1990; Rushmore et al., 1991]. Die Transkription ARE regulierter Gene ist primär abhängig von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NF-E2-related factor 2 (Nrf2). Der Mechanismus der Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs wird in Kapitel 2.3.1 näher erläutert.

2.3.1 Nrf2-ARE Signalweg

Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem erhöhten Risiko an DNA-Schäden, neurodegenerativen Erkrankungen, Arteriosklerose und Krebs zu erkranken wurde mehrfach beschrieben [Lee und Johnson, 2004]. Um diesen Risiken entgegenzuwirken besitzt die Zelle einen aufwändigen Abwehrmechanismus, einschließlich der Phase-I/II Entgiftungsenzyme und antioxidative Proteine wie die des Glutathionsystems [Ishii et al., 2002]. Für Enzyme des Phase-I Metabolismus konnte der Ah-Rezeptor, sowie eine Aktivierung über das Xenobiotische Responsive Element (XRE) beschrieben werden.

Für viele Phase II Enzyme wurde das ARE, ein kleiner DNA-Abschnitt im Bereich von Promotorregionen, identifiziert. Es repräsentiert eine cis-regulatorische Sequenz in der 5'-Region der DNA. Die Kernsequenz des ARE wurde wie folgt definiert: 5'-TGACnnnGCA-3', wobei „n“ beliebige Basen darstellen [Rushmore et al., 1991]. Nrf2 erkennt spezifisch das ARE im Bereich der Promotorregion entsprechender Zielgene [Yu und Kensler, 2005]. Der TF wird in nahezu allen Geweben exprimiert, jedoch ist die Expression in Geweben, die an der Detoxi-

fizierung beteiligt sind (Leber, Niere) oder mit der externen Umgebung Kontakt haben (Haut, Lunge, Gastrointestinaltrakt) am höchsten [Moi et al., 1994; Motohashi et al., 2002].

Unter normalen Bedingungen liegt Nrf2 unter Dimerbildung im Zytoplasma an Keap1 (Kelch-ähnlichen ECH-assoziierten Protein 1) gebunden vor [Tong et al., 2006a]. Keap1 dient als Substrat-Bindungsprotein einer E3-Ubiquitin-Ligase, die zur ständigen Ubiquitinierung von Nrf2 und im weiteren Verlauf zum proteosomalen Abbau führt [Cullinan et al., 2004; Copple et al., 2008].

Wird das Nrf2/Keap1-Heterodimer Stressoren wie ROS ausgesetzt führt dies zu einem Abdissoziieren von Nrf2. Als Folge wird Nrf2 nicht mehr dem proteosomalen Abbau zugeführt und akkumuliert im Zytosol. Freies Nrf2 kann nun in den Zellkern translozieren. Für die Dissoziation von Nrf2 und Keap1 werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Zum einen besitzt Keap1 reaktive Cysteinreste, die Protein-Protein Quervernetzungen ausbilden. Bei einer Reaktion mit Elektrophilen führt dies zur Spaltung des Nrf2/Keap1 Komplexes [Wakabayashi et al., 2004].

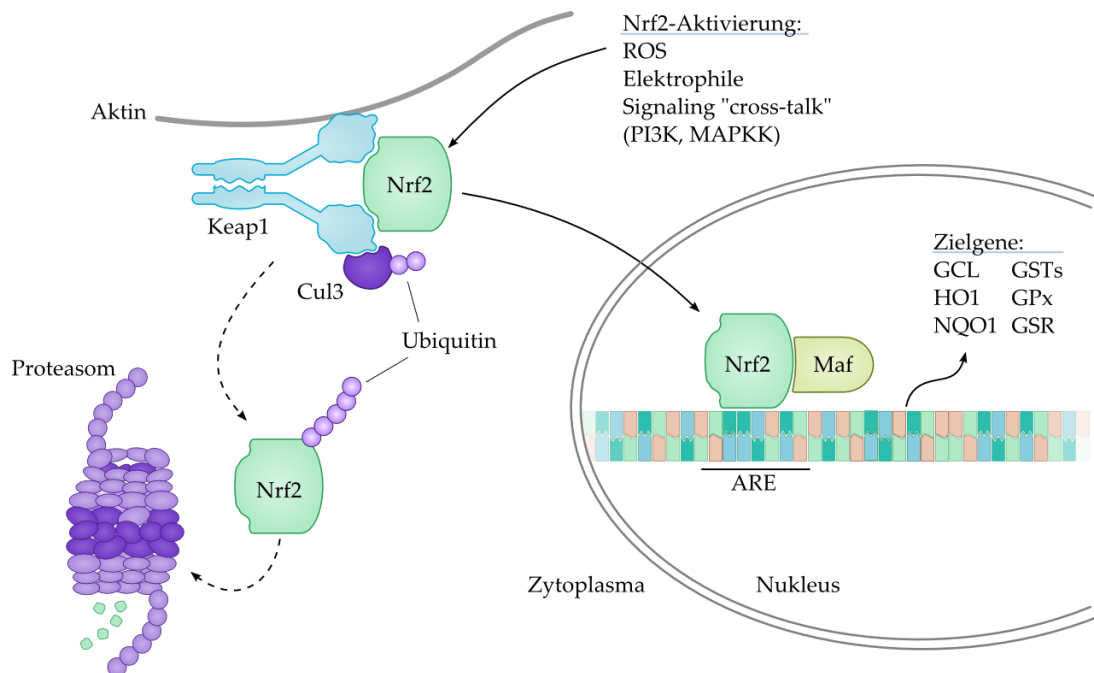


Abbildung 9: Der Nrf2-ARE-Signalweg [modifiziert nach Osburn und Kensler, 2008]. ARE, antioxidant responsive element; GCL, γ -Glutamylcysteinyligase; GPx, Glutathionperoxidase; GSR, Glutathionreduktase; GST, Glutathion-S-transferase; HO1, Hämoxxygenase 1; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; Nrf2, erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2; NQO1, NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase 1; Maf, Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma protein.

Als zweiter Mechanismus werden sekundäre Sensorproteine und eine Transaktivierung weiterer Signalwege die zur Phosphorylierung von Nrf2 führen, diskutiert. Diese Phosphorylierung führt zur Dissoziation des Nrf2/Keap1 Komplexes und erhöht die Stabilität von Nrf2 [Huang et al., 2002; Copple et al., 2008].

Im Zellkern dimerisiert Nrf2 mit kleinen Proteinen der Maf-Familie. Diese Dimerisierung führt zur Bindung von Nrf2 an ARE und Aktivierung der Transkription responsiver Zielgene [Motohashi et al., 2004].

2.3.1.1 Aufbau von Nrf2 und Keap1

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 (erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2) gehört mit Nrf1 und Nrf3 zur Familie der Cap ‚n‘ Collar (CNC) Proteine. Er ist etwa 66,9 kDa schwer und setzt sich aus 605 Aminosäuren zusammen. Nrf2 wird in 6 Abschnitte, Neh-Domänen 1-6, unterteilt. Nahe dem C-terminalen Ende besitzt das Protein eine basische Leucin-Zipper Struktur (Neh1), die für die Dimerisierung und Anlagerung an ARE verantwortlich ist [Moi et al., 1994; Itoh et al., 1995]. Die Neh2-Domäne hat eine negativ regulierende Funktion und ist für die Interaktion mit Keap1 zuständig [Itoh et al., 1999].



Abbildung 10: Der Transkriptionsfaktor Nrf2 [modifiziert nach Itoh et al., 1999].

Im Kern dimerisiert Nrf2 mit kleinen Maf-Proteinen [Tong et al., 2006b]. Dieses Dimer besitzt über die Neh1-Domäne eine hohe Affinität zu ARE und ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Ausbildung des Nrf2/DNA Komplexes [Itoh et al., 1997]. Nach weiterer Anlagerung transkriptionsabhängiger Kofaktoren wie das „cAMP responsive Element bindende Protein“ (CREB) durch die Domänen Neh4 und Neh5 erfolgt die Transkription relevanter Zielgene. Neh 6 ist verantwortlich für den proteosomalen Abbau [Katoh et al., 2001; Zhu und Fahl, 2001; Lin et al., 2006].

In Abwesenheit von oxidativem Stress liegt Nrf2 im Zytosol kovalent an einen Inhibitor, dem Keap1 gebunden vor [Itoh et al., 1999]. Keap1 ist fest an Aktinfilamenten des Zytoske-

letts assoziiert [Kang et al., 2004]. Das Protein ist 624 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von 69,5 kDa und kann in 5 Regionen unterteilt werden [Holtzclaw et al., 2005].



Abbildung 11: Struktureller Aufbau von Keap1 [modifiziert nach Holtzclaw et al., 2005]. BTB, Braodcomplex, Tramtrack, Bric-à-brac Domäne; DGR, Double glycine repeat Domäne; IVR, "intervening region".

Die BTB-Domäne („Bric-a-brac, tram-track, broad complex“) dient der Protein-Protein Interaktion und ist wichtig für die Dimerisierung zweier Keap1 Moleküle, sowie der Rekrutierung eines Cullin-abhängigen E3 Ubiquitinligase-Komplexes [Cullinan et al., 2004]. Dieser dient der permanenten Ubiquitinierung von gebundenem Nrf2 und Abbau durch das Proteasom. Die „Double glycine repeat“-Domäne (DGR) besteht aus sechs sich wiederholenden Kelch-Motiven die dem Protein eine β -Propeller Struktur verleihen und dient als Bindungsstelle der Neh2 Region von Nrf2 und der Aktinfilamente des Zytoskeletts [Holtzclaw et al., 2005].

2.3.2 ARE regulierte Gene

Durch mehrere Microarray-Analysen an Nrf2 Wildtyp, sowie Nrf2-defizienten Mäusen konnten eine Vielzahl an zytoprotektiven Enzymen identifiziert werden, die über den Nrf2-ARE Signalweg reguliert werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Nrf2-ARE regulierte Gene des Phase-II Metabolismus [Copple et al., 2008]. UE, Unter-einheit.

Gen	Literatur
Aldo-Keto-reduktasen	Lou et al., 2006
γ -Glutamylcysteinligase, katalytische UE	Chan und Kwong, 2000
γ -Glutamylcysteinligase, modulatorische UE	Chan und Kwong, 2000
Glutathion-S-transferasen	Chanas et al., 2002
Hämoxygenase 1	Alam et al., 1999

Gen	Literatur
NAD(P)H:chinon-oxidoreduktase	Venugopal und Jaiswal, 1996
Superoxiddismutase	Park und Rho, 2002
Thioredoxin	Kim et al., 2001

Im Folgenden werden die Gene näher erläutert, die im Rahmen dieser Dissertation auf transkriptioneller Ebene untersucht wurden. Einen schematischen Überblick hinsichtlich ihrer Interaktion untereinander ist in Abbildung 12 veranschaulicht.

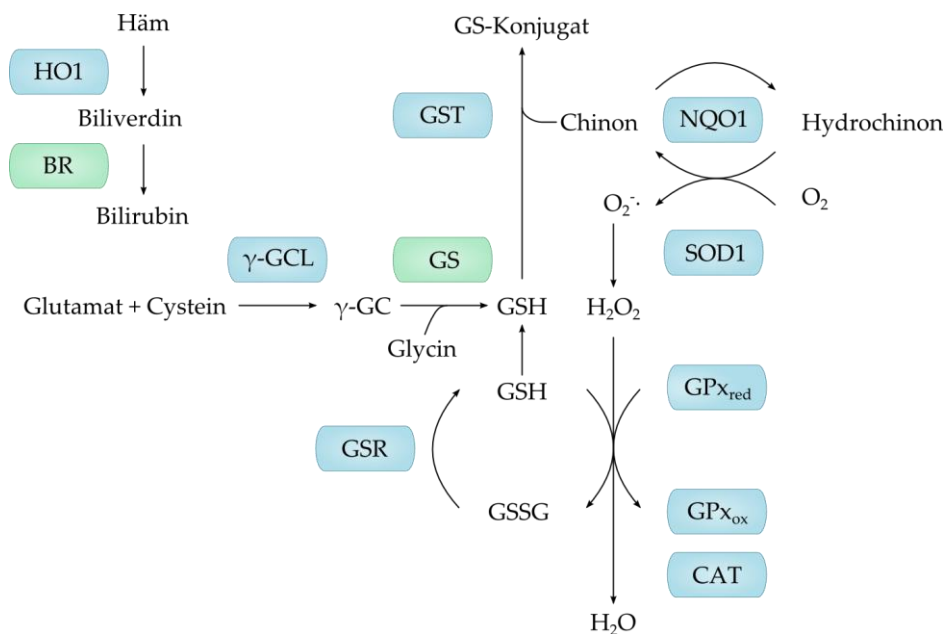


Abbildung 12: Zusammenspiel Nrf2-ARE regulierter Gene (blau) zur Erhaltung der ROS Homöostase [modifiziert nach: Lee und Johnson, 2004; Kensler et al., 2007]. BR, Biliverdinreduktase; CAT, Katalase; γ -GCL, γ -Glutamylcysteinligase; GS, Gluthathionsynthetase; GST, Gluthathion-S-transferase; GPx, Gluthathionperoxidase; GSH, Gluthathion (reduziert); GSSG, Gluthathion (oxidiert); HO1, Hämoxygenase 1; NQO1, NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase 1; SOD1, Superoxiddismutase.

2.3.2.1 γ -Glutamylcysteinligase

Ein wichtiges Antioxidans, das intrazellulär synthetisiert wird, ist das Tripeptid GSH (γ -Glutamylcysteinoglycin). Es ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie die Proteinbiosynthese, DNA Synthese/Reparatur oder an redox-aktiven Signalwegen beteiligt [Meister, 1983; Wu et al., 2004; Townsend, 2007]. Darüber hinaus dient Glutathion als Konjugationspartner während des Phase-II Metabolismus und ist an der Eliminierung von ROS und anderen freien Radikalen beteiligt [Caldwell, 1986]. Obwohl beinahe alle Zelltypen zur GSH-Synthese

befähigt sind, wird der Hauptanteil in der Leber produziert und über das Blut in die peripheren Organe verteilt [Griffith und Meister, 1979; Meister, 1983; Martensson et al., 1990].

Die intrazelluläre GSH Homöostase ist ein Zusammenspiel zwischen *de novo* Synthese, Verbrauch und Export aus der Zelle. Die Biosynthese wird neben der Substratverfügbarkeit der einzelnen Aminosäuren (v.a. Cystein) über die Aktivität der γ -Glutamylcysteinyligase (GCL) geregelt [Griffith, 1999; Griffith und Mulcahy, 1999]. Hinsichtlich der Neusynthese von GSH stellt das Enzym GCL den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Es katalysiert die Bildung von γ -Glutamylcystein (γ -GC) aus Glutaminsäure und Cystein unter Verbrauch von ATP (Abbildung 13). Anschließend erfolgt die Ligation von Glycin an γ -GC durch das Enzym Glutathionsynthetase.

Die aktive Form der GCL besteht aus einem Heterodimer, einer katalytischen (GCL-C) und modulatorischen (GCL-M) Untereinheit. Die katalytische Untereinheit ist etwa 72 kDa schwer und beinhaltet das aktive Zentrum, das die ATP-abhängige Verknüpfung der Aminogruppe von Cystein und der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure katalysiert. Die modulatorische Untereinheit ist mit 31 kDa kleiner und erhöht nach Dimerisierung mit GCL-C dessen Aktivität. GCL-C und GCL-M werden von unterschiedlichen Genabschnitten auf verschiedenen Chromosomen exprimiert [Yang et al., 2007].

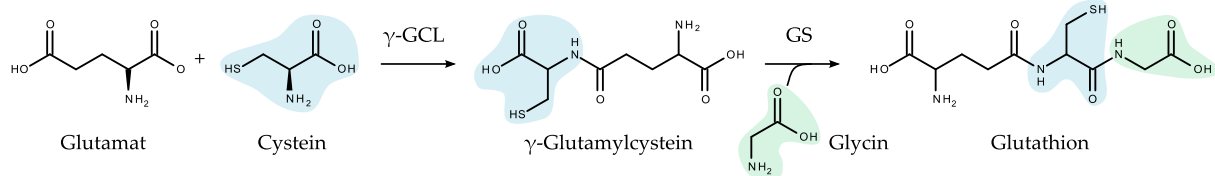


Abbildung 13: Biosynthese von Glutathion. γ -GCL, γ -Glutamylcysteinyligase; GS, Glutathionsynthetase.

In hohen Konzentrationen wirkt GSH zusätzlich als kompetitiver Inhibitor der GCL-C, indem es mit Glutaminsäure um eine Bindung an das aktive Zentrum konkurriert [Chuang et al., 2005].

Die Synthese von GSH erfolgt konstitutiv und kann im Falle von oxidativem Stress induziert werden. Sequenzanalysen und Reportergenassays haben gezeigt, dass die Promotorregion von GCL-C/GCL-M eine Reihe potentieller cis-regulierender Elemente besitzt. Darunter sind Bindestellen für das Aktivator Protein 1 (TRE), κ B und EpRE (ARE) zu finden. Eine verstärkte *de novo* Synthese geht meist mit einer erhöhten Expression der γ -GCL Untereinheiten auf-

grund einer verstärkten mRNA-Transkription oder -Stabilität einher [Yao et al., 1995; Gomi et al., 1997; Liu et al., 1998a].

Die Enzyme GCL-C und GCL-M liegen nicht in äquimolaren Konzentrationen in der Zelle vor. Der Anteil an GCL-C liegt weit über dem von GCL-M. Erfährt die Zelle oxidativen Stress wird das Verhältnis von GCL-C/GCL-M kleiner, obgleich die Menge an GCL-C immer noch überwiegt. Dies legt die Vermutung nahe, dass GCL-C alleine für die konstitutive Expression von GSH verantwortlich ist. Die Erhöhung des GCL-M Levels bei oxidativem Stress wird zur Ausbildung des GCL-C/GCL-M-Komplexes benötigt um die Feedback-Inhibierung durch GSH zu kompensieren. So wird auch bei relativ hohen GSH Konzentrationen eine gesteigerte Neusynthese erreicht [Krzywanski et al., 2004].

2.3.2.2 Hämoxygenase 1

Die Familie der Hämoxygenasen (HO) wird den mikrosomalen Enzymen zugeteilt und besitzt eine entscheidende Rolle im Abbau von Hämoglobin [Tenhunen et al., 1968]. Häm besitzt als Zentralatom ein Fe^{2+} und ist mit einem Porphyrin-Molekül als Ligand assoziiert. Das Fe^{2+} ist in der Lage über die Fenton-Reaktion aus H_2O_2 das hochreaktive Hydroxylradikal zu bilden. Eine erhöhte Konzentration an freiem Häm kann somit schädlich für die Zelle sein und muss abgebaut werden.

Bis heute sind drei Isoformen der HO bekannt [Maines et al., 1986; Maines, 1988; McCoubrey et al., 1997]. Das HO1-Gen ist hoch konserviert. Das Genprodukt hat eine Größe von 32 kDa und wird ubiquitär in den meisten Geweben exprimiert [Keyse und Tyrrell, 1989; Durante, 2003]. Im Gegensatz zu HO2 kann die Expression von HO1 durch hohe Hämkonzentrationen induziert werden. Darüber hinaus führen UV-Strahlen, Schwermetalle, Hypoxie oder ROS, über eine Erhöhung des endogenen Redoxlevels, zu einer gesteigerten Enzyminduktion [Keyse und Tyrrell, 1989; Applegate et al., 1991].

Als Schlüsselregulatoren der Induktion von HO1 infolge externer Stimuli gelten die TF AP1, NF κ B und Nrf2 [Lavrovsky et al., 1994; Otterbein et al., 2003]. Untersuchungen haben gezeigt, dass HO1 Induktoren zur Aktivierung der mitogen-aktivierten Protein Kinase Kaskade (MAPKK), Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalkaskade führen [Immenschuh et al., 1998; Elbirt und Bonkovsky, 1999;

Numazawa et al., 2003; Salinas et al., 2004]. Sie erhöhen die Affinität der zuvor genannten TF zur Promotorregion der DNA [Prawan et al., 2005].

Neben Nrf2 wird die Induktion von HO1 ebenfalls über Bach1, einem Häm-responsiven Transkriptionsrepressor, reguliert [Ogawa et al., 2001]. Bach1 blockiert die Assoziation von Nrf2/Maf an die DNA, indem es selbst mit Maf ein Heterodimer ausbildet und an ARE bindet. Studien zufolge besteht eine inverse Korrelation zwischen der HO1 und Bach1 Expression [Kitamuro et al., 2003].

In gesunden Zellen stellt die vermehrte Synthese von HO1 eines der wichtigsten Ereignisse zum Schutz vor Elektrophilen und ROS dar und vermindert so das Risiko an ROS-bedingten Entzündungsreaktionen und weiteren Folgeerkrankungen wie Krebs.

In ihrer Funktion katalysieren HO die oxidative Spaltung des Porphyringrings von Häm zu Biliverdin, freiem Eisen(II) und Kohlenstoffmonoxyd (Abbildung 14). Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Umwandlung von Biliverdin zu Bilirubin durch die Biliverdin-Reduktase.

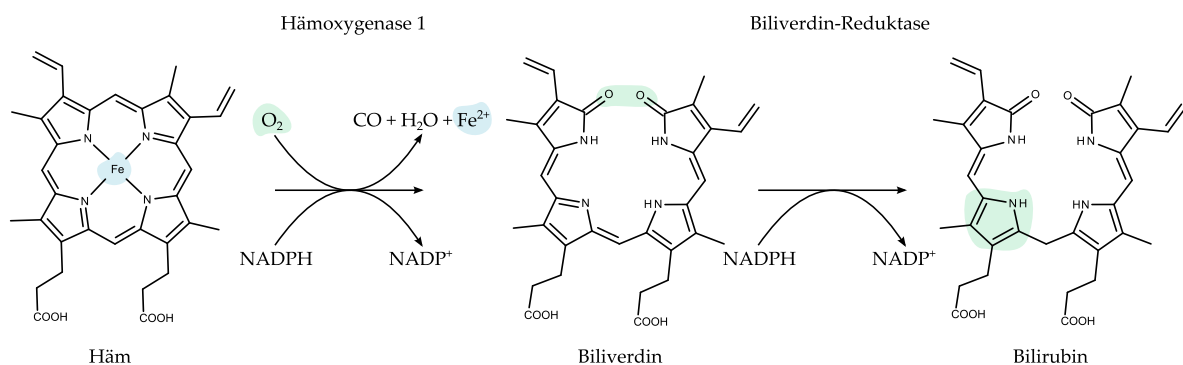


Abbildung 14: Enzymatischer Abbau von Häm durch Hämoxygenase 1. NADP/NADPH, Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (oxidiert/reduziert).

Da Häm ein hohes prooxidatives Potential besitzt, wird eine Reduktion des zellulären Häm-Pools als Schutz vor Lipidperoxidation, Oxidation von Proteinen und Schäden an Nukleinsäuren angesehen. Eine HO1-vermittelte zytoprotektive Wirkung ist entscheidend für Gewebe, die anfällig gegenüber oxidativem Stress sind. Viele Studien deuten darauf hin, dass ein Anstieg der HO1 zu einem Schutz vor ROS-vermittelten Zellschäden führt, während bei einer verringerten HO1-Aktivität diese zelluläre Abwehr ausbleibt und dies ernste Folgen für die Zelle haben kann [Durante, 2003].

Obgleich in der Literatur eine Induktion der HO1 als zytoprotektiv angesehen wird gilt ein hoher HO1-Level in Tumoren, insbesondere während einer Chemotherapie, als kontrapro-

duktiv. Studien zufolge geht mit einer starken Induktion von HO1, neben einer zytoprotektiven Wirkung, eine verringerte Apoptoserate einher [Liu et al., 2004]. Dies kann zu einer höheren Überlebenschance der Tumorzellen während einer Chemotherapie führen, vor allem wenn Apoptose-induzierende Medikamente zum Einsatz kommen. Daneben stimuliert HO1 ebenfalls die Zellproliferation und -differenzierung [Was et al., 2010].

Ob und inwieweit eine Induktion der HO1 wünschenswert ist wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In gesundem Gewebe werden hohe HO1-Level als protektiv angesehen, da sie zu einer Verringerung oxidativer Zellschäden durch redox-aktive Spezies führen können [Zhu et al., 2011]. Demgegenüber wird hinsichtlich einer Chemotherapie eine Verringerung des HO1-Spiegels von Tumorzellen angestrebt, um deren potentielle Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu minimieren [Liu et al., 2004].

In Zellkulturuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass HO1 durch verschiedene Pflanzeninhaltsstoffe induziert werden kann. Curcumin und Kaffeesäurephenylester führen zu einer Dissoziation des Nrf2/Keap1 Komplexes, sodass Nrf2 im Zytoplasma akkumuliert und eine Translokation in den Zellkern stattfindet [Balogun et al., 2003].

2.3.2.3 NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase 1

Der Genabschnitt der NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1) ist auf dem Chromosom 16q22.1 lokalisiert und kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa [Chen et al., 1991; Jaiswal, 1991]. Es liegt mit > 90 % primär im Zytosol vor und bildet mit zwei Flavinadenindinukleotid (FAD) enthaltenden Monomeren ein Homodimer aus [Ross et al., 2000].

NQO1 ist imstande ein breites Spektrum an Substanzen zu reduzieren, darunter Chinone, Chinonimine, Glutathionyl-substituierte Naphtochinone, Azo- und Nitroverbindungen [Ernster, 1967; Lind et al., 1990]. Das Enzym unterscheidet dabei nicht zwischen Ortho- und Parasubstitution des Chinons [Segura-Aguilar und Lind, 1989].

NQO1 reduziert Chinone zu Hydrochinonen in dem es zwei Elektronen auf das Substrat überträgt. Als Kofaktor dient bei der Reduktion NAD(P)H. Hierbei bindet das reduzierte Pyridinnukleotid, reduziert den Flavin-Kofaktor und das oxidierte Pyridinnukleotid wird frei. Während der Reaktion erfolgt ein Wasserstoffaustausch von NADH zu FAD [Li et al., 1995].

Eine Metabolisierung durch NQO1 führt nicht immer zur Detoxifizierung des Substrats, denn die gebildeten Hydrochinone sind teilweise redoxlabil und unterliegen, analog zu Chinonen, dem Redoxcycling (Abbildung 15). Hydrochinone können mit molekularem Sauerstoff zu Semichinonen weiterreagieren und ROS generieren. In diesem Fall ergibt eine Metabolisierung durch NQO1 ein aktiveres Produkt [Cadenas, 1995].

Die Funktion der NQO1 als antioxidatives Enzym beruht auf der Umwandlung von Chinonen zu Hydrochinonen. Diese sind aufgrund ihrer Hydrophilie in der Regel besser ausscheidbar. So kann es sein, dass durch die NQO1 ein Hydrochinon entsteht, das ebenfalls dem Redoxcycling unterliegt, aber aufgrund der verbesserten Exkretionsmöglichkeiten keine oxidative Schädigung zellulärer Bestandteile resultieren.

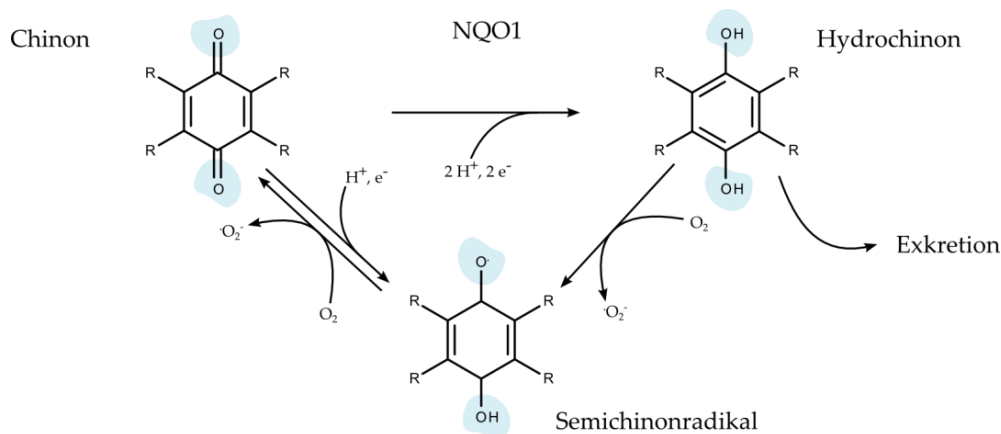


Abbildung 15: Chinonreduktion durch NQO1 und Redoxcycling [modifiziert nach Oppermann, 2007].

Die Funktion der NQO1 als antioxidatives Enzym wird durch immunhistochemische Studien bestätigt, die zeigen, dass NQO1 in vielen Geweben exprimiert wird, die verstärkt exogenen Substanzen ausgesetzt sind und eine besonders hohe Schutzwirkung benötigen. Obwohl die Leber das Hauptorgan des Fremdstoffmetabolismus darstellt, konnte in Leberzellen keine bzw. nur sehr geringe NQO1-Aktivitäten nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass das Enzym eine untergeordnete Rolle bei der hepatischen Metabolisierung von Xenobiotika einnimmt [Schlager und Powis, 1990; Siegel und Ross, 2000].

Biochemische Studien zeigten, dass die NQO1-Aktivität durch ein breites Spektrum an Substanzen induziert werden kann. Die Promotorregion des NQO1-Genabschnitts besitzt als regulatorische Elemente der Gentranskription ein ARE und XRE. Eine Reihe phenolischer

Antioxidantien, Tumorsuppressoren oder ROS führen zur Nrf2-ARE vermittelten Gentranskription der NQO1 [Prester et al., 1993; Jaiswal, 1994; Li und Jaiswal, 1994].

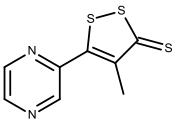
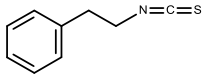
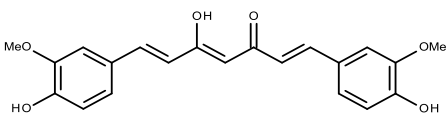
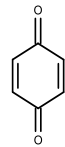
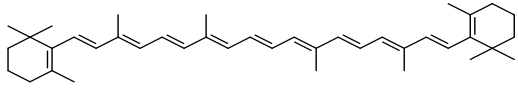
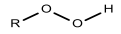
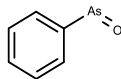
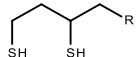
2.3.3 Aktivatoren von Phase-II Enzymen

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass potentiell toxische Moleküle, die zu einer Aktivierung der zellulären Detoxifikationsmaschinerie führen, sowohl die eigene Metabolisierung, als auch die anderer Substanzen beeinflussen können. Dies erfolgt über eine Modulation der Aktivität bestimmter Enzyme des Phase-I und Phase-II Fremdstoffmetabolismus. Im Allgemeinen werden zwei Kategorien an Enzyminduktoren unterschieden. Bifunktionelle Induktoren führen über das XRE zu einer Hochregulierung von Phase-I und Phase-II Enzymen, wobei monofunktionelle Induktoren über das ARE/EpRE lediglich die Aktivität von Phase II Enzymen beeinflussen.

Monofunktionelle Induktoren induzieren primär Phase-II / antioxidative Enzyme über eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs und führen im Gegensatz zu bifunktionellen Induktoren unabhängig vom AhR zu einer Detoxifizierung der Fremdstoffe. Aufgrund ihrer chemischen Diversität sind monofunktionelle Induktoren schwer zu klassifizieren. Bisher konnten neun verschiedene Substanzklassen von Phase II-Induktoren identifiziert werden, die in Tabelle 3 aufgelistet sind.

Bifunktionelle Induktoren sind häufig große polyzyklische aromatische Verbindungen, mit einer hohen Affinität zum Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) und bewirken eine Induktion gewisser Cytochrom P450 (CYP450) Isoenzyme. Werden diese Induktoren nun über AhR/XRE abhängige Enzyme metabolisiert können wiederum Verbindungen mit elektrophilen Eigenschaften entstehen, die zu einer Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs und Induktion von Phase-II Enzymen führen können. Hinsichtlich einer chemopräventiven Wirkung sind bifunktionelle Induktoren weniger geeignet, da aufgrund der verstärkten Expression an CYP450 abhängigen Monooxygenasen eine Umwandlung von Prokanzerogenen zu ultimativen Kanzerogenen stattfinden kann. Diese z.T. hochreaktiven Intermediate sind im weiteren Verlauf in der Lage über Schäden an DNA, RNA und Proteinen die Initiation des Kanzerogeneseprozesses zu begünstigen [Giudice und Montella, 2006].

Tabelle 3: Einteilung monofunktionaler Phase-II Induktoren nach Substanzklassen [modifiziert nach Giudice und Montella, 2006].

Monofunktionaler Induktor	Beispiel
1,2-Dithiol-3-thione	
Isothiocyanate	
Michael-Reaktion Akzeptoren	
Oxidierbare Diphenole/ Chinone	
Polyene	
Hydroperoxide	
Arsen (III) Verbindungen	
Schwermetallverbindungen (II)	Hg > Cd > Zn
Vicinale Dithiole	

2.3.3.1 Sulforaphan

Ein pflanzlicher Inhaltsstoff dem eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs zugeschrieben wird ist Sulforaphan. Die Verbindung zählt zu den Isothiocyanaten und ist vorwiegend in Kreuzblütlern wie Brokkoli (*Brassica oleracea*) oder Chinakohl (*Brassica rapa*) enthalten. Sulforaphan wird in glykosinolierter Form (Glucoraphanin) aufgenommen und kann durch die Mikroflora des menschlichen Gastrointestinaltrakts mittels Glykosidasen zu Sulforaphan hydrolysiert werden (Abbildung 16) [Shapiro et al., 2001].

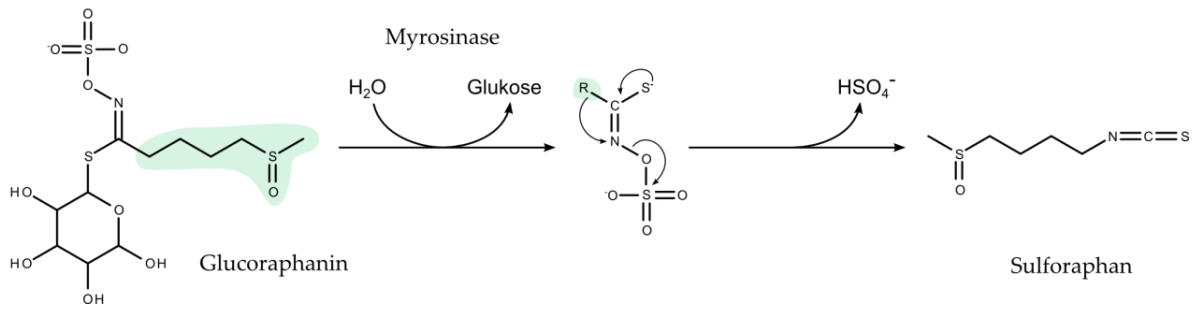


Abbildung 16: Enzymatischer Abbau von Glucoraphanin zu Sulforaphan [modifiziert nach Kensler et al., 2005].

Chemoprotektive Eigenschaften durch Sulforaphan in Lungen-, Kolon- und Brustgewebe konnten bereits in mehreren epidemiologischen Studien nachgewiesen werden [Spitz et al., 2000; Seow et al., 2002; Fowke et al., 2003]. Darüber hinaus wird eine Ernährung reich an Brokkoli mit einem verringerten Krebsrisiko in Verbindung gebracht [Joseph et al., 2004]. Untersuchungen mit Extrakten aus 3 d alten Brokkolisprossen waren hochpotent in der Verringerung Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) -induzierter Tumore in Ratten [Fahey et al., 1997]. Sulforaphan selbst verhindert die Bildung präneoplastischer Läsionen in DMBA-behandelten Mäusen [Gerhäuser et al., 1997]. Dies erfolgt vermutlich über eine Verringerung der Enzymaktivität verschiedener CYP450 Isoenzyme durch eine Modulation ihrer Expression oder einer kompetitiven Inhibierung [Barcelo et al., 1996; Maheo et al., 1997].

In den letzten Jahren lag der Fokus des wissenschaftlichen Interesses der chemopräventiven Wirkung von Sulforaphan in einer Interaktion mit dem Nrf2-ARE Signalweg. Das Isothiocyanat gehört zu den potentesten natürlich vorkommenden Induktoren von Phase-II Enzymen. In Human- und Tierstudien konnte eine inverse Korrelation zwischen einer Aktivierung dieser Enzyme und der Anfälligkeit gegenüber chemischen Kanzerogenen nachgewiesen werden [Kwak et al., 2001]. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass Sulforaphan und dessen GSH-Konjugat ein potenter Induktor der NQO1, GST und UGT ist.

Sulforaphan ist durch seine Isothiocyanat-Struktur in der Lage mit Cysteinresten des Nrf2/Keap1 Komplexes zu interagieren. Es bewirkt eine Dissoziation von Nrf2 und Keap1, worauf Nrf2 nicht mehr dem proteosomalen Abbau zugeführt wird und eine verstärkte Transkription entsprechender Zielgene auslösen kann [McMahon et al., 2003; Jeong et al., 2005, 48, 60].

2.3.3.2 Tert.-Butylhydrochinon

Tert.-Butylhydrochinon (tBHQ) ist ein Metabolit des in Lebensmitteln zugelassenen Antioxidans Butylhydroxyanisol. Aufgrund seiner lipophilen Struktur findet dieses häufig in fettreichen Lebensmitteln Anwendung. BHA ist in der Lage ROS abzufangen, indem es ein Wasserstoff abstrahiert. Dadurch wird es selbst zum Radikal, ist aber aufgrund der aromatischen Struktur resonanzstabilisiert [Liu et al., 1998b].

tBHQ ist in der Literatur als Nrf2-Aktivator beschrieben und schützt so die Zelle vor toxischen Substanzen wie beispielsweise H_2O_2 [Li et al., 2002; Kraft et al., 2004; Li et al., 2007]. Studien in denen tBHQ in der Nahrung supplementiert wurde zeigten eine verringerte Inzidenz an kolorektalen Adenokarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und präneoplastischen Foci der Leber [Fukushima et al., 1991; Hasegawa et al., 1992; Hirose et al., 1993].

Im Gegensatz dazu wird tBHQ mit Hyperplasien der Speiseröhre und Mukosa in Verbindung gebracht [Fukushima et al., 1991]. Der Mechanismus, wie tBHQ zu einer Aktivierung redoxsensitiver Signalwege führt war lange unklar. Nach heutigem Wissensstand wird vermutet, dass tBHQ über eine Generierung von ROS zu einer Dissoziation des Nrf2/Keap1 Komplexes führt [Itoh et al., 1999]. Diese Annahmen werden auch von Imhoff und Jansen [2010] unterstützt. Sie gehen von einer ROS Produktion im Mitochondrium aus, welche nachfolgend zu einer Aktivierung von Nrf2 führt. Über ein Chinon/Semichinon Redoxcycling ist tBHQ in der Lage kontinuierlich ROS zu produzieren [Gharavi et al., 2007].

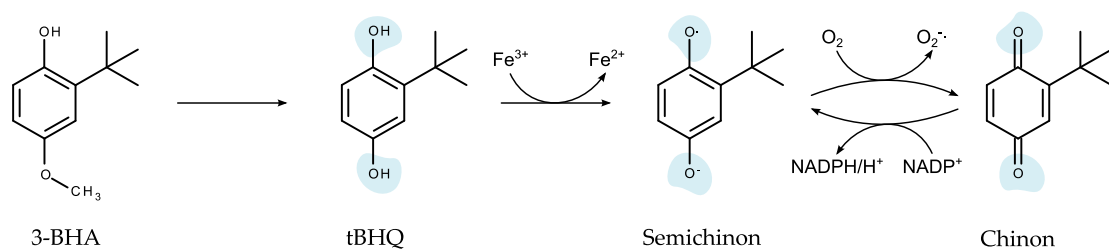


Abbildung 17: Metabolisierung von 3-BHA zu tBHQ und Autooxidation zum Chinon über das Semichinon [modifiziert nach Liu et al., 1998b]. 3-BHA, 3-Butylhydroxyanisol; tBHQ, tert.-Butylhydrochinon; NADP, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat.

Diese Theorie würde erklären, warum geringe Dosen von tBHQ eine leichte ROS Produktion mit einer Aktivierung des Nrf2 Signalwegs bewirken, bei hohen Dosen die ROS generierende Eigenschaft jedoch so stark zum Tragen kommt, sodass ROS-vermittelte Schädigungen überwiegen.

2.4 Polyphenole

Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und besitzen eine essentielle Aufgabe in der Pflanzenmorphologie (Pigmentierung), Abwehr von Fraßfeinden (Phytoalexine) oder bei Wachstums- und Reproduktionsvorgängen der Pflanze. In der Industrie finden Polyphenole Anwendung bei der Herstellung von Farben, Kosmetika oder als Zusatzstoffe in der Lebensmittelindustrie [Bravo, 1998]. In den letzten Jahren finden bioaktive Polyphenole auch im pharmazeutischen Bereich bei Bluthochdruck, Allergien und Hypercholesterinämie Anwendung [Diebolt et al., 2001; Enomoto et al., 2006].

Da Polyphenole ubiquitär in Pflanzen vorkommen sind sie ein integraler Bestandteil der humanen Ernährung [Bravo, 1998]. Das Polyphenolspektrum einer Pflanze variiert selbst innerhalb einer Gattung stark zwischen Kultivar, Alter, Kulturbedingungen und Klima. Bisher sind mehr als 9000 verschiedene Substanzen bekannt, die als zentralen Bestandteil eine Phenolgruppe besitzen [HARBORNE, 1993]. Sie werden aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in folgende Gruppen unterteilt:

- Flavonoide
- Stilbene
- Lignane
- Phenolcarbonsäuren

2.4.1 Flavonoide

Flavonoide stellen die am häufigsten und am weitesten verbreitete Gruppe an pflanzlichen Phenolen dar. Ihr Name leitet sich vom lateinischen Wort flavus (gelb) ab, da sie in ihrer reinen Form meist gelblich gefärbt sind. Sie alle besitzen als zentrales Strukturelement ein 2-Phenylchromangrundgerüst, auch Flavan genannt (Abbildung 18). Dieses besteht aus zwei aromatischen Ringen A und B, die über drei Kohlenstoffatome zu einem dritten heterocyclischen Ring zusammengeschlossen sind.

Während der Biosynthese stammt der A Ring entweder von Resorcinol oder Phloroglucinol, das über den Acetatweg gebildet wird, während der B-Ring dem Shikimate-Weg entstammt [Harborne, 1989]. Die Biosynthese der Flavonoide startet mit der Reaktion von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einer aktivierten Cumarinsäure. Das entstehende Chalkon wird an-

schließlich durch Isomerisierung in ein Flavanon überführt. Ausgehend vom Flavanon lassen sich schließlich alle weiteren Flavonoide synthetisieren [Winkel-Shirley, 2001].

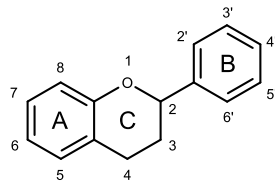
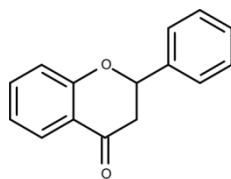
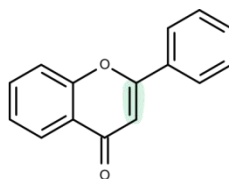


Abbildung 18: Das Grundgerüst der Flavonoide; 2-Phenylchroman (Flavan).

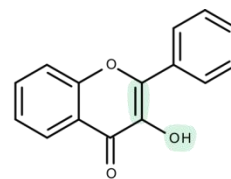
Da die Biosynthese lichtabhängig ist befinden sich Flavonoide hauptsächlich in den Randschichten und äußeren Blättern der Pflanzen. Abhängig von der Oxidationsstufe am C-Ring und dem Hydroxylierungsgrad am A und B Ring können die Flavonoide in weitere Untergruppen gegliedert werden. Die Grundstrukturen der Hauptvertreter sind Abbildung 19 zu entnehmen.



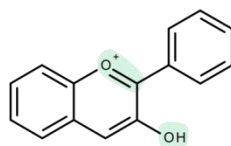
Flavanon



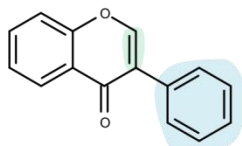
Flavon



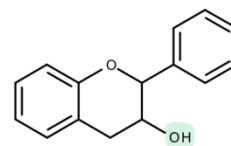
Flavonol



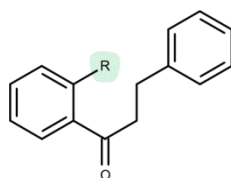
Anthocyanidin



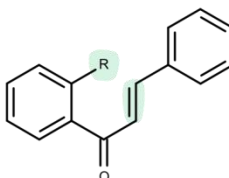
Isoflavon



Flavan-3-ol



Dihydrochalkon



Chalkon

Abbildung 19: Hauptvertreter der Flavonoide [modifiziert nach Bravo, 1998].

Die Vielfalt der Flavonoide ist auf Modifizierungen am Flavangrundgerüst zurückzuführen. Bis auf die Flavanole kommen die meisten Flavonoide in der Natur nicht frei (Aglykon), sondern als Flavonoidglykoside vor. Die am häufigsten eingebauten Zuckerbausteine sind Glukose, Galaktose, Rhamnose, Arabinose und Xylose. Sie werden bevorzugt an der Position 3 des C-Ringes β -glykosidisch verknüpft [Watzl und Rechkemmer, 2001; Manach et al., 2004]. Im Folgenden wird näher auf die in dieser Arbeit relevanten Flavonoidgruppen eingegangen.

2.4.1.1 Flavonole

Flavonole gehören zu den am weitesten verbreiteten Flavonoiden in Lebensmitteln [Manach et al., 2004]. Als strukturcharakteristisches Merkmal besitzen sie eine Doppelbindung zwischen C2 und C3, sowie eine Hydroxygruppe am C3 des Flavangrundgerüsts. In Abbildung 20 sind ihre Hauptvertreter Quercetin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon-3-ol), Myricetin (5,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavon-3-ol) und Kämpferol (5,7,4'-Trihydroxyflavon-3-ol) dargestellt.

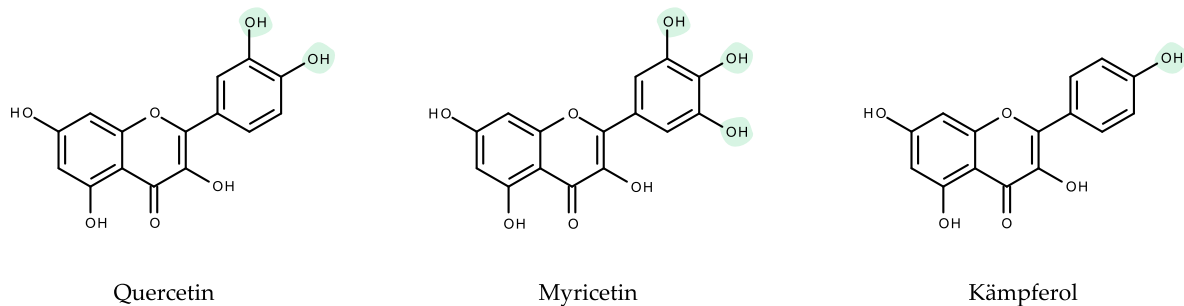


Abbildung 20: Strukturen der Flavonole Quercetin, Myricetin und Kämpferol.

Sie kommen üblicherweise in geringen Konzentrationen von 15 - 30 mg/kg Frischgewicht in Lebensmitteln vor [Manach et al., 2004]. Obst, Gemüse und Getränke wie grüner Tee und Rotwein gelten als reichhaltige Quellen von Flavonolen [Hertog et al., 1993; Crozier et al., 1997]. Besonders Zwiebeln (bis 1,2 mg/kg Frischgewicht) und Äpfel gelten als Hauptaufnahmeweg vieler Flavonole [Justesen et al., 1997]. Im Lebensmittel liegen Flavonole meist an Glukose oder Rhamnose glykosidisch gebunden vor. Auch Verbindungen mit Galaktose, Arabinose, Xylose und Glucuronsäure werden gefunden. Die tägliche Aufnahme liegt Schätzungen nach zwischen 20 - 35 mg [Justesen et al., 1997; Aherne und O'Brien, 2002].

Bioverfügbarkeit

Trotz der relativ geringen täglichen Aufnahme von Flavonolen ist ihre biologische Verfügbarkeit, im speziellen die von Quercetin, bislang am intensivsten untersucht. Nachdem es Gugler et al. [1975] nicht gelungen war Quercetin in isolierter Form nach oraler Gabe in Plasma oder Urin nachzuweisen, zeigte die Arbeitsgruppe um Hollmann et al [1995], dass das Flavonol im menschlichen Organismus durchaus resorbiert und verstoffwechselt wird. Darüber hinaus ergaben Untersuchungen, dass Quercetin-Glukoside aus Zwiebeln effizienter aufgenommen werden, im Vergleich zu Quercetinverbindungen aus Äpfeln oder isoliert als Nahrungsergänzung [Aherne und O'Brien, 2002]. Demzufolge ist das Aufnahmevermögen stark vom Zuckerrest der Glykoside abhängig [Manach et al., 2005]. Das entsprechende Rhamnoglukosid wird etwa 5-fach schlechter resorbiert, als das Glukosid. Ob die Glykosidbindung an Position 3 oder 4' besteht hat keinen Einfluss auf die Resorptionsrate [Olthof et al., 2000]. Ob Quercetinglykoside oder das freie Quercetin besser bioverfügbar ist wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Hollman et al., 1995; Morand et al., 2000].

Bei der Aufnahme von Quercetinglykosiden scheint dem natriumabhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1) eine bedeutende Rolle zuzukommen [Hollman et al., 1995]. Durch ihn erfolgt die Aufnahme der Glykoside in die Enterocyten. Dort werden sie durch eine zytosolische β -Glukosidase gespalten [Day et al., 1998].

Ein weiterer Aufnahmeweg involviert das Enzym Laktatphloridzinhydrolase, eine Glukosidase der Bürstensaummembran des Dünndarms. Das Enzym katalysiert die extrazelluläre Hydrolyse des Glukosids. Anschließend erfolgt die Aufnahme des Aglykons über passive Diffusion durch die Bürstensaummembran [Day, 2000]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Quercetin nach erfolgreicher Aufnahme nicht in freier Form als Aglykon vorliegt. Nach der Resorption wird Quercetin, gebunden an Albumin, über die Pfortader zur Leber transportiert und metabolisiert. Etwa 20 - 40 % wird an der 3'-Position methyliert. Darüber hinaus konnten 3'-O-Methylquercetin-3-O-glukuronid und Quercetin-3-O-sulfat gefunden werden. Diese Verbindungen besitzen mit 11 - 28 h relativ große Halbwertszeiten im Körper [Manach et al., 2005].

2.4.1.2 Flavan-3-ole (Flavanole)

Flavan-3-ole besitzen eine Hydroxylgruppe an C3 und keine Doppelbindung zwischen C2 und C3 des Flavangrundgerüsts. Sie kommen sowohl in monomerer (Catechine), als auch in oligo-/ polymerer (Procyanidine) Form vor (Abbildung 21). Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden sind natürlich vorkommende Flavan-3-ole nicht glykosidisch gebunden [D'Archivio et al., 2007].

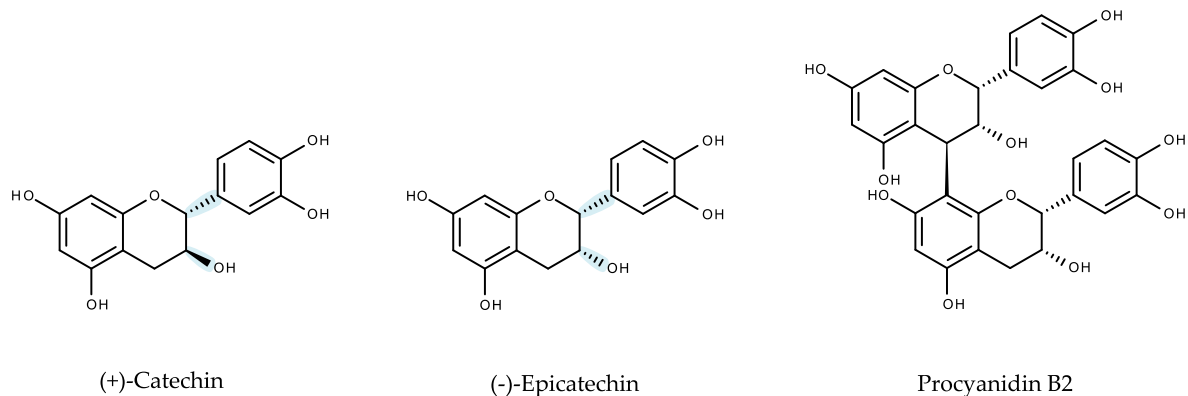


Abbildung 21: Strukturen der Flavan-3-ole (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Procyanidin B2.

Grüner Tee und Schokolade gelten als Hauptaufnahmequelle von Catechinen [Lakenbrink et al., 2000]. Schwarztee hingegen besitzt geringere Mengen an monomeren Flavan-3-olen, da aufgrund des Fermentationsprozesses durch Oxidationsvorgänge die Bildung komplexer Verbindungen begünstigt ist. Darüber hinaus gelten Aprikosen (250 mg/kg Frischgewicht) und Rotwein (300 mg/l) ebenfalls als reichhaltige Quellen [Arts et al., 2000b].

Zu den Hauptflavan-3-olen in Obst werden (+)-Catechin und (-)-Epicatechin gezählt, wohingegen Gallocatechin, Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) vor allem in den Samen von Leguminosen, Trauben und Teeblättern zu finden sind [Arts et al., 2000b; Arts et al., 2000a]

Procyanidine, auch kondensierte Tannine genannt, stellen Dimere, Oligomere und Polymere der Catechine dar. Sie sind hauptverantwortlich für den adstringierenden Geschmack vieler Früchte (Trauben, Beeren, Äpfel) und für die Bitternote von Schokolade [Rasmussen et al., 2005]. Über den Procyanidingehalt von Lebensmitteln lässt sich nur bedingt eine Aussage treffen, da diese Substanzklasse ein breites Spektrum hinsichtlich Struktur und Molekulargewicht besitzt. So erstreckt sich der mittlere Polymerisationsgrad von Procyanidinen aus Mostäpfeln von 4 - 11 [Guyot et al., 2001].

Bioverfügbarkeit

Die tägliche Aufnahme an Catechinen und Procyanidindimeren und -trimeren wird auf 18 - 50 mg/Tag geschätzt. Als Hauptquellen gelten Tee, Schokolade, Äpfel, Birnen, Trauben und Rotwein [Arts et al., 2000a]. Die Bioverfügbarkeit der Catechine ist sehr unterschiedlich. Van Amelsvoort et al. [2001] konnten zeigen, dass Catechine, die mit Gallat konjugiert sind, ein geringeres Resorptionsvermögen besitzen. Für EGC und EGCG wurden methylierte Metabolite im Plasma gefunden [Meng et al., 2001; Meng et al., 2002]. Die Methylierung erfolgt bevorzugt an der 4'-Position. EGCG liegt bevorzugt in der freien Form im Plasma vor [Lee et al., 2002]. Andere Catechine sind meist mit Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert. So wurden für Epicatechin die Metabolite Epicatechin-3'-O-glucuronid, 4'-O-Methylepicatechin-3'-O-glucuronid, 4'-O-Methylepicatechin-5-O-glucuronid und 4'-O-Methylepicatechin identifiziert [Natsume et al., 2003]. Die Exkretion der Catechine erfolgt relativ rasch über die Niere, oder im Fall der entsprechenden höher molekularen Konjugate über die Galle [Van Amelsvoort et al., 2001].

Die Bioverfügbarkeit der Procyanidine ist hauptsächlich von ihrem Polymerisationsgrad abhängig. Dies wurde in mehreren *in vitro* und Tierstudien bestätigt [Deprez et al., 2001]. Obwohl die Plasmagehalte im Vergleich zu Flavan-3-ol Monomeren etwa 100-fach geringer waren, konnte für die Procyanidine B1 und B2 eine Resorption beobachtet werden [Holt et al., 2002; Sano et al., 2003]. So zeigten *in vitro* Untersuchungen an Caco-2 Monolayerkulturen, dass Procyanidine bis zu einem Oligomerisierungsgrad von 3 in der Lage sind die intestinale Barriere zu passieren [Deprez et al., 2001]. *In vitro* Untersuchungen von Spencer et al. [2000] zeigten einen Abbau polymerer Procyanidine unter sauren Bedingungen und postulierten somit eine Degradierung der Substanzen während der gastrointestinalen Passage in ihre Monomere. Dies konnte in *in vivo* Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden [Rios et al., 2002].

2.4.1.3 Dihydrochalkone

Über eine Ringöffnung an Position 1 und 2 des Flavangrundgerüsts können aus Flavanonen Dihydrochalkone gebildet werden. Zu den bekanntesten Vertretern gehören Phloretin und sein Glukosid Phloridzin (Phloretin-2'-glukosid). Beide Verbindungen sind beinahe aus-

schließlich in Äpfeln zu finden. So beträgt der Phloridzinanteil in der Schale 80 - 420 mg/kg und im Fruchtfleisch 16 - 20 mg/kg [Escarpa und Gonzalez, 1998].

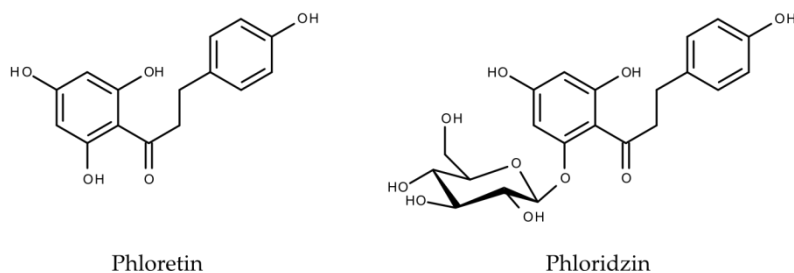


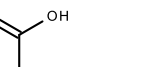
Abbildung 22: Strukturformeln der Apfelpolyphenole Phloretin und Phloridzin (Phloretin-2'-glukosid).

Bioverfügbarkeit

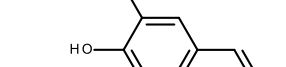
In situ Untersuchungen von Crespy et al. [2001] konnten zeigen, dass die Resorption von Phloretin und Phloridzin rasch im Dünndarm erfolgt. Nach der Aufnahme von Phloridzin konnte das Aglykon, sowie konjugierte Derivate (Glucuronid, Sulfat) im Lumen gefunden werden. Etwa 80 % des resorbierten Phloridzins wurde hydrolysiert. Nach 24 h konnten beide Verbindungen nicht mehr im Plasma nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine effiziente Exkretion über den Urin schließen. In weiterführenden Untersuchungen an Ratten konnten nach Gabe von Phloridzin und Phloretin keine detektierbaren Mengen des Glukosids und geringe Mengen an Phloretin im Plasma gefunden werden. Dies deutet auf eine Hydrolyse des Glukosids vor Aufnahme und Metabolisierung hin [Kahle et al., 2005b]. Kahle et al konnten darüber hinaus keine substanziellen Mengen an Phloridzin im Kolon detektieren. Im Gegensatz dazu erreicht Phloretin-2'-O-xyloglukosid den Kolon [Kahle et al., 2005a; Kahle et al., 2005b].

2.4.2 Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren können in Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren unterteilt werden. Die bekanntesten Vertreter der Hydroxybenzoesäuren sind die Gallussäure (Abbildung 23) und die Protocatechusäure. Mit Ausnahme von roten Früchten, die Gehalte bis zu 270 mg/kg Frischgewicht aufweisen, spielen beide Hydroxybenzoesäuren in Nutzpflanzen, die für den Verzehr geeignet sind, eine untergeordnete Rolle [Shahidi und Naczki, 1995]. Tee ist eine der Hauptaufnahmequellen für Gallussäure (4,5 g/kg Frischgewicht). Die



Gallussäure



Chlorogensäure

Bioverfügbarkeit

41

mikrobielle Esterasen gespalten und im weiteren Verlauf resorbiert werden [Couteau et al., 2001].

Über die Resorption und Metabolisierung von Hydroxybenzoesäuren ist bislang wenig bekannt. Für Gallussäure konnte eine Resorption beobachtet werden. Plasmakonzentrationen freier und glucuronidierter Gallussäure und seines Hauptmetaboliten 4-O-Methylgallat erreichten 4 µmol/l nach einer Aufnahme von 50 mg reiner Gallussäure [Manach et al., 2005].

2.4.3 Biotransformation der Polyphenole durch die mikrobielle Darmflora

Die Fermentation durch die mikrobielle Darmflora spielt eine entscheidende Rolle hinsichtlich Aufnahme und Metabolismus polyphenolischer Substanzen. In Lebensmitteln sind Polyphenole meist als Ester, Glykosid oder Polymer enthalten und können in dieser Form nicht, oder nur in geringem Maße aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden. Für eine erfolgreiche Resorption müssen die Substanzen vorab durch Verdauungsenzyme wie β -Glukosidasen, Laktatphloridzinhydrolase oder die Mikroflora im Kolon hydrolysiert werden [Day et al., 1998; Németh et al., 2003]. Polyphenole die im Dünndarm nicht resorbiert werden, erreichen unverändert den Kolon. Untersuchungen zufolge erreichen bis zu 80 % der aufgenommenen Polyphenole den Kolon [Rechner et al., 2004; Kahle et al., 2005b]. Die Anzahl an Bakterien im Kolon ist etwa 100 - 1000 fach höher als im Dünndarm. Die Mikroflora des Kolons ist in der Lage Glykoside in ihre Aglykone zu spalten oder im weiteren Verlauf zu aromatischen Säuren zu degradieren [Kühnau, 1976].

Allerdings sind nicht alle Flavonoide einer bakteriellen Degradierung zugänglich [Bravo, 1998]. So werden schwer lösliche, hoch kondensierte Tannine vermutlich ohne chemische Veränderung mit dem Fäzes ausgeschieden. Dies konnte anhand eines *in vitro* Fermentationsmodells an Ratten mit hochkondensierten Tanninen aus Johannisbrotschoten gezeigt werden [Bravo et al., 1994].

Bei einer *in vitro* Fermentation von Quercetin über 72 h wurde ein erhöhter Anteil an Acetat unter den Abbauprodukten detektiert. Dies wurde auf eine Ringöffnung eines Aromaten und einer beinahe kompletten Hydrolyse durch die bakterielle Mikroflora zurückgeführt [Bravo, 1998]. Bei Fermentationsversuchen mit *Enterococcus casseliflavus* konnte gezeigt wer-

den, dass Quercetin-3-glukosid in das Aglykon überführt wird, wobei die Glukose zu Format, Acetat, Laktat und Ethanol weiter verstoffwechselt wird (Abbildung 24).

Vergleichbare Untersuchungen mit *Eubacterium ramulus* führten zu einem weiteren Abbau des Quercetins, nach glykosidischer Spaltung. Es entstehen dabei die charakteristischen Abbauprodukte Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylacetat, die bei längerer Fermentationsdauer zu Butyrat, Acetat und CO₂ abgebaut werden [Schneider et al., 1999].

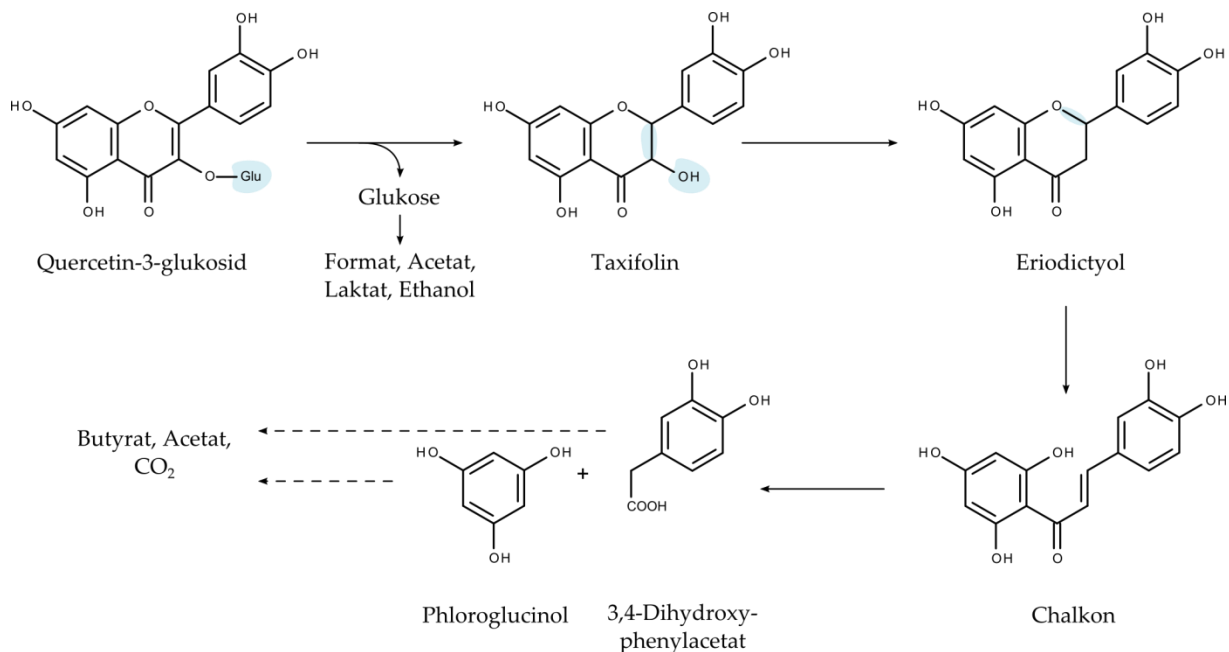


Abbildung 24: Hydrolyse von Quercetin-3-glukosid durch *Enterococcus casseliflavus* und möglicher Abbau von durch *Eubacterium ramulus* [Schneider et al., 1999].

Die Dihydrochalkone Phloridzin und das Aglykon Phloretin werden ähnlich den Flavonoiden abgebaut. Phloridzin wird im ersten Schritt über eine β -Glukosidase in Phloretin und Glukose gespalten. Im Anschluss erfolgt eine hydrolytische Spaltung des Phloretins in Phloroglucinol und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure [Schoefer et al., 2003].

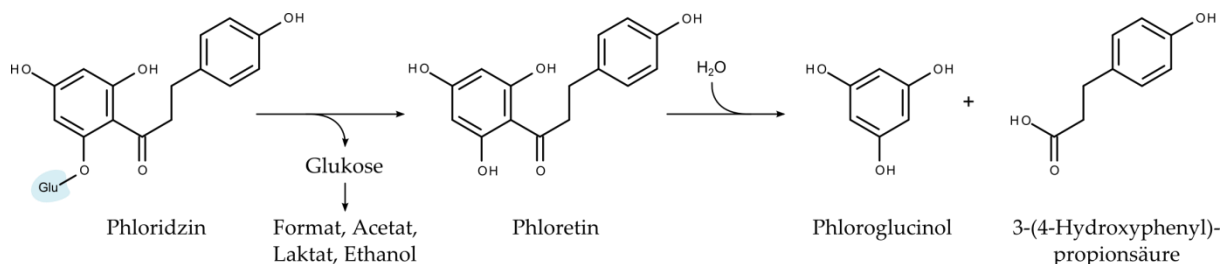


Abbildung 25: Bakterielle Hydrolyse Phloridzin und möglicher Abbau von durch *Clostridium orbiscindens* [Schoefer et al., 2003].

2.4.4 Polyphenolreiche Apfelsaft-/ Apfeltresterextrakte

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere polyphenolreiche Apfelsaft-/ Apfeltresterextrakte untersucht. Sie unterscheiden sich zum einen in ihrem Ausgangsmaterial, welches für die Extraktion zum Einsatz kam und darüber hinaus in der Art der Herstellung. Beide Faktoren besitzen einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Extrakte hinsichtlich ihres Polyphenolmusters. In den folgenden Abschnitten wird auf die Herstellung der einzelnen Extrakte näher eingegangen. Die Zusammensetzung der Extrakte ist in Tabelle 4 veranschaulicht.

2.4.4.1 Bohnapfelextrakt

Der Bohnapfelextrakt (BAE) wurde aus der Mostapfelsorte Bohnapfel der Ernte 2005 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dietrich Forschungsanstalt (FA) Geisenheim (Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung) hergestellt. Hierzu wurden 200 ml SP 70 Adsorberharz in 30 x 50 cm Pharmacia XK-Säulen gepackt und mit 500 ml destilliertem Wasser gespült. Nach Zentrifugation wurden 2 l des Bohnapfelsaftes auf die Säule gegeben. Die wasserlöslichen Bestandteile (Zucker, organische Säuren, Mineralien) wurden durch Spülen mit ca. 0,5 l destilliertem Wasser entfernt. Anschließend wurden die polyphenolischen Inhaltsstoffe in 96%igem Ethanol eluiert, im Rotationsverdampfer eingengt und gefriergetrocknet. Die Inhaltsstoffe wurden mittels HPLC mit Diodenarraydetektor bestimmt (1 g/l Extrakt in 10 % Methanol gelöst; Säule: Phenomenex Aqua 250/4 mm) [Will, persönliche Mitteilung, Fachhochschule Geisenheim].

2.4.4.2 Apfelsaft naturtrüb

Der Saft wurde von der FA Geisenheim aus verschiedenen Apfelsorten der Ernte 2005 hergestellt. Die Äpfel stammten vom Fachgebiet Obstbau der FA Geisenheim bzw. wurden von Produzenten aus ganz Deutschland zugekauft. Für den Mastersaft wurde folgende Zusammensetzung gewählt: Bittenfelder (10 %), Topaz (24 %), Bohnapfel (23 %), Seestermüher (25 %) und Börtlinger Weinapfel (18 %). Bei dem verwendeten Obst handelt es sich mit Ausnahme des Tafelapfels Topaz um klassische Mostobstsorten. Die Apfelsäfte wurden zunächst sortenrein hergestellt. In den ablaufenden trüben Saft wurden zum Schutz vor Oxidation 200 mg/l Ascorbinsäure dosiert. Die naturtrüben Säfte wurden über Kurzzeiterhitzung (85°C,

30 - 40 s) in Edelstahltanks eingelagert. Anschließend erfolgte Verschnitt und Heißfüllung. Das Polyphenolprofil wurde mittels RP18/HPLC mit DAD bestimmt (Direkteinspritzung nach 0,45 µm Filtration, Volumen 3 µl). Die Quantifizierung der farblosen Polyphenole erfolgte anhand einer externen Mehrpunktkalibrierung mit Referenzsubstanzen (Flavanole, Dihydrochalcone: 280 nm; Phenolcarbonsäuren: 320 nm; Quercetinderivate: 360 nm) [Will, persönliche Mitteilung, Fachhochschule Geisenheim].

2.4.4.3 Apfeltresterextrakt 4 (AT 4)

Der Apfeltresterextrakt AT 4 wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Carle (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim) aus Nebenprodukten der Apfelpektinengewinnung der Firma Herbstreith & Fox KG (Neuenbürg) hergestellt. Hierzu wurde Apfeltrester, der während der Apfelsaftgewinnung als Abfallprodukt anfällt, in einem neuartigen Verfahren zur simultanen Gewinnung von Pektin und Polyphenolen verwendet. Der enzymatische Abbau des Pektins wurde durch Trocknung des Tresters verhindert. Anschließend wurde das Pektin mittels Mineralsäure extrahiert und von den im Trester enthaltenen Polyphenolen mit Hilfe eines lebensmitteltauglichen Adsorberharzes abgetrennt. Die am Säulenmaterial gebundenen Polyphenole wurden nach dem Auswaschen des Pektins eluiert und eingengt und zur besseren Stabilisierung lyophilisiert (Abbildung 26).

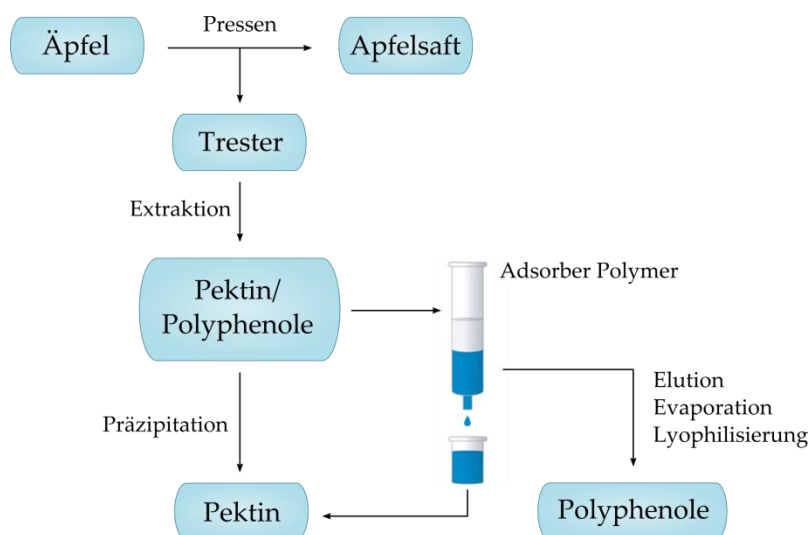


Abbildung 26: Simultane Gewinnung polyphenolreicher Apfeltresterextrakte und Pektin [modifiziert nach Schieber et al., 2003].

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Carle wurde im Anschluss das entpektinisierte Rohmaterial weiter aufbereitet. Ziel war es eine Isolierung und Anreicherung wertgebender Komponenten mit antioxidativen und DNA-protektiven Eigenschaften.

Hierzu wurde das pulverförmige Probenmaterial in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ bei einem pH von 1,5 gelöst und einer Aufreinigung mittels Amberlite® XAD-16 HP unterzogen. Anschließend erfolgte eine Flüssig-flüssig-Extraktion der entalkoholisierten Eluate mit Ethylacetat bei pH 7. Der gewonnene Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt, evaporiert und die Polyphenolzusammensetzung mittels HPLC bestimmt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der untersuchten Testsubstanzen. BAE: Bohnapfelextrakt, AS: Apfelsaft, AS klar/trüb: Apfelsaftextrakt klar/trüb, AT: Apfeltrestereextrakt, n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachweisbar; n.i., nicht identifiziert.

Inhaltsstoffe	BAE (mg/g)	AS (mg/ml)	AS klar (mg/g)	AS trüb (mg/g)	AT 4 (mg/g)	AT 9 (mg/g)
Procyanin B1	7,4	3,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Procyanin B2	n.n.	13,8	3,8	n.n.	n.n.	n.n.
Procyanin C1	10,2	6,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
(-)-Epicatechin	31,0	14,7	7,0	n.n.	n.n.	n.n.
(+)-Catechin	6,3	5,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Protocatechusäure	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.n.	n.n.
Phloretin	n.n.	n.n.	0,8	0,8	10,29	5,4
Phloretinxyloglukosid	119,0	65,8	72,7	28,9	16,94	98,8
Phloretinxylogalaktosid	14,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hydroxyphloridzin	n.n.	n.n.	2,7	1,3	7,91	9,0
Phloridzin	17,6	22,8	37,7	12,4	453,4	240,2
Chlorogensäure	158,0	168,8	274,4	158,9	n.n.	10,5
Chlorogensäureisomer	n.n.	n.n.	24,0	21,3	n.n.	n.n.
4-Kaffeoylchinasäure	4,7	14,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3-Cumaroylchinasäure	1,4	n.n.	8,8	5,2	n.n.	0,7
4-Cumaroylchinasäure	13,4	38,3	6,1	6,9	n.n.	2,9
5-Cumaroylchinasäure	n.n.	n.n.	83,3	76,9	n.n.	2,5
Kaffeesäure	16,0	n.n.	1,7	3,0	n.n.	1,8
p-Cumarsäure	0,8	n.n.	1,8	6,3	1,11	3,6

Theoretische Grundlagen

Inhaltsstoffe	BAE (mg/g)	AS (mg/ml)	AS klar (mg/g)	AS trüb (mg/g)	AT 4 (mg/g)	AT 9 (mg/g)
Quercetin	n.n.	n.n.	2,2	7,1	17,78	11,0
Quercetin-3-rhamnosid	2,8	1,3	5,0	6,0	11,98	5,8
Quercetin-3-galaktosid	1,1	1,2	3,5	3,9	12,89	12,4
Quercetin-3-glukosid	0,7	0,4	1,8	2,2	6,07	8,9
Quercetin-xylosid	n.b.	n.b.	2,1	2,0	n.n.	n.n.
Quercetin-arabinosid	n.b.	n.b.	1,9	1,8	n.n.	n.n.
Ferulasäure	n.b.	n.b.	2,1	5,6	1,34	4,5
Sinapinsäure	n.b.	n.b.	1,1	2,6	n.n.	1,6
Isorhamnetin-3-O-hexosid	n.b.	n.b.	n.n.	n.n.	2,32	1,3
n.i. Dihydrochalcon	n.n.	6,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Total	404,4	363,7	544,3	354,0	542,0	423,9

2.4.4.4 Apfelsaftextrakt klar (AS klar)

Der Apfelsaftextrakt AS klar wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Carle (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim) hergestellt. Als Ausgangsprodukt des Extrakts AS klar diente Apfelsaft der Firma Streker (Aspach-Großaspach). Der Apfelsaft wurde aus Äpfeln unterschiedlicher Apfelsorten einer Streuobstwiese hergestellt, bei dem der Trub entfernt wurde. Zur Extraktion wurden 200 ml Apfelsaft auf pH 1,5 angesäuert und anschließend auf eine Festphasensäule (Lewatit VPOC 1064) gegeben. Nach dem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden die phenolischen Verbindungen mit Methanol eluiert und mittels Rotationsverdampfer eingengt. Die Extraktion erfolgte ebenfalls bei pH 1,5 mit Ethylacetat. Nach erneutem Einengen und Lyophilisierung wurden die Inhaltsstoffe mittels HPLC bestimmt [Matthias Fromm, persönliche Mitteilung].

2.4.4.5 Apfelsaftextrakt trüb (AS trüb)

Die Aufarbeitung erfolgte analog der Herstellung/Extraktion des AS klar. Als Ausgangsmaterial diente der gleiche Apfelsaft, jedoch vor der Trubentfernung.

2.4.5 Chemopräventives Potential von Apfelinhaltsstoffen im Kolon

Die Kanzerogenese kann als Mehrstufenprozess angesehen werden in dem es zu einer Anhäufung von genetischen und epigenetischen Veränderungen kommt. Strategien zur Prävention von Krebs zielen häufig auf ein Abfangen kanzerogener Stoffe aus dem Organismus ab, um ihr genotoxisches Potential zu minimieren. Darüber hinaus wird versucht die Bildung ultimativer Kanzerogene zu reduzieren, oder über eine Aktivierung der zellulären Abwehrsysteme eine verstärkte Detoxifizierung und Ausscheidung dieser Stoffe zu erreichen. Ebenso steht die Erkennung und Modulierung epigenetischer Veränderungen wie die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Eine Reihe von Studien beschreibt den Zusammenhang zwischen phenolischen Pflanzeninhaltsstoffen und deren biologischen Effekten, im Sinne einer chemopräventiven Wirkung.

DNA-Methylierung

Die Entwicklung von DNA-Methylierungsinhibitoren als potentielle Therapeutika der Kanzerogenese ist in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Sie könnten durch Inhibierung von DNMTs präventiv einer Hypermethylierung vorbeugen und so stillgelegte Gene reaktivieren. Sehr starke Inhibitoren, zu denen das Nukleosidanalogen 5-Aza-dC gehört, sind aufgrund ihrer starken Zytotoxizität jedoch nur bedingt einsetzbar. Folglich liegt der Fokus verstärkt auf der Suche und Identifizierung bioaktiver Nahrungsbestandteile mit ähnlichen Effekten auf die DNA-Methylierung ohne adverse Wirkungen.

Es ist bereits bekannt, dass bestimmte pflanzliche Polyphenole wie EGCG oder Genistein die Eigenschaft haben die Aktivität der DNA-Methyltransferasen zu beeinflussen. So konnten Fang et al. [2005] in humanen Ösophaguskarzinomzellen (KYSE 510) eine Reaktivierung der CpG-hypermethylierten Gene MGMT, p16^{INK4a} und hMLH1 nach Inkubation mit EGCG beobachten. Zusätzlich schützte EGCG nicht entartete Zellen vor einer Hypermethylierung [Fang et al., 2005]. Peng et al. [2006] konnten zusätzlich eine Verringerung der mRNA-Level von COX-2, das in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt, durch EGCG in den Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HCA-7 feststellen. Wie es zum Rückgang der Expression kommt, ist bisher noch unklar. Es wird jedoch vermutet, dass EGCG in verschiedene Signalwege eingreift, welche die Expression von COX-2 betreffen. Fini et al. [2007] erzielten in den humanen

Kolonkarzinomzelllinien RKO und SW48 eine Reaktivierung hypermethylierter Gene nach Inkubation mit einem Apfelextrakt. Die demethylierende Wirkung führten sie auf eine verringerte DNMT Expression und Inhibierung vorhandener DNMT zurück. Lee et al. [2006] untersuchten die Wirkung der Flavonoide Catechin, (-)-Epicatechin und Quercetin auf eine Inhibierung isolierter DNMTs. Sie beobachteten neben einer direkte Hemmung der DNMTs eine Verringerung der Enzymaktivität über eine verstärkte Bildung von SAH, das in der Literatur als effektiver Inhibitor von DNMTs beschrieben ist [Lee und Zhu, 2006]. SAH wird verstärkt bei der Metabolisierung der Flavonoide durch das Enzym COMT gebildet (siehe Kapitel 2.2.5).

Induktion von Phase-II Enzymen und antioxidative Eigenschaften

Die Initiation des Kanzerogeneseprozesses steht in engem Zusammenhang mit oxidativem Stress. Veeriah et al. [2006] konnten mittels Microarray eine Induktion von Enzymen des Phase-II Metabolismus durch Polyphenole aus Apfelsaft in HT29 Kolonkarzinomzellen nachweisen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h beobachteten sie einen Anstieg des relativen mRNA Levels von GSTP1, GSTT2, MGST2 und der Sulfotransferasen CHST5 - 7. Parallel detektierten sie eine Abnahme der Transkripte für das Enzym Epoxidhydrolase, welches für die metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren und anderer Kanzerogene verantwortlich ist. Vergleichbare Untersuchungen mit einem polyphenolreichen Apfelsaftextrakt in der präneoplastischen Kolonadenomzelllinie LT97 zeigten ebenfalls eine Induktion verschiedener GST und UGT Isoenzyme auf RNA- und Proteinebene [Veeriah et al., 2008].

Neben dieser sekundär antioxidativen Antwort der polyphenolreichen Extrakte besitzen viele Polyphenole *per se* ein antioxidatives Potential, indem sie mit freien Radikale reagieren [Zhao et al., 2001]. Darüber hinaus wurde eine Komplexierung von Metallionen durch Polyphenole beschrieben [Hider et al., 2001]. Vor allem Schwermetalle wie Eisen(II) sind in der Lage in wässriger Lösung die Bildung hochreaktiver ROS zu begünstigen (Fenton Reaktion) [Valko et al., 2006]. Untersuchungen von Bellion et al. [2010] zeigten, dass polyphenolreiche Extrakte aus Apfelsaft, Trester und Schale im zellfreien System (ORAC, TEAC) deutliche antioxidative Eigenschaften besitzen. Insbesondere oligomeren Procyanidinen, Derivaten der Hydroxyzimtsäuren und Dihydrochalkonen wird ein potentes antioxidatives Potential zugeschrieben. Procyanidine zeigen in zellbasierten Assays eine geringere Bioaktivität, da insbe-

sondere oligomere Procyanidine ab einem Polymerisationsgrad > 3 schlecht resorbiert werden [Rasmussen et al., 2005]. In Zellkulturuntersuchungen verringerten die Apfelextrakte potent den intrazellulären ROS Level nach Inkubation mit tBHQ und schützten die DNA von oxidativen DNA-Schädigungen. Eine Reduktion oxidativer DNA Schäden konnte ebenfalls bei einer humanen Interventionsstudie beobachtet werden, bei der Probanden über mehrere Wochen einen polyphenolreichen Mehrfruchtsaft tranken [Veeriah et al., 2006].

Diese Erkenntnisse zeigen, dass Apfelinhaltsstoffe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kanzerogenese-assoziierte Parameter, zu denen die DNA-Methylierung und die Entstehung von oxidativem Stress gehören, modulieren können. Das präventive Potential von Apfelinhaltsstoffen, im Hinblick auf die Entstehung von Lungen- und Kolonkrebs, wird durch eine Reihe epidemiologischer Studien unterstützt [Zessner et al., 2008; Jedrychowski und Maugeri, 2009]. Ziel aktueller Untersuchungen ist die Identifikation einzelner bioaktiver Komponenten und die Charakterisierung deren Wirkprofile.

2.4.6 Bildung von H_2O_2 im Zellkulturmedium

Polyphenole sind in der Lage mit teilweise noch unbekannten Bestandteilen des Zellkulturmediums zu reagieren und auf diese Weise H_2O_2 zu generieren [Halliwell et al., 2000; Dashwood et al., 2002; Hou et al., 2005]. Infolgedessen kommt es zu einer Anreicherung im Medium. Die Reaktivität der Polyphenole wird auf die Catecholstruktur zurückgeführt. Das Ausmaß der H_2O_2 Akkumulation ist unter anderem abhängig vom eingesetzten Zellkulturmedium. Long et al. [2000] konnten in „Dulbecco’s modified Eagle Medium“ (DMEM) die höchsten Konzentrationen an H_2O_2 feststellen. Als initialer Mechanismus wird die Autooxidation von Catecholstrukturen der Polyphenole diskutiert, wobei die Reaktion von im Zellkulturmedium vorhandenen Metallionen wie Cu^{2+} katalysiert werden soll [Lapidot et al., 2002; Hou et al., 2005].

Akagawa et al. [2003] zeigten an einer o-Hydrochinonstruktur, dass durch dessen Autooxidation in Anwesenheit von Cu^{2+} ein Semichinon entstehen kann (Abbildung 27). Dieses kann nun im weiteren Verlauf mit molekularem Sauerstoff zum entsprechenden o-Chinon weiterreagieren. Während der Autoxidation kommt es zur vermehrten Bildung von ROS wie beispielsweise H_2O_2 .

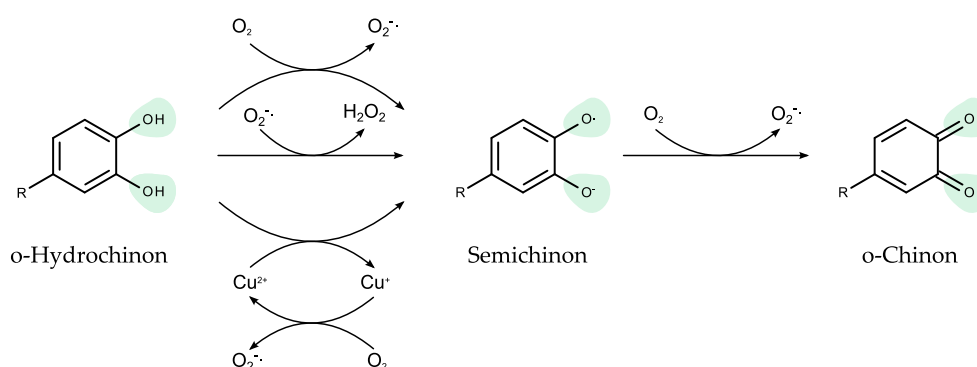


Abbildung 27: Möglicher Mechanismus der Autooxidation von Polyphenolen mit o-Chinonstruktur [modifiziert nach Akagawa et al., 2003].

Hinsichtlich der Menge an generierten ROS ist neben der Art des Mediums die Dauer der Substanzinkubation von entscheidender Bedeutung. Weiter wurde beobachtet, dass die Stabilität verschiedener Klassen von Polyphenolen unter Zellkulturbedingungen pH-Wert- und temperaturabhängig ist, wobei durch einen steigenden pH-Wert die Autooxidation begünstigt wird.

DeYulia und Cárcamo [2005] konnten zeigen, dass H_2O_2 den Phosphorylierungsstatus von Proteintyrosinkinasen steigert und somit an einer erhöhten Signaltransduktion mitwirkt. Dies konnte auch in Untersuchungen innerhalb des Arbeitskreises beobachtet werden. In Western Blot Experimenten mit Apfelextrakten hinsichtlich einer Änderung des Phosphorylierungsstatus des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) in HT29-Zellen wurde eine H_2O_2 -generierende Eigenschaft der Extrakte nachgewiesen [Fridrich et al., 2007b]. Um derartige Artefakte während der Substanzinkubation auszuschließen und die Effekte der eingesetzten Testsubstanzen zu bestimmen, wurden die Versuche in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) durchgeführt. Durch den Zusatz von Katalase disproportioniert H_2O_2 in Sauerstoff und Wasser und eine Akkumulation im Zellkulturmedium kann so unterdrückt werden [Veeriah et al., 2006; Fridrich et al., 2007b; Kern et al., 2007].

3 Problemstellung

Bisherige *in vitro* Untersuchungen innerhalb des Arbeitskreises haben gezeigt, dass polyphenolreiche Apfelextrakte kanzerogeneseassoziierte Signalwege modulieren und so zu einer Verringerung des Zellwachstums führen können [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007a]. So wurden neben der Beeinflussung der Zellproliferation und der protektiven Wirkung gegenüber ROS ebenfalls Hinweise auf eine Änderung der epigenetischen Genregulation beobachtet [Dissertation Roth, 2010, Diplomarbeit Blust, 2008].

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob ein komplexes Polyphenolgemisch aus Äpfeln in der Lage ist die DNA-Methylierung hypermethylierter Gene in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 zu beeinflussen. Im Mittelpunkt stand dabei das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}, das eine entscheidende Aufgabe in der Regulation des Zellzyklus besitzt und in Tumoren häufig durch Hypermethylierung stillgelegt ist [Herman et al., 1995; Ruas und Peters, 1998; Petko et al., 2005]. Darauf aufbauend sollte im Rahmen einer Pilotstudie mit Typ-II Diabetes Patienten der Methylierungsstatus des Tumorsuppressors in isolierten Kolonozyten aus Fäzesproben analysiert werden. Von besonderem Interesse war, inwiefern Typ-II Diabetiker, die ein erhöhtes Risiko besitzen an Kolonkrebs zu erkranken, bereits ein verändertes Methylierungsmuster von p16^{INK4a} aufweisen und ob der Konsum von polyphenolreichem Apfelsaft den Grad der Methylierung, im Sinne einer chemopräventiven Wirkung, beeinflusst.

Oxidativer Stress gilt als ein bedeutender Risikofaktor der Krebsentstehung [Toyokuni, 1998; Kang, 2002; Giudice und Montella, 2006]. Der zweite thematische Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der antioxidativen Wirksamkeit von Polyphenolen aus entpektinisiertem Apfeltrester im direkten Vergleich zu Apfelsaftextrakten. In diesem Kontext stellen die Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Zelle und die Prävention von DNA-Schäden Schlüsselstrategien der Chemoprävention dar [Lee und Johnson, 2004; Yu und Kensler, 2005; Giudice und Montella, 2006; Osburn und Kensler, 2008]. Die Zelle besitzt ein zentrales Abwehrsystem gegen oxidative bzw. nukleophile Angriffe, das sich unter anderem aus Enzymen des Phase-II Metabolismus zusammensetzt. Ein Teil dieser Enzyme wird auf transkriptioneller Ebene über das antioxidative responsive Element (ARE) in Zusammenspiel mit dem

Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert [Hayes et al., 1999; Giudice und Montella, 2006]. Für polyphenolreiche Extrakte aus Apfelsaft konnte bereits eine Induktion von detoxifizierenden und antioxidativ wirkenden Enzymen nachgewiesen werden [Veeriah et al., 2008; Soyalan et al., 2011]. Ob und inwieweit Extrakte aus Apfeltrester, die sich in ihrer Zusammensetzung signifikant von entsprechenden Extrakten aus Apfelsaft unterscheiden, eine ähnliche Wirkung besitzen, ist bislang noch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die antioxidative Wirkung von Apfeltresterextrakten im direkten Vergleich zu Apfelsaftextrakten ermittelt werden. Der Fokus lag hierbei auf der Modulation des Menadion-induzierten intrazellulären Redoxlevels und einer Transkriptionsanalyse des Enzyms GCL-C, das sich in Voruntersuchungen bereits als effektiver Biomarker hinsichtlich einer Änderung des Glutathionstatus erwiesen hat.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten sollte anhand des potentesten Extrakts überprüft werden, inwiefern zum einen der Nrf2-ARE Signalweg hinsichtlich der Induktion der GCL-C involviert ist und zum anderen ob auch weitere Nrf2-regulierte Enzyme in ihrer Transkription beeinflusst werden.

Zur Beantwortung der Frage, welche Inhaltsstoffe für die beobachteten Wirkungen verantwortlich sind, wurden die Leitverbindungen des Extrakts in die Untersuchungen mit einbezogen. Eine weitere Zuordnung der Bioaktivität zu bekannten Inhaltsstoffen und eine Identifikation weiterer Extraktkomponenten sollte anhand einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung ermittelt werden. Potentielle Synergismen der Inhaltsstoffe, oder additive bzw. antagonistische Effekte wurden unter Verwendung einer rekonstituierten Mischung aller bekannten Inhaltsstoffe des Extrakts erfasst.

Neben der direkten Wirkung der Extraktinhaltsstoffe sind Veränderungen während der gastrointestinalen Passage, insbesondere was eine *in vivo* Übertragbarkeit anbelangt, von besonderer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der Extrakt mithilfe eines gastromimetischen Modells fermentiert und die gewonnenen Fermentationsüberstände auf bereits bekannte Endpunkte untersucht. Darüber hinaus wurden die Fermentate auf eine Änderung des zellulären GSH-Levels und eine DNA-protective Wirkung im Comet-Assay untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Modulation der DNA-Methylierung durch Apfelpolyphenole

Im ersten Abschnitt dieser Dissertation wurde ein polyphenolreicher Apfelextrakt aus der Apfelsorte Bohnapfel (BAE) im Hinblick auf eine Modulation der Promotormethylierung des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Zur näheren Charakterisierung der biologischen Wirkung des BAE wurde dessen Hauptinhaltsstoff n-Chlorogensäure (CGA) in den Untersuchungen mitgeführt. Ferner war von Interesse, ob eine Veränderung im Methylierungsgrad des p16^{INK4a}-Promotors auf Transkriptionsebene einen erhöhten mRNA- und letztlich Proteingehalt bewirkt.

Untersuchung zur Promotormethylierung wurden mit Hilfe der methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR), Transkriptions- und Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer Real-time PCR (qPCR) sowie Western Blot Analyse durchgeführt.

Darüber hinaus wurde im Rahmen einer Pilotstudie an Typ-II Diabetes Patienten in Zusammenarbeit mit dem Max-Rubner-Institut Karlsruhe (MRI) untersucht, ob diese Zielgruppe *per se* einen abnormen Methylierungsgrad für den p16^{INK4a}-Promotor im Darm aufweist und ob der Konsum von naturtrübem Apfelsaft einen Einfluss auf die DNA-Methylierung des Gens besitzt. Im Fokus der Untersuchungen stand daher die Erfassung des Methylierungsgrades der DNA von abgeschilferten Kolonozyten, isoliert aus Fäzesproben der Typ-II Diabetes Patienten.

4.1.1 Wachstumshemmende Eigenschaften von Apfelpolyphenolen

Ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der untersuchten Testsubstanzen ist ihr Einfluss auf das Zellwachstum, analysiert mittels Sulforhodamin-B (SRB) Assay [Skehan et al., 1990]. Ein starker Rückgang der Proliferation nach Inkubation mit der Testsubstanz gibt Hinweise auf ein wachstumshemmendes oder zytotoxisches Potential, möglicherweise unter Beteiligung proliferationsassoziiierter Signalkaskaden. Somit geben die Ergebnisse Aufschluss über den Einsatz eines geeigneten Konzentrationsbereichs in den

nachfolgenden Experimenten, um Artefakte aufgrund zytotoxischer oder stark wachstumshemmender Effekte auszuschließen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass Polyphenole unter Zellkulturbedingungen nur eine eingeschränkte Stabilität besitzen und einem raschen Abbau unterliegen (z.B. CGA $t_{1/2}$ = 11 h) [Schaefer et al., 2006; Kern et al., 2007]. Da die Wirkung der phenolischen Substanzen auf die DNA-Methylierung u.a. auf einer Inhibierung der DNMT beruht, erfolgt die Abnahme des Methylierungsgrades bzw. die Veränderung des Methylierungsmusters erst nach einer Zellteilung. Direkt nach der Mitose liegt die DNA hemimethyliert vor, d.h. nur der parentale DNA-Strang trägt das Methylierungsmuster. Durch die Hemmung der DNMT kann dieses nun nicht mehr auf dem Tochterstrang vervollständigt werden. Demzufolge sind für eine erfolgreiche Modifikation des Methylierungsstatus mehrere Zellteilungen notwendig.

Für Apfelextrakte wurden mehrfach wachstumshemmende Eigenschaften beschrieben [Kern et al., 2005]. Eine Hemmung der Proliferation hätte jedoch Auswirkungen auf potentielle demethylierende Wirkungen der Testsubstanzen. Daher wurden die Inkubationszeiten für den SRB-Assay analog zu denen der MS-PCR Untersuchungen gewählt (48 h und 96 h; siehe Kapitel 4.1.2), um potentielle zytotoxische bzw. wachstumshemmende Effekte der Testsubstanzen unter den gegebenen Bedingungen zu detektieren. Aufgrund der Instabilität der Testsubstanzen wurde jeweils nach 24 h das Medium mit der entsprechenden Substanz gegen frisch angesetztes Inkubationsmedium ausgetauscht. Weiterhin wurden alle Inkubationen in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um einer Akkumulation von H_2O_2 entgegenzuwirken (siehe Kapitel 2.4.6).

Die Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit BAE für 48 h und 96 h führte zu keiner signifikanten Veränderung des Zellwachstums bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 28). Bei Konzentrationen > 100 $\mu\text{g/ml}$ BAE wurde ein potenter Rückgang der Proliferation beobachtet, der bei 250 $\mu\text{g/ml}$ BAE nach 96 h nur noch etwa 20 % der Lösungsmittelkontrolle betrug.

Weitere Untersuchungen innerhalb des Projekts zur Wachstumshemmung des BAE in HT29-Zellen nach 72 h Inkubation zeigten einen Rückgang der relativen Zelldichte auf unter 80 % der Lösungsmittelkontrolle ab 400 $\mu\text{g/ml}$ BAE [Dissertation Fridrich, 2008].

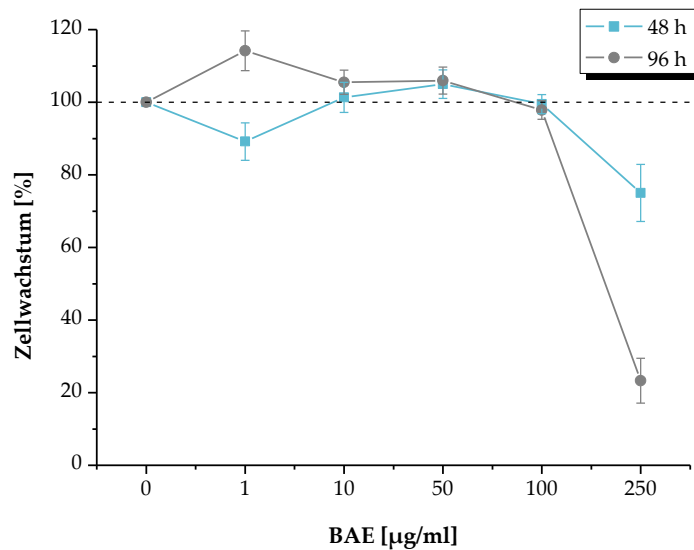


Abbildung 28: Hemmwirkung des Apfelsaftextraktes BAE auf das Wachstum von HT29-Zellen im SRB-Test, serumhaltig (10 % FKS), 100 U/ml Katalase. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten einer Vierfachbestimmung. BAE, Bohnapfelextrakt.

Darüber hinaus zeigten Untersuchungen des BAE in der Vulvakarzinomzelllinie A431 ebenfalls nach 72 h ab einer Konzentration $\geq 400 \mu\text{g/ml}$ in Anwesenheit von Katalase einen Rückgang des Zellwachstums auf etwa 60 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle [Dissertation Teller, 2010]. Sowohl Teller, als auch Fridrich konnten die Veränderungen des Zellwachstums auf eine Beeinflussung proliferationsassoziierter Signalkaskaden zurückführen. Der BAE wurde als Breitbandhemmstoff der ErbB-Rezeptorfamilie mit einer Präferenz zum EGFR charakterisiert [Dissertation Teller, 2010]. Eine Beeinflussung der Rezeptortyrosinkinaseaktivität konnte in einer Vielzahl an Studien mittels ELISA und Western Blot Untersuchungen bestätigt werden [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007a; Fridrich et al., 2007b]. Dies würde den in der vorliegenden Arbeit beobachteten konzentrations- und zeitabhängigen Rückgang der Proliferation nach Behandlung mit BAE im SRB-Assay erklären.

CGA, der Hauptinhaltsstoff von BAE (Tabelle 4), besitzt bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ keinen Einfluss auf das Zellwachstum von HT29-Zellen (Abbildung 29). Sowohl nach 48 h, als auch nach 96 h war keine merkliche Veränderung der relativen Zelldichte zu beobachten.

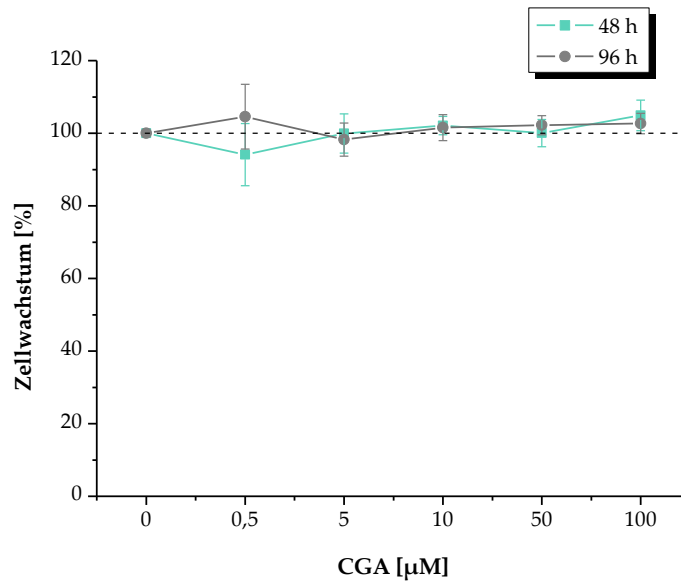


Abbildung 29: Hemmwirkung von CGA auf das Wachstum von HT29-Zellen im SRB-Test, serumhaltig (10 % FKS), 100 U/ml Katalase. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten einer Vierfachbestimmung. CGA, n-Chlorogensäure.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Dissertation zeigte eine Behandlung humaner Hepatokarzinomzellen (HepB3) mit bis zu 300 μM CGA nach 24 h ebenfalls keine Beeinflussung des Zellwachstums [Jin et al., 2005]. Demgegenüber beobachtete Kern [Dissertation Kern, 2006] im Rahmen ihrer Dissertation nach 72 h Inkubation mit CGA in HT29-Zellen wachstumshemmende Effekte ab Konzentrationen $> 150 \mu\text{M}$. Der IC_{50} -Wert wurde hier auf $205 \pm 53 \mu\text{M}$ berechnet, wobei beachtet werden muss, dass ohne Zusatz von Katalase inkubiert wurde. Auch Böttler konnte im Rahmen ihrer Dissertation in HT29-Zellen erst in hohen Konzentrationen $\geq 250 \mu\text{M}$ eine Reduktion des Zellwachstums durch CGA beobachten [Dissertation Böttler, 2010]. Ähnliche Effekte wurden von Lee und Zhu [2006] in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 beschrieben. Basierend auf der Menge an isolierter DNA beobachteten sie einen Rückgang des Zellwachstums bei 50 μM CGA (ohne Katalase) um ca. 15 % nach einer Langzeitinkubation von 8 d.

Unter Zellkulturbedingungen sind viele Polyphenole instabil [Schaefer et al., 2006; Kern et al., 2007]. So zerfällt CGA innerhalb weniger Stunden in Chinasäure und Kaffeesäure. In den Untersuchungen dieser Dissertation wurde das Medium nach 24 h durch frisches Medium inklusive Testsubstanz ausgetauscht. Aufgrund des Abbaus der Muttersubstanzen sind Effekte auf das Zellwachstum möglicherweise nur in hohen Konzentrationen zu beobachten, so

dass eine wachstumshemmende Eigenschaft nach 48 h und 96 h ausbleibt. Dies würde auch das geringe wachstumshemmende Potential des BAE erklären, der nur in hohen Konzentrationen ($> 100 \mu\text{g/ml}$, bei 96 h Inkubation) zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums der führte.

Ferner zeigen bisher unveröffentlichte Daten, dass CGA zu keiner Hemmung der EGFR Autophosphorylierung in HT29-Zellen bis $100 \mu\text{M}$ nach 45 min Inkubation führt [Diplomarbeit Krumböck, 2010]. Tendenziell beobachtete Krumböck eher eine leichte Zunahme der Rezeptoraktivität, was ebenfalls gegen eine Wachstumshemmung sprechen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BAE (bis zu $100 \mu\text{g/ml}$) und CGA (bis zu $100 \mu\text{M}$) nach 48 h Inkubation keinen Einfluss auf die Proliferation von HT29-Zellen im SRB Assay zeigten. Lediglich nach 96 h trat bei $250 \mu\text{g/ml}$ BAE ein potenter Rückgang der relativen Zelldichte auf. Wie bereits beschrieben besteht ein enger Zusammenhang zwischen Zellteilungsrate und dem demethylierenden Potential durch eine Testsubstanz. Folglich sind die Testsubstanzen dieser Dissertation bis zu oben genannten Konzentration in weiteren Assays zur Untersuchung der DNA-Methylierung einsetzbar, ohne dass Artefakte aufgrund einer verringerten Proliferation zu erwarten sind.

4.1.2 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die DNA-Methylierung von $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ *in vitro*

Die Entstehung von kolorektalen Tumoren ist charakterisiert durch einen mehrstufigen Prozess, in dem die Zelle sowohl genetische, als auch epigenetische Veränderungen der Erbinformation erfährt [Perera, 1996; Das und Singal, 2004]. Mehrere Gene, darunter das Tumorsuppressorgen $\text{p16}^{\text{INK4a}}$, weisen in einer Reihe von Tumoren eine hypermethylierte Promotorregion auf. Das $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ Protein besitzt eine essentielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus beim Übergang von der G1 in die S Phase (siehe Kapitel 2.2.6). Vor allem in Tumorzellen, die ein starkes Proliferationsverhalten aufweisen, ist $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ aufgrund einer extensiven Promotormethylierung stillgelegt. Eine Reaktivierung solcher Tumorsuppressorgene in frühen Stadien des Kanzerogeneseprozesses gilt als eine mögliche und vielversprechende Art der Chemoprävention [Kopelovich et al., 2003].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss des Bohnapfelextrakts BAE und dessen Hauptinhaltsstoff CGA auf die Beeinflussung der Promotormethylierung des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Die Methylierung der DNA wurde mit der Methode der MS-PCR erfasst, welche als zweistufige „nested“-PCR durchgeführt wurde. Der Methylierungsstatus wird durch die Anwesenheit der Fragmente für methylierte DNA und/oder nichtmethylierte DNA definiert. Eine Modulation der Promotormethylierung wird an einer Änderung der Bandenintensität dieser Fragmente im mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel ersichtlich. Bei hypermethylierten Genen wird in der Regel bevorzugt, oder nur die Bande für methylierte DNA erhalten. Ein zusätzlicher PCR-Ansatz mit einem Primerpaar, das im Promotorbereich von p16^{INK4a} hybridisiert, jedoch nicht zwischen einem methylierten bzw. nichtmethylierten Promotor diskriminiert, diente als interne Kontrolle (IC). Alle DNA-Amplifikate wurden anschließend über ein Agarosegel (2 %) getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die Fluoreszenz mittels LAS 3000 (Firma Raytest, FujiFilm) detektiert.

In ersten Untersuchungen war der BAE nach 24 h Inkubation im Hinblick auf eine Veränderung des Methylierungsstatus des Tumorsuppressors bereits untersucht worden. Hierbei wurde nur eine marginale Veränderung der Promotormethylierung beobachtet [Diplomarbeit Blust, 2008]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für weitere Untersuchungen längere Inkubationszeiten gewählt, da nach 24 h Behandlungszeit demethylierende Effekte möglicherweise noch nicht vollständig zum Tragen kommen.

Wie an der Lösungsmittelkontrolle in Abbildung 30 - 33 ersichtlich, liegt die Promotorregion des p16^{INK4a} Gens in HT29-Zellen hypermethyliert vor, erkennbar am Auftreten nur einer Bande bei einer Größe von ca. 81 bp für methylierte DNA. Eine Behandlung der HT29-Zellen mit BAE im Konzentrationsbereich von 1 - 250 µg/ml für 48 h führte zu einer Demethylierung, erkennbar am Erscheinen einer Bande für unmethylierte DNA ebenfalls bei einer Größe von ca. 81 bp (Abbildung 30). Leider erwies sich der Nachweis unmethylierter DNA in drei unabhängig durchgeführten Experimenten nicht als konzentrationsabhängig und eindeutig reproduzierbar. Die mitgeführten Kontrollen Wasser, Primer etc. ließen keine DNA-Bande im Gel erkennen, sodass eine Verunreinigung des PCR-Ansatzes ausgeschlossen werden konnte. Lediglich bei einer Konzentration von 20 µg/ml BAE wurde in zwei von drei Experimenten eine deutliche Bande für demethylierte DNA detektiert.

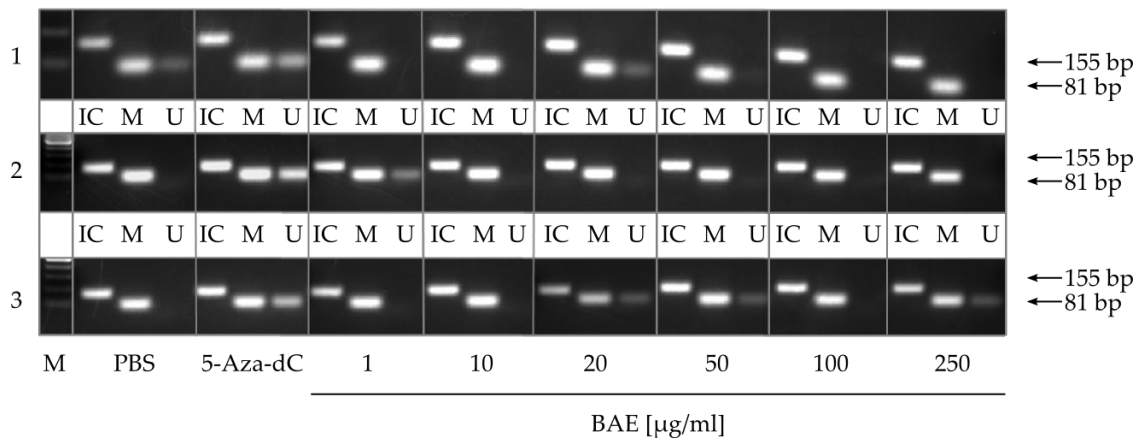


Abbildung 30: Modulation des Methylierungsstatus von p16^{INK4a} durch Bohnapfelextrakt (BAE) in HT29-Zellen nach 48 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) erfasst mittels MS-PCR. Als Positivkontrolle diente 5-Aza-dC (10 µM). Abgebildet sind die Gele aus drei unabhängigen Versuchen; n = 3; IC, interne Kontrolle bei 155 bp; M, Methyliert und U, Unmethyliert bei 81 bp.

Der als Positivkontrolle mitgeführte spezifische DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-dC bewirkte in allen Versuchen eine deutliche Demethylierung der Promotorregion, erkennbar an der Zunahme der Bandenintensität für unmethylierte DNA. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität für methylierte DNA war in keinem Versuchsansatz ersichtlich (Abbildung 30). Damit ist anzunehmen, dass 5-Aza-dC nicht in der Lage war nach einer Inkubationszeit von 48 h die Promotorregion von p16^{INK4a} vollständig zu demethylieren. Als interne Beladungskontrolle des Agarosegels (IC, 155 bp) diente ein Primerpaar, das nicht zwischen methylierter und unmethylierter p16^{INK4a}-Promotorregion diskriminiert.

Nach einer Behandlungszeit von 96 h bewirkte BAE ebenfalls bei einer Konzentration von 20 µg/ml in zwei von drei Experimenten das Erscheinen der spezifischen Bande für unmethylierte DNA (Abbildung 31). Die Ergebnisse waren auch bei der Langzeitinkubation sehr heterogen und sind möglicherweise auf intrazelluläre Schwankungen der Promotormethylierung zurückzuführen. Für die Positivkontrolle 5-Aza-dC wurde analog zu 48 h eine potente Demethylierung nachgewiesen, wobei ebenfalls keine Veränderung der Bande für methylierte DNA ersichtlich war.

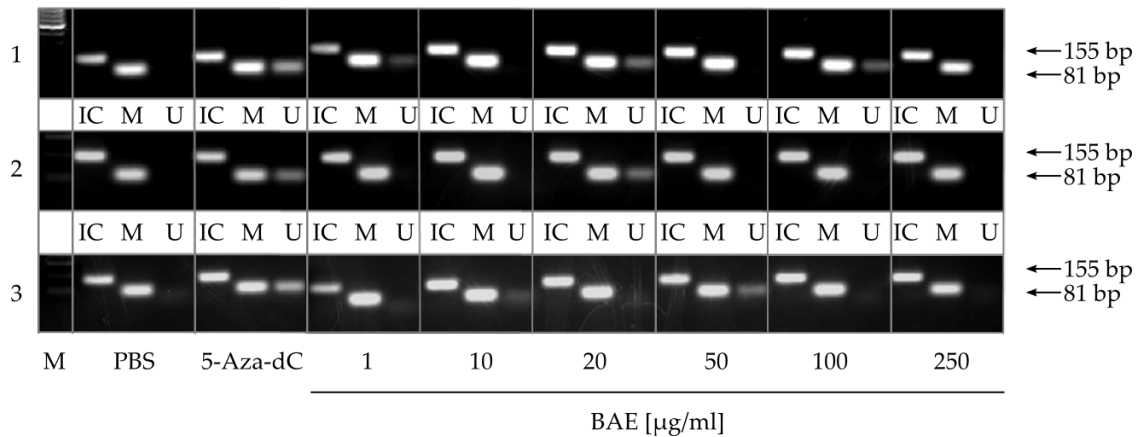


Abbildung 31: Modulation des Methylierungsstatus von p16^{INK4a} durch Bohnapfelextrakt (BAE) in HT29-Zellen nach 96 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) erfasst mittels MS-PCR. Als Positivkontrolle diente 5-Aza-dC (10 µM). Abgebildet sind die Gele aus drei unabhängigen Versuchen; n = 3; IC, interne Kontrolle bei 155 bp; M, Methyliert und U, Unmethyliert bei 81 bp.

Die Phenolcarbonsäure CGA, wurde im Konzentrationsbereich von 0,5 - 100 µM ebenfalls im Hinblick auf demethylierende Eigenschaften in HT29-Zellen untersucht. Nach Behandlung der Zellen für 48 h mit CGA wurde eine reproduzierbare Demethylierung des p16^{INK4a} Promotors bei einer Konzentration von 50 µM CGA detektiert (Abbildung 32). Im restlichen Konzentrationsbereich zeigte CGA keine reproduzierbaren demethylierenden Effekte auf den p16^{INK4a}-Promotor. Die Intensität der Bande für methylierte DNA blieb optisch gesehen unverändert.

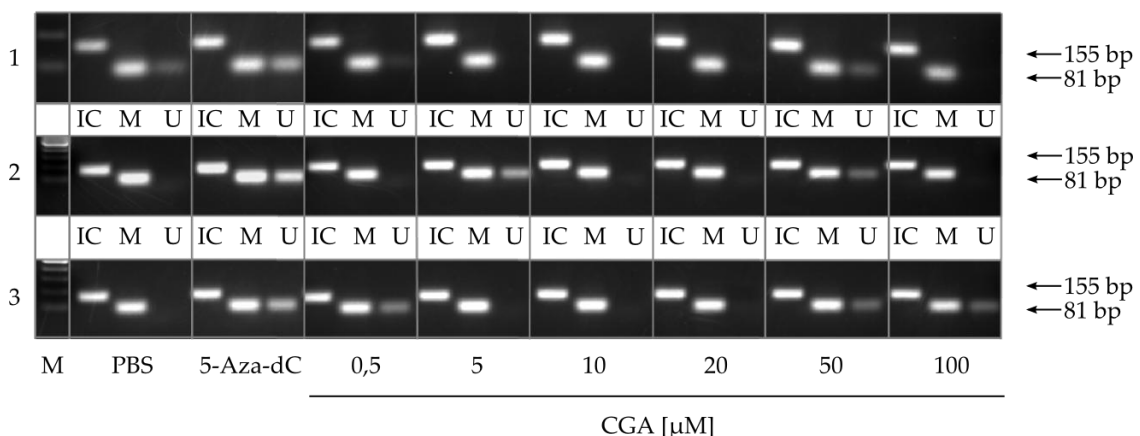


Abbildung 32: Modulation des Methylierungsstatus von p16^{INK4a} durch n-Chlorogensäure (CGA) in HT29-Zellen nach 48 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) mittels MS-PCR. Als Positivkontrolle diente 5-Aza-dC (10 µM). Abgebildet sind die Gele aus drei unabhängigen Versuchen; n = 3; IC, interne Kontrolle bei 155 bp; M, Methyliert und U, Unmethyliert bei 81 bp.

Langzeitinkubationen mit CGA für 96 h bewirkten in HT29-Zellen über den kompletten Konzentrationsbereich von 0,5 - 100 μM vereinzelt eine Demethylierung der p16^{INK4a} Promotorregion (Abbildung 33). Bei 0,5 und 100 μM CGA wurde reproduzierbar in allen Experimenten ein Fragment für unmethylierte DNA erhalten. Optisch betrachtet verblieben die Bandenintensitäten für methylierte DNA bei behandelten und unbehandelten Zellen auf gleichem Niveau.

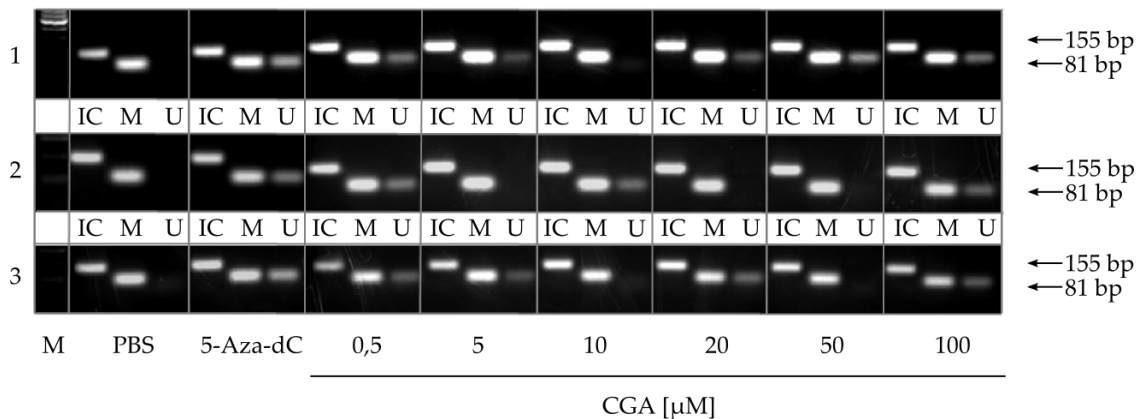


Abbildung 33: Modulation des Methylierungsstatus von p16^{INK4a} durch n-Chlorogensäure (CGA) in HT29-Zellen nach 96 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) mittels MS-PCR. Als Positivkontrolle diente 5-Aza-dC (10 μM). Abgebildet sind die Gele aus drei unabhängigen Versuchen; n = 3; IC, interne Kontrolle bei 155 bp; M, Methyliert und U, Unmethyliert bei 81 bp.

Die dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl BAE als auch CGA die DNA-Methylierung in HT29-Zellen modulieren können. Hierbei zeigte sich jedoch für den komplexen Apfelextrakt hinsichtlich einer demethylierenden Wirkung kein signifikanter Unterschied zwischen einer Inkubationszeit von 48 h oder 96 h. Nach beiden Zeitpunkten wurde bei 20 $\mu\text{g/ml}$ BAE eine Bande für unmethylierte DNA detektiert. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass keine Konzentrationsabhängigkeit des BAE beobachtet wurde. Auffällig ist, dass in jedem Experiment eine Bande für methylierte DNA amplifiziert wurde, deren Bandenintensität innerhalb der Untersuchungen optisch gesehen auf gleichem Niveau verblieb. Somit ist zu erwarten, dass selbst nach einer Behandlung mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-dC es zu keiner vollständigen Demethylierung des Promotors kam oder die Primer schon bei einem sehr geringen Methylierungsgrad eine hohe Affinität zur entsprechenden DNA-Sequenz besitzen. Analysen von Fridrich innerhalb des Projekts zeigten, dass nach einer Behandlung von HT29-Zellen über 24 h mit BAE der Methylierungsstatus des p16^{INK4a}

Promotors keine Veränderung erfährt [Fridrich Dissertation, 2008]. Da die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation jedoch eine Demethylierung des Promotors nach 48 h und 96 h durch BAE andeuten, scheint vermutlich die Dauer der Inkubation einen entscheidenden Einfluss auf die Modulation der Methylierung zu besitzen. Diese Annahme wird durch zahlreiche Untersuchungen zur Modulation der DNA-Methylierung durch phenolische Verbindungen gestützt [Fang et al., 2003; Lee et al., 2005; Lee und Zhu, 2006; Fang et al., 2007]. In den meisten publizierten *in vitro* Experimenten kommen Inkubationszeiten der Testsubstanzen > 4 d zum Einsatz [Fini et al., 2007]. Fang et al. [2007] konnten zeigen, dass eine Behandlung von HT29- und KYSE510-Zellen mit 20 µM Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) mit steigender Inkubationszeit zu einer Reaktivierung von p16^{INK4a} führte. Als Messgröße diente die relative mRNA Transkriptmenge des Tumorsuppressors. Darüber hinaus wurde in der Zelllinie KYSE510 nach Inkubation mit EGCG für 6 d eine Demethylierung des Genpromotors von hMLH1, RARβ und MGMT beobachtet. Ein direkter Vergleich mit genannten Studien lässt vermuten, dass die Inkubationszeiten von 48 h und 96 h im Rahmen dieser Dissertation möglicherweise zu kurz gewählt wurden, um eine reproduzierbare Demethylierung der DNA über den getesteten Konzentrationsbereich zu erhalten.

Untersuchungen von Fini et al. [2007] zur Modulation der DNA-Methylierung von p16^{INK4a} und des DNA-Reparaturgens hMLH1 durch einen polyphenolreichen Extrakt aus Annurca-äpfeln zeigten, dass dieser ab einer Inkubationszeit von 2 d eine Demethylierung der hypermethylierten Promotorregion in der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO bewirkt. Getestet wurde der Apfelextrakt bis zu einer Behandlungszeit von 8 d, wobei kein zeitabhängiger Effekt bei der Untersuchung des Methylierungsmusters zu beobachten war. Die Demethylierung ging mit einem Anstieg der Transkripte und der Proteinexpression für p16^{INK4a} einher. Um der Frage nachzugehen, wie es zu den demethylierenden Effekten kommt, wurde von Fini et al. [2007] zusätzlich die Expression der DNMT1 und 3b mit erfasst. Nach 48 h Inkubation mit dem Apfelextrakt kam es zu keiner Veränderung der relativen Proteinexpression von DNMT1 und 3b, jedoch zeigte sich nach weiteren 48 h (ohne Nachinkubation) eine signifikante Abnahme der Expression beider DNMT Isoenzyme. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit verschiedenen Catechinen aus grünem Tee und Isoflavonen aus Soja erzielt [Lee et al., 2005]. In beiden Studien wurde von einer Beeinflussung der Proteintranslation ausgegangen, da auf RNA-Ebene keine Veränderung der Transkriptmenge beobachtet wurde.

Darüber hinaus konnte durch *in silico* Untersuchungen gezeigt werden, dass EGCG ein Substrat der COMT darstellt und an Position 4' und 4'' methyliert werden kann. Bei dieser Reaktion dient SAM als Methyl donor. EGCG selbst wirkt bis zu einem gewissen Grad ebenfalls sowohl als kompetitiver, als auch nicht kompetitiver Inhibitor der COMT. Da die COMT und DNMT zur gleichen Superfamilie, den Methyltransferasen zählen wurde von Fang et al. [2003] der Einfluss von EGCG auf die Aktivität der DNMT untersucht. Dabei zeigte EGCG in einem nukleären Extrakt aus KYSE510 Zellen ein potentes inhibitorisches Potential hinsichtlich der DNMT-Aktivität. Methylierungsprodukte von EGCG waren ebenfalls in der Lage DNMT kompetitiv zu hemmen [Fang et al., 2003]. In diesem Zusammenhang zeigte EGCG gegenüber strukturverwandten Verbindungen wie (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechingallat (ECG) oder (-)-Epicatechin (EC) das stärkste inhibitorische Potential. Für eine potente Hemmeigenschaft scheint unter Anderem der Gallatrest eine entscheidende Rolle zu spielen. Er besitzt eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms und verhindert die Bindung zum Cytosin der DNA. Dem Isoflavon Genistein konnte ebenfalls ein inhibitorisches Potential für DNMT nachgewiesen werden, wobei die Wirkstärke im Vergleich zu EGCG geringer ist. Dennoch zeigt Genistein in *in vitro* Untersuchungen eine vergleichbare Wirkqualität wie EGCG, da es eine erhöhte Stabilität unter Zellkulturbedingungen besitzt. [Fang et al., 2007]. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass Genistein eine Veränderung der globalen CpG-Methylierung bewirken kann [Day et al., 2002].

Der Bohnapfelextrakt, der im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde enthält nur sehr geringe Mengen an EC (31,0 mg/g Extrakt). Bei der maximal getesteten BAE Konzentration von 250 µg/ml entspricht dies ca. 26,7 µM EC. Untersuchungen von Fang et al. [2003] am isolierten Enzym haben gezeigt, dass EC bis 50 µM nur einen marginalen Einfluss auf die DNMT-Aktivität besitzt. Dies lässt vermuten, dass der Beitrag von EC zur Modulation der DNA-Methylierung durch den BAE zu vernachlässigen ist.

Mit einem Anteil von 39 %, berechnet auf den Gesamtpolyphenolgehalt des BAE, stellt CGA den Hauptinhaltsstoff des komplexen Extrakts dar. Nach Behandlung von HT29-Zellen für 48 h wurde bei einer Konzentration von 50 µM CGA reproduzierbar eine Demethylierung des p16^{INK4a} Promotors beobachtet (Abbildung 32). Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde über den untersuchten Konzentrationsbereich von 0,5 - 100 µM eine Abnahme der Pro-

motormethylierung nachgewiesen, wobei 0,5 und 100 μM CGA reproduzierbar in allen Experimenten ein Fragment für unmethylierte DNA in der MS-PCR ergaben (Abbildung 33).

In der humanen Brustkrebszelllinie T-47D konnte die Arbeitsgruppe um Lee und Zhu [2006] nach Inkubation mit 20 und 50 μM CGA eine Demethylierung des p16^{INK4a} Promotors mittels MS-PCR detektieren. Die Intensität der Bande für methylierte DNA blieb ebenfalls wie in den Untersuchungen dieser Dissertation beobachtet unverändert. Diese Daten stützen die in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse in HT29-Zellen. Darüber hinaus konnte für CGA und Kaffeesäure in den Brustkrebszelllinien MCF7 und MDA-MB-231 eine konzentrationsabhängige Demethylierung des RAR β Promotors nachgewiesen werden. Beide Substanzen wurden zusätzlich auf eine potentielle Hemmung isolierter DNMT im zellfreien System untersucht. Sowohl CGA, als auch Kaffeesäure führten in Abwesenheit des Enzyms COMT zu einer marginalen Hemmung der DNMT Enzymaktivität. Nach Zusatz von 2 - 4 U COMT pro Reaktionsansatz kam es zu einem signifikanten Rückgang der Methyltransferaseaktivität, während der Anteil an SAH signifikant zunahm. SAH wurde in mehreren Studien als Feedback-Inhibitor der DNMT und COMT Enzymfamilien identifiziert [Coward et al., 1972; Coward und Slisz, 1973; Fang et al., 2007; Saavedra et al., 2009]. Für CGA wurde *in vivo* eine Verschiebung des SAM/SAH Verhältnisses zugunsten von SAH beschrieben [Olthof et al., 2001a]. Eine intragastrische Gabe von EGCG im Tierversuch zeigte ebenfalls eine Erhöhung von SAH bei gleichzeitiger Abnahme der SAM-Plasmagehalte [Fang et al., 2007]. Eine mögliche Beeinflussung der DNMT in HT29-Zellen über einen negativen Feedback Mechanismus durch CGA wäre demnach möglich (siehe Kapitel 2.2.5).

Polyphenolreiche Extrakte aus grünem Tee werden bereits in klinischen Studien zur Prävention von Tumoren des Mund- und Rachenraums untersucht [Moyers und Kumar, 2004]. Darüber hinaus wäre auch bei anderen Krebsarten wie Kolonkrebs aufgrund ihrer vielversprechenden biologischen Eigenschaften ein Einsatz zu chemopräventiven und therapeutischen Zwecken denkbar [Li und Tollefsbol, 2010].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der untersuchte BAE bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ den Methylierungsgrad des p16^{INK4a} Genpromotors in humanen Kolonkarzinomzellen verringert. In den durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch keine Abhängigkeit von der Konzentration oder Inkubationszeit beobachtet. CGA, der Hauptinhaltsstoff von

BAE, wies ebenfalls ein demethylierendes Potential auf, wobei die Wirkung mit steigender Inkubationsdauer zunahm. Analog zu BAE konnte auch bei den Experimenten mit CGA keine Konzentrationsabhängigkeit verzeichnet werden. Ob und inwieweit andere Inhaltsstoffe neben CGA einen Einfluss auf die DNA-Methylierung besitzen kann zu diesem Zeitpunkt nur begrenzt beantwortet werden. Generell ist bei allen Verbindungen mit Catecholstruktur und Affinität zur COMT eine negative Feedbackhemmung über einen SAH Anstieg möglich. In der Literatur wird eine direkte Hemmung der DNMT vor allem auf Substanzen mit einem Gallussäurerest zurückgeführt [Fang et al., 2007].

4.1.3 Modulation der Transkription und Expression von p16^{INK4a} durch Apfelpolyphenole

Eine Hypermethylierung der Promotorregion geht meist mit einer Stilllegung des betroffenen Gens einher. Der Zelle ist es nicht mehr möglich das Gen erfolgreich abzulesen, sodass kein Transkript gebildet wird. Tumorzellen nutzen diesen Mechanismus gezielt, um Tumorsuppressorgene, Gene der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur auszuschalten, und so ihr eigenes Überleben zu sichern (siehe Kapitel 2.2.2).

Bei einer Veränderung des Methylierungsmusters sind der Transkript- und letztlich der Proteinlevel für die Zelle von entscheidender Bedeutung. Eine Abnahme der DNA-Methylierung muss nicht zwingend mit einer Reaktivierung der Gentranskription und Expression einhergehen. Die Methode der methylierungsspezifischen PCR erfasst nur einen kleinen Abschnitt der methylierten Promotorregion, der wiederum durch die eingesetzten Primer festgelegt wird. Aufgrund dessen sind eine nachfolgende Bestimmung der Menge an Gentranskripten, sowie Untersuchungen zu Veränderungen der Proteinexpression unerlässlich, um eine Aussage treffen zu können, ob und inwieweit eine Reaktivierung des Gens stattfindet.

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation zur Modulation der DNA-Methylierung von p16^{INK4a} wurden DNA und RNA parallel aus einem Inkubationsansatz isoliert. Dies erlaubt eine direkte Gegenüberstellung von Methylierungsstatus des p16^{INK4a} Promoters und der p16^{INK4a} Transkriptmenge. Als analytische Methode zur Bestimmung des relativen Transkriptlevels von p16^{INK4a} diente die quantitative Real Time PCR (qPCR). Normiert wurde auf das interne Kontrollgen β -Aktin. Veränderungen in der Proteinexpression

von p16^{INK4a} wurden aus einem parallel durchgeführten Inkubationsansatz erfasst. Hinsichtlich einer Modulation des Transkriptlevels wird eine minimale Veränderung um den Faktor 2 (relative Transkriptmenge: ≥ 2 = Erhöhung; relative Transkriptmenge: $\leq 0,5$ = Erniedrigung) festgelegt bzw. wenn ein signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle vorlag.

Nach einer Behandlung von HT29-Zellen für 48 h mit BAE im Konzentrationsbereich von 1 - 250 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich keine Veränderung des relativen mRNA-Levels im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 34A). In hohen Konzentrationen wurde tendenziell ein marginaler, jedoch nicht signifikanter Rückgang der Transkripte für p16^{INK4a} verzeichnet. Der DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-dC führte ebenfalls zu keiner Veränderung der mRNA Menge. Vergleichbare Ergebnisse für BAE wurden nach einer Inkubationsdauer von 96 h erzielt (Abbildung 34B). Hier war ebenfalls keine signifikante Änderung des relativen Transkriptlevels von p16^{INK4a} zu beobachten.

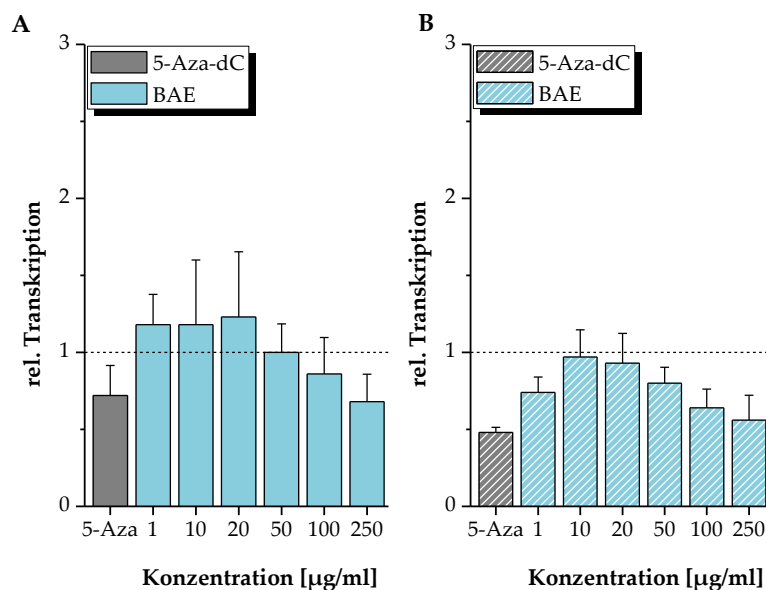


Abbildung 34: Modulation der Transkription von p16^{INK4a} durch BAE in HT29-Zellen nach a) 48 h Inkubation und b) 96 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die Transkriptmenge ist auf das endogene Kontrollgen β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, bei denen die Lösungsmittelkontrolle als Kalibrator diente. Positivkontrolle: 5-Aza-dC [10 μM].

Unerwartet war, dass 5-Aza-dC sowohl nach 48 h als auch nach 96 h in den Kolonzellen keine Erhöhung der p16^{INK4a} Transkriptmenge bewirkte (Abbildung 34 und Abbildung 35). Nach Behandlung der Zellen für 96 h mit 5-Aza-dC deutete sich eine Abnahme des mRNA-Levels an.

CGA bewirkte im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 - 250 μM ähnlich wie BAE keine Veränderung der p16^{INK4a} Transkriptmenge in HT29-Zellen. Nach beiden untersuchten Inkubationszeiten verblieben die relativen mRNA-Level annähernd auf gleichem Niveau, wobei sich nach 96 h in hohen Konzentrationen bis 100 μM eine leichte Abnahme andeutete (Abbildung 35).

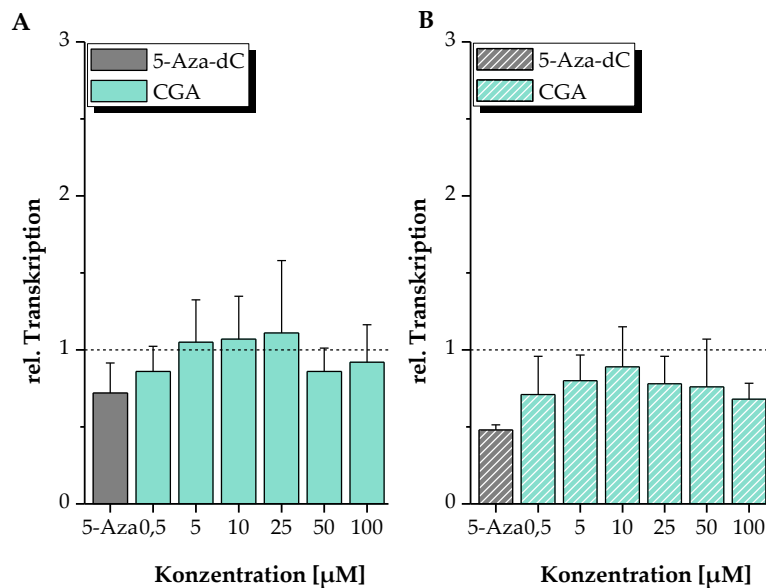


Abbildung 35: Modulation der Transkription von p16^{INK4a} durch CGA in HT29-Zellen nach a) 48 h Inkubation und b) 96 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die Transkriptmenge ist auf das endogene Kontrollgen β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, bei denen die Lösungsmittelkontrolle als Kalibrator diente. Positivkontrolle: 5-Aza-dC [10 μM].

Zusätzlich wurde der Einfluss von BAE und CGA auf die Expression von p16^{INK4a} in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 mittels Western Blot Analyse untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Lysat aus der Osteosarkomzelllinie Saos2. Die Promotorregion von p16^{INK4a} in Saos2 liegt nicht hypermethyliert vor, sodass der Tumorsuppressor exprimiert wird.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Western Blot Untersuchungen nach Inkubation mit BAE und CGA sowohl nach 48 h als auch 96 h dargestellt. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin bei ca. 55 kD detektiert. Anhand der Lösungsmittelkontrolle PBS zeigte sich deutlich, dass die Zelllinie HT29 kein p16^{INK4a} Protein exprimiert. Eine Behandlung der Zellen mit 5-Aza-dC für 48 h und 96 h bewirkte das Erscheinen der spezifischen Proteinbande für p16^{INK4a} bei ca. 16 kD. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Reaktivierung des Gens zurückzuführen und stützt die Ergebnisse der MS-PCR, in der eine Zunahme der Bande für

unmethylierte DNA nach 5-Aza-dC Inkubation nachgewiesen wurde. Basierend auf einer optischen Auswertung der Proteinbanden war keine Intensitätszunahme der Bande nach einer längeren Inkubationszeit zu erkennen.

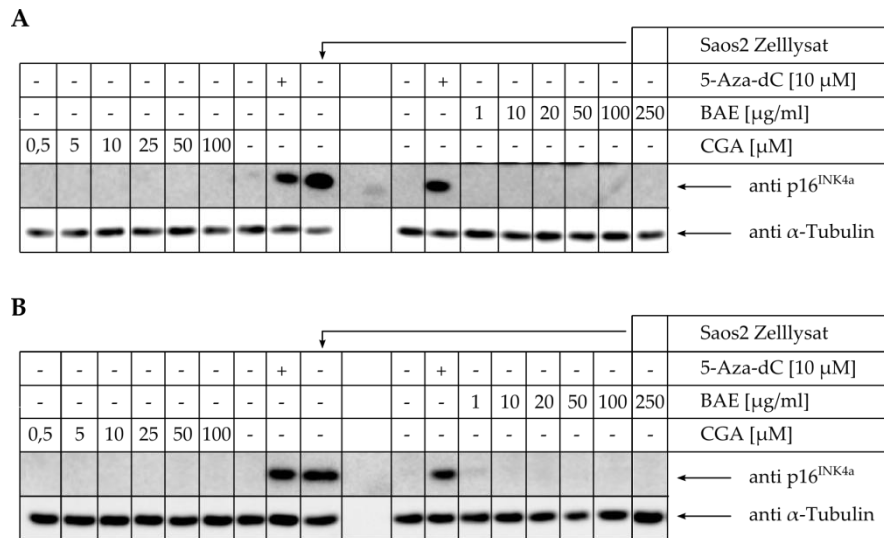


Abbildung 36: Modulation der Expression von p16^{INK4a} in HT29-Zellen durch BAE und CGA in Gegenwart von Katalase (100 U/ml); a) 48 h und b) 96 h Inkubation; Western Blot Analyse; Abgebildet ist jeweils ein Blot einer Dreifachbestimmung. Das Saos2-Zelllysate diente als Antikörperkontrolle. BAE: Bohnapfelextrakt; CGA: n-Chlorogensäure.

Obwohl die mRNA-Gehalte für p16^{INK4a} durch 5-Aza-dC im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unverändert bzw. eher reduziert waren, kann von einer Reaktivierung des Gens ausgegangen werden, da eine Expression des Proteins nachgewiesen wurde. Bei Betrachtung der C_t Werte für β-Aktin fielen vor allem bei den Inkubationen mit 5-Aza-dC Schwankungen von etwa einem C_t auf. Dies könnte nach der Normierung der p16^{INK4a} Transkripte auf β-Aktin und letztlich auf die Lösungsmittelkontrolle fälschlicherweise eine verringerte Transkription für 5-Aza-dC vortäuschen. Es ist daher ratsam, die Untersuchungen mit mindestens einem weiteren internen, nicht modulierten Kontrollgen zu wiederholen. Neben der quantitativen Bestimmung der p16^{INK4a} mRNA-Transkripte wurde ebenfalls eine konventionelle PCR und Detektion mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid durchgeführt. Erste orientierende Untersuchungen zeigten eine Erhöhung der Transkripte für p16^{INK4a} nach 48 h Inkubation mit 5 µM 5-Aza-dC (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der beobachteten Expression von p16^{INK4a} nach Behandlung von HT29-Zellen mit 5-Aza-dC. Da

bei dieser Versuchsdurchführung die β -Aktin-Transkripte nicht miterfasst wurden müsste dies in nachfolgenden Untersuchungen verifiziert werden.

Der Bohnapfelextrakt und CGA bewirkten in HT29-Zellen bis zu einer Inkubationsdauer von 96 h keine nachweisbare Proteinexpression von p16^{INK4a}. Dies stimmt einerseits mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalysen überein, die ebenfalls keinen Anstieg des relativen mRNA Levels zeigten. Dennoch wären, basierend auf den Experimenten zur DNA-Methylierung, für den BAE bei einer Konzentration von 20 μ g/ml eine messbare Reaktivierung des Tumorsuppressors denkbar gewesen. Auch die CGA Inkubation zeigte bei 50 μ M (48 h Inkubation) bzw. 0,5 und 100 μ M (96 h Inkubation) reproduzierbar eine Demethylierung des Promotors. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Veränderung der Promotor-methylierung durch beide Testsubstanzen möglicherweise nicht ausreichte, um die Transkription und Expression von p16^{INK4a} in HT29-Zellen zu reaktivieren.

Bislang gibt es wenige Studien, die eine Veränderung der DNA Methylierung mit einhergehender Reaktivierung des hypermethylierten Gens durch komplexe Pflanzenextrakte beschreiben. Meist werden isolierte Substanzen, oder Leitverbindungen gewisser Pflanzen für die Untersuchungen herangezogen. Fini et al. [2007] beobachteten nach Inkubation von RKO und SW480 Zellen mit einem polyphenolreichen Extrakt aus Annurcaäpfeln eine gesteigerte mRNA-Transkription der hypermethylierten Gene hMLH1 und p16^{INK4a}. Für hMLH1 konnte die Reaktivierung des Gens ebenfalls auf Proteinebene verifiziert werden. Vergleichbare Effekte auf die p16^{INK4a} Transkription wurde durch eine Langzeitinkubation mit EGCG erzielt [Fang et al., 2003; Lee et al., 2005]. Eine Behandlung von KYSE510 Zellen mit 20 μ M EGCG für 5 - 40 d wies eine zeitabhängige Erhöhung des relativen Transkriptlevels von p16^{INK4a} und MGMT auf. Die Zellen wurden alle 5 d subkultiviert und jeden Tag mit frischem Inkubationsmedium behandelt.

Für CGA wurde bereits ein Einfluss auf die DNA-Methylierung in MCF-7 und MAD-MB-231 Zellen beschrieben, jedoch ist insgesamt die Datenlage zur Veränderung der Transkription und Expression hypermethylierter Gene durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe limitiert [Lee und Zhu, 2006].

In der Literatur ist die Demethylierung und Reexpression hypermethylierter Gene durch einen polyphenolreichen Apfelextrakt und verschiedene Einzelsubstanzen wie EGCG oder Quercetin beschrieben [Fang et al., 2003; Fini et al., 2007]. Die Inkubationsdauer anderer Stu-

dien unterscheidet sich jedoch deutlich von den in dieser Dissertation gewählten Zeiten. Die Inkubation der Zellen dauerte vereinzelt bis zu 40 d. Somit scheinen längere Inkubationszeiten für eine erfolgreiche Demethylierung und Reaktivierung stillgelegter Gene erforderlich zu sein. Zu Bedenken bleibt jedoch, dass bei Langzeitinkubationen meist eine Subkultivierung der Zellen mit Trypsin durchgeführt werden muss. Trypsin greift neben Zelladhäsionsproteinen auch Membranproteine an. Eine erleichterte Aufnahme der Testsubstanzen direkt nach der Subkultivierung kann somit nicht ausgeschlossen werden und dadurch neben der längeren Inkubationsdauer zu einem verstärkten Effekt führen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass weder BAE noch CGA sowohl nach 48 h als auch nach 96 h die relative Transkriptmenge von p16^{INK4a} in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 beeinflussen. Die Frage bleibt offen, ob das interne Kontrollgen durch 5-Aza-dC in seiner Transkription moduliert wird, und daher die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse mit Vorbehalt zu sehen sind. Ferner war bis zu einer Inkubationsdauer von 96 h keine Änderung des relativen Proteinlevels des Tumorsuppressors durch BAE und CGA erkennbar.

4.1.4 Pilotstudie zur Modulation der DNA-Methylierung von p16^{INK4a} in Typ-II Diabetikern

Der Früherkennung von Tumoren wird aus gesellschaftlicher und klinischer Sicht ein hoher Stellenwert zugeschrieben. Meist handelt es sich bei den Diagnosemethoden um invasive Eingriffe, die mit einem hohen Kostenaufwand und geringer Akzeptanz der Patienten einhergehen. Eine der wenigen nicht-invasiven Strategien zur Früherkennung von kolorektalem Krebs ist die Testung auf okkultes Blut (OB) in Fäzes. Mehrere Studien berichten, dass durch Untersuchungen auf OB in Stuhlproben die Morbiditäts- und Mortalitätsrate von Darmkrebs verringert werden konnte [Mandel et al., 1993; Kronborg et al., 1996; Towler et al., 1998; Mandel et al., 2000]. Dennoch ist die Analyse von OB in Stuhlproben im Hinblick auf eine mögliche Krebsvorsorge bzw. Krebsprävention nur bedingt geeignet, denn nicht-neoplastische Vorstufen von Tumoren des Darmepithels werden nicht miterfasst [Osborn und Ahlquist, 2005].

Ein neuer Ansatz der Früherkennung beruht auf einer Identifizierung tumorspezifischer Veränderungen der DNA in abgeschilferten Kolonozyten aus Humanfäzes [Traverso et al.,

2002; Song et al., 2004; Nagasaka et al., 2009]. Gesucht werden ausschließlich epigenetische Veränderungen/Biomarker, die spezifisch in (prä-)neoplastischen Zellen auftreten [Widschwendter und Jones, 2002; Glockner et al., 2009]. Aktuelle Studien zeigen, dass die Analyse der DNA-Methylierung abgeschiedelter Kolonozyten im Stuhl geeignet ist, um Veränderungen des Methylierungsmusters in einem sehr frühen Stadium der Kolonkanzerogenese zu detektieren [Belshaw et al., 2004; Leung et al., 2004; Muller et al., 2004; Petko et al., 2005]. Aufgrund der erhöhten Proliferation und verringerten Apoptoserate, sowie Zell-Zell-Adhäsion von (prä-)neoplastischem Gewebe ist dessen Anteil an abgeschiederten Epithelzellen in Fäzes, im Vergleich zu normalem Gewebe, erhöht [Bedi et al., 1995; Partik et al., 1998; Huang und Ingber, 1999]. Dies erlaubt eine spezifische und sensitive Analytik epigenetischer Biomarker [Osborn und Ahlquist, 2005]. Neben DNA der Kolonozyten wird bei dieser Methode ebenfalls DNA aus Bakterien und unverdauten Nahrungsbestandteilen mit isoliert. Durch die Spezifität der bei der MS-PCR eingesetzten Primer ist gewährleistet, dass ausschließlich Sequenzen humaner DNA des entsprechenden Gens amplifiziert werden. Die Herausforderung liegt vielmehr darin Biomarker zu identifizieren, die charakteristisch für verschiedene Krebsarten sind. Lenhard et al. [2005] zeigten, dass das „hypermethylated in cancer 1“ (HIC1) Gen zur Detektion von kolorektalem Krebs herangezogen werden kann. Hypermethyliertes HIC1 konnte in 42 % (kolorektaler Krebs) und 31 % (Adenome) der Stuhlproben von Patienten nachgewiesen werden. Daneben konnten für weitere Gene, darunter Vimentin, ein aberrantes Methylierungsmuster mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert werden [Chen et al., 2005].

Als ein Nachteil dieser Methode sei genannt, dass gewisse Veränderungen der DNA-Methylierung in Tumorzellen auch zu einem geringen Teil in nicht-veränderten Zellen zu finden sind. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit auf falsch-positive Ergebnisse der nicht-invasiven Früherkennungstechniken auf der Basis epigenetischer Veränderungen oder Mutationsanalysen [Muller et al., 2004; Chen et al., 2005; Petko et al., 2005]. Aufgrund dessen wird angestrebt aus einer Reihe an Genen mehrere Biomarker parallel zu untersuchen, um so die Ergebnisse besser einschätzen zu können.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte geklärt werden, ob der Methylierungsstatus des Tumorsuppressors p16^{INK4a} in DNA aus humanen Stuhlproben identifiziert werden kann. Als Probandenkollektiv wurden Typ-II Diabetes Patienten mit einem durchschnittlich erhöhten

Body-Mass-Index gewählt. Patienten, die übergewichtig sind oder bereits an dem multifaktoriellen Krankheitsbild „Metabolisches Syndrom“ leiden, werden häufig mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko in Verbindung gebracht [Giovannucci, 2007].

Innerhalb des BMBF geförderten Verbundprojekts: „Apfel und Darmgesundheit“ wurde am Max Rubner Institut (Karlsruhe) unter der Leitung von Dr. Bub und Dr. Seifert eine humane Interventionsstudie, die als Pilotstudie angelegt war, durchgeführt. An der Studie nahmen insgesamt 30 männliche Typ-II Diabetiker teil, wobei aufgrund der limitierten räumlichen Möglichkeiten im Max Rubner Institut nur 15 Probanden randomisiert ausgewählt werden konnten, die neben Vollblut auch Sammelurin und Fäzesproben abgaben. Das Durchschnittsalter dieser 15 Probanden lag bei 63 mit einem mittleren Body-Mass-Index von 30.

Es sollte zum einen geklärt werden, ob und inwieweit Patienten mit Typ-II Diabetes ein verändertes Methylierungsmuster von p16^{INK4a} in aus Fäzes isolierten Kolonozyten besitzen. Neben dem Grundstatus der Promotormethylierung von p16^{INK4a} war von Interesse ob der Konsum eines polyphenolreichen Apfelsafts über einen Zeitraum von vier Wochen das Methylierungsmuster des Tumorsuppressors beeinflusst, ähnlich wie es bei den *in vitro* Untersuchungen mit Apfelextrakten und CGA beobachtet wurde. Hierzu wurden die Probanden in zwei Gruppen eingeteilt (Abbildung 37).

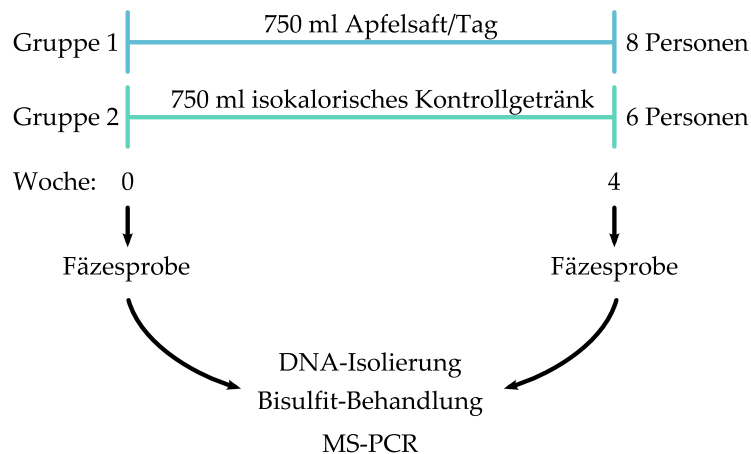


Abbildung 37: Studiendesign der Pilotstudie mit Typ-II Diabetes Patienten zur Modulation der DNA-Methylierung von p16^{INK4a} durch polyphenolreichen Apfelsaft.

Gruppe 1 musste über den Tag verteilt 750 ml naturtrüben Apfelsaft (AS, Zusammensetzung siehe Tabelle 4) trinken. Naturtrüber Apfelsaft besitzt im Vergleich zu klarem Saft einen erhöhten Polyphenolanteil. Gruppe 2 bekam ersatzweise ein polyphenolfreies, isokalisches

Kontrollgetränk. Die Intervention erstreckte sich über vier Wochen. Während der Studiendauer wurden die Probanden angehalten eine polyphenolarme Diät einzuhalten. Neben dem Genuss von Alkohol und Tabak war der Verzehr von Äpfeln in roher und verarbeiteter Form (Saft, Mus, etc.) nicht gestattet, sodass der naturtrübe Apfelsaft die Hauptpolyphenolquelle der Diät darstellte. Zu Beginn und am letzten Tag der Studie wurde jeweils eine Fäzesprobe abgegeben. Bis zur DNA-Isolierung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Bei allen Patienten, bis auf Patient 1 und 12, wurde ein Fragment für unmethylierte DNA erhalten (Abbildung 38). Zu Beginn der Saftintervention wurde bei 2 Probanden (11, 24) zusätzlich eine methyliertes DNA-Fragment aus der Promotorregion von p16^{INK4a} in DNA aus Fäzes nachgewiesen. Bei Proband 1 und 12 wurden keine Amplifikate erhalten, möglicherweise aufgrund eines zu geringen Gehalts an humaner DNA. Nach einer Wiederholung des Versuchs konnten ebenfalls keine Amplifikate bei Patient 1 und 12 detektiert werden. Bei der MS-PCR wurden zusätzlich Wasser- (ohne Primer und DNA-Template) und Primerkontrollen (ohne DNA-Template) mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse aufgrund einer Verunreinigung auszuschließen.

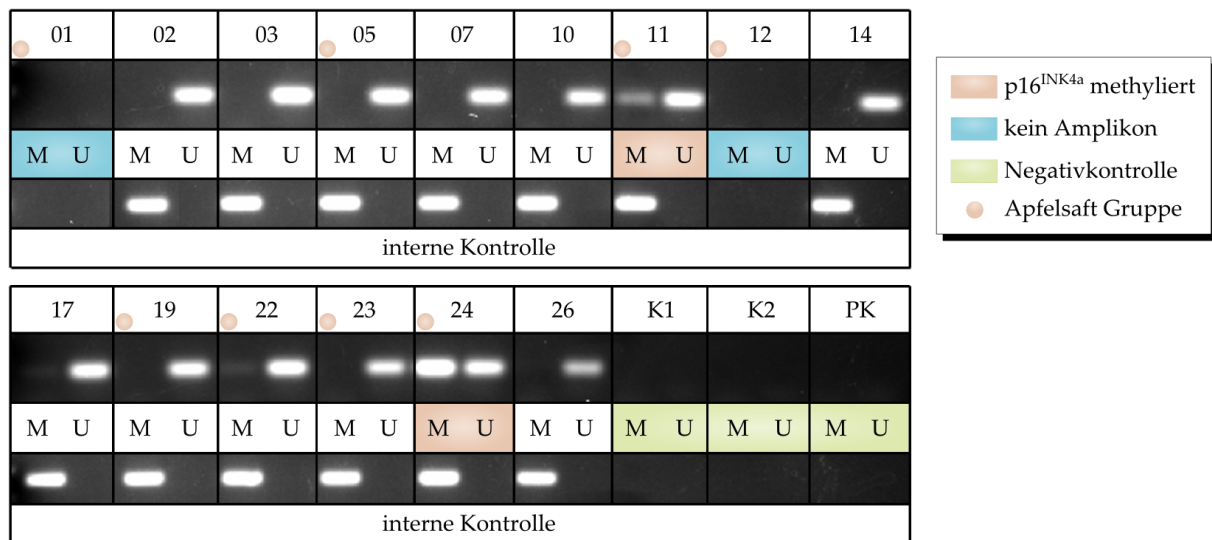


Abbildung 38: Methylierungsstatus von p16^{INK4a} Promotor-DNA aus abgeschilferten Kolonozyten aus Fäzesproben von Typ-II Diabetes Patienten vor der Intervention mit trübem Apfelsaft. Abgebildet ist ein repräsentatives Gel einer MS-PCR, durchgeführt als Doppelbestimmung; interne Kontrolle; M, Methyliert; U, Unmethyliert.

Um den Einfluss des AS auf den Methylierungsstatus des Tumorsuppressors p16^{INK4a} in Typ-II Diabetikern zu untersuchen, wurde nach vier Wochen Intervention erneut die DNA aus

Fäzes der Diabetiker isoliert und diese als Matrize in der MS-PCR eingesetzt (Abbildung 39). Bei den Probanden 1, 3, 22 und 23 wurden keine Amplifikate nach der MS-PCR detektiert. Auch bei diesen Stuhlproben war vermutlich der Gehalt an humaner DNA für eine erfolgreiche Amplifikation zu gering. Alle übrigen Patienten wiesen ein Fragment für unmethylierte p16^{INK4a} DNA, sowie für die interne Kontrolle auf. Die Probanden 11 und 24 zeigten vor Beginn der Intervention mit Apfelsaft eine methylierte p16^{INK4a} Promotorregion. Sie zählten beide zur Gruppe 1, die während der Pilotstudie Apfelsaft konsumierten. Sowohl für Proband 11, als auch Proband 24 wurde nach vierwöchiger Saftintervention ein Rückgang der Bande für methylierte DNA beobachtet. Darüber hinaus zeigte keiner der beiden Probanden eine Bande für methylierte DNA nach der Intervention.

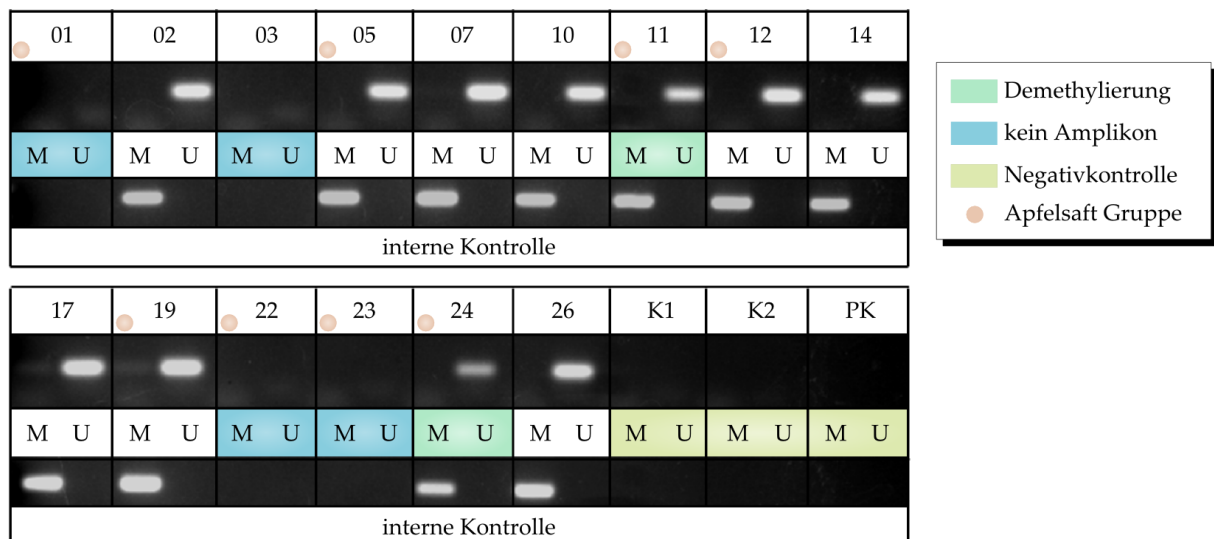


Abbildung 39: Methylierungsstatus von p16^{INK4a} Promotor-DNA aus abgeschilferten Kolonozyten aus Fäzesproben von Typ-II Diabetes Patienten nach der Intervention mit trübem Apfelsaft. Abgebildet ist ein repräsentatives Gel einer MS-PCR, durchgeführt als Doppelbestimmung; interne Kontrolle; M, Methyliert; U, Unmethyliert.

Sowohl vor, als auch nach der Intervention wurde bei jedem Patienten ein Fragment für unmethylierte DNA in der MS-PCR erhalten. Diese DNA stammt aus den abgeschilferten Kolonozyten, die sowohl aus gesunden und möglicherweise verändertem Epithel stammen. Im Vergleich zu den *in vitro* Untersuchungen an HT29-Kolonkarzinomzellen, die eine hypermethylierte Promotorregion von p16^{INK4a} aufweisen, zeigt sich deutlich, dass das untersuchte Probandenkollektiv kein hypermethyliertes p16^{INK4a} in den isolierten Kolonozyten besitzt. Lediglich bei zwei Patienten wurde eine Bande für methylierte DNA nachgewiesen. Im Ge-

gensatz zu den Karzinomzellen HT29 war bei diesen Probanden jedoch zusätzlich auch eine Bande für unmethylierte DNA zu erkennen, die sich in ihrer Intensität nicht von denen der anderen Probanden unterschied. Diese Ergebnisse weisen auf ein sehr frühes Ereignis der Promotormethylierung in Kolonozyten von Typ-II Diabetikern hin, bei dem die Expression von p16^{INK4a} möglicherweise noch nicht vollständig unterdrückt sein wird.

Bisher gibt es nur wenige Studien zur Promotormethylierung von p16^{INK4a} in Stuhlproben, obwohl der Tumorsuppressor mehrfach im Zusammenhang mit Kolonkrebs beschrieben wurde [Herman et al., 1995; Burri et al., 2001]. Belshaw et al. [2004] untersuchten die Promotormethylierung von p16^{INK4a} mittels kombinierter Bisulfit Restriktionsanalyse (COBRA) in Stuhlproben von Patienten mit kolorektalen Krebs und gesunden Probanden. Es zeigte sich bei beiden Gruppen eine niedrige Methylierungsrate des Tumorsuppressors. Im Vergleich zu gesunden Probanden war die Promotormethylierung der Krebspatienten etwa doppelt so hoch, bewegte sich jedoch mit einer Häufigkeit < 3 % in einem sehr niedrigen Bereich. Petko et al. [2005] untersuchten mittels MS-PCR Gewebeproben aus 42 Adenomen und 44 hyperplastischen Polypen, sowie Stuhlproben der entsprechenden Patienten. Hypermethyliertes p16^{INK4a} wurde in 34 % der Adenome und 5 % der hyperplastischen Polypen detektiert. Bei jeweils 50 % dieser als „positiv“ getesteten Probanden konnte hypermethyliertes p16^{INK4a} ebenfalls in DNA aus Fäzes nachgewiesen werden. Diese Daten würden die niedrige Methylierungsrate von p16^{INK4a} in Typ-II Diabetikern, ohne Diagnose eines kolorektalen Karzinoms, stützen bzw. erklären. Mit einer Häufigkeit von 13 % (2 Probanden von 15) im Rahmen dieser Pilotstudie scheint die Methylierung von p16^{INK4a} bei Typ-II Diabetikern eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Epidemiologische Studien mit einer deutlich höheren Probandenzahl sind erforderlich, um eine statistisch gesicherte Aussage zum Methylierungsstatus von p16^{INK4a} in Typ-II Diabetikern zu machen. Ein erhöhtes Risiko an Kolonkrebs zu erkranken, kann nicht allein auf einem erhöhten Methylierungsgrad von p16^{INK4a} basieren, sondern bedarf der Erfassung weiterer „Biomarker“.

Nach vier Wochen Apfelsaftintervention war ein Rückgang der Promotormethylierung von p16^{INK4a} bei beiden Probanden zu beobachten. Aufgrund der langen Intervention von vier Wochen und der Tatsache, dass der Methylierungsgrad des Promotors nicht stark ausge-

prägt war (keine Hypermethylierung), könnte der Rückgang der DNA-Methylierung auf den Konsum von polyphenolreichem Apfelsaft beruhen. Somit geben diese Ergebnisse erste Hinweise darauf, dass Inhaltsstoffe des Apfels die DNA-Methylierung des p16^{INK4a} Promotors *in vivo* modulieren könnten.

In der Literatur wurde bis dato keine vergleichbare *in vivo* Studie beschrieben, in der der Einfluss einer definierten Diät auf die DNA-Methylierung in Kolonozyten untersucht wurde. Um valide Aussagen über die demethylierende Wirkung des AS treffen zu können, müssten die Ergebnisse mit einem größeren Patientenkollektiv reproduziert werden. Auch wären Folgeuntersuchungen nach Abschluss der Intervention von Interesse, um zu überprüfen in wie weit das Methylierungsmuster nach dem Apfelsaftkonsum stabil bleibt. Darüber hinaus wäre es wie bereits oben erwähnt von Bedeutung weitere tumorrelevante Gene auf ihre Promotormethylierung in Kolonozyten zu untersuchen, um einen chemoprotektiven Effekt des Apfelsafts im Darm zu verifizieren.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Methylierungsgrad des Tumorsuppressors p16^{INK4a} im Rahmen der Pilotstudie mit männlichen Typ-II Diabetes Patienten erfolgreich in Fäzes-DNA bestimmt werden konnte. In 2 von 15 der Probanden (13 %) wurde eine partiell methylierte Promotorregion nachgewiesen. Nach der vierwöchigen Intervention mit Apfelsaft konnte ein Rückgang der Promotormethylierung von p16^{INK4a} bei beiden Probanden beobachtet werden. Die DNA-Isolierung aus Fäzes und die Bestimmung des Methylierungsstatus mittels MS-PCR stellen im Vergleich zu invasiven Früherkennungstechniken (z.B. Koloskopie) eine geeignete Methode dar, um spezifische und sensitive Parameter wie epigenetische Veränderungen des Darmepithels zu erfassen.

4.2 Antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaft- und Apfeltresterextrakten

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Dissertation war die Untersuchung von entpektinisierten Apfeltresterextrakten, sowie Extrakten aus klarem und trübem Apfelsaft im Hinblick auf eine potentielle antioxidative Wirkung *in vitro*.

Die Arbeiten wurden im Rahmen des FEI/AiF geförderten Projektes „Bioaktive Inhaltsstoffe mit gesundheitsförderndem Potenzial aus Nebenprodukten der Apfelsaftherstellung und der Apfelpektinengewinnung: *in vitro* Charakterisierung des Wirkprofils und Anreicherung wertgebender Komponenten“ in Zusammenarbeit mit der Universität Hohenheim (AG Prof. Carle) durchgeführt. Ziel des Projektes war es aus einem entpektinisierten Flavonoid-rohextrakt (Firma Herbstreith & Fox, Neuenbürg, Deutschland) zunächst durch den Einsatz verschiedener Extraktionsmittel bei unterschiedlichen pH Werten, in Kombination mit einer säulenchromatographischen Aufkonzentrierung, bioaktive Inhaltsstoffe anzureichern. Ein Überblick der gewonnenen Extrakte gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Kodierung und schematische Herstellung der Apfeltresterextrakte (AT) und Apfelsaftextrakte (AS) [Dissertation Roth, 2010].

AT Nr.	gelöst in	1. Aufreinigung	2. Aufreinigung (Extraktion)	3. Aufreinigung (Extraktion)
1	H ₂ O, pH 1,5	Ethylacetat	-	-
2	30% Aceton	XAD-16	Ethylacetat, pH 1,5	-
3	30% Aceton	XAD-16	Ethylacetat, pH 1,5	-
4	H ₂ O, pH 1,5	XAD-16	Ethylacetat, pH 7,0	-
5	H ₂ O, pH 1,5	XAD-16	Ethylacetat, pH 7,0	Ethylacetat, pH 1,5
6	H ₂ O, pH 1,5	XAD-16	Ethylacetat, pH 1,5	-
7	H ₂ O, pH 1,5	n-Butanol	-	-
AS klar/trüb	pH 1,5	XAD-16	Ethylacetat, pH 7	-
9	H ₂ O, pH 1,5	XAD-7	Ethylacetat, pH 7	-

In Vorarbeiten innerhalb des Projekts wurden die gewonnenen Extrakte in zellbasierten Assays auf ihre antioxidative und DNA-protektive Wirksamkeit überprüft [Dissertation Roth,

2010]. Hierbei hat sich eine Aufarbeitung mit Ethylacetat bei neutralem pH und Säulenfraktionierung mittels Adsorberharz XAD-16, als besonders geeignet erwiesen (AT 4, Kapitel 2.4.4.3). AT 4 führte zu einer Verringerung Menadion-induzierter intrazellulärer ROS nach 24 h Inkubation in der Kolonkarzinomzelllinie HT29. Darüber hinaus wurde ein Anstieg der Transkription für GCL-C und eine gesteigerte GSH-Biosynthese beobachtet. Ferner konnte eine Verringerung Menadion-induzierter DNA-Schäden durch eine Vorinkubation von HT29-Zellen für 24 h mit AT 4 erzielt werden [Dissertation Roth, 2010].

Unbeantwortet blieb jedoch die Frage, über welchen Mechanismus es zu einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität kommt und welche Signalwege in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind. Ferner stellte sich die Frage, welche Verbindungen des komplexen Extrakts für die bioaktive Wirkung mitverantwortlich sind, und ob diese Verbindungen auch unter *in vivo* Bedingungen, z.B. nach Durchlaufen der gastrointestinalen Passage, ein protektives Potential besitzen.

4.2.1 Biologische Aktivität von Apfelsaft- und Apfeltresterextrakten

Zur Herstellung der Extrakte AT 4, AS klar/trüb diente das unpolare Adsorberharz Amberlite® XAD-16 HP. Zusätzlich sollte auch ein polares Adsorberharz hinsichtlich seiner Eignung zur Aufreinigung bzw. Fraktionierung der phenolischen Verbindungen aus dem Flavonoidrohextrakt untersucht werden. AT 9 wurde mittels Amberlite® XAD-7, einem aliphatischen und nicht-ionischen Acrylatpolymer, aufgereinigt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte zunächst die biologische Wirkung des entpektinisierten Apfeltresterextrakts (AT 4) mit den zwei Apfelsaftextrakten aus klarem und trübem Apfelsaft, sowie einem weiteren Apfeltresterextrakt (AT 9) verglichen werden (Tabelle 5).

4.2.1.1 Modulation des zellulären Menadion-induzierten ROS-Levels

Um zu Überprüfen, ob und inwieweit die Testsubstanzen / Extrakte zu einer Modulation des intrazellulären ROS-Levels führen wurde der Dichlorofluorescein-Assay (DCF-Assay) herangezogen. Hierbei handelt es sich um eine fluorimetrisch kinetische Bestimmungsmethode, die Einblicke in eine Veränderung des relativen ROS-Levels der Zelle erlaubt. Das Prinzip beruht auf einem Fluoreszenzanstieg aufgrund einer Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs

Dichlorofluoresceindiacetat durch intrazelluläre ROS. Das Testsystem wird häufig als Screening-Methode eingesetzt und erlaubt eine Aussage über den Redoxstatus der Zelle.

Zur Bestimmung des antioxidativen Potentials der Testsubstanzen wurden HT29-Zellen in 96-well Platten kultiviert und mit den Testsubstanzen für 24 h in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) inkubiert. Nach Entfernen der Testsubstanzen erfolgte die Bestimmung intrazellulärer ROS in Anlehnung an die Methode von Wang und Joseph [1999]. Nach Inkubation der Zellen mit Dichlorofluoresceindiacetat (50 μ M) für 30 min wurde mit Menadion (20 μ M), zur Induktion von ROS, für 1 h nachbehandelt. Die graphische Darstellung erfolgte als relative Fluoreszenzintensität (FI) in Prozent, normiert auf Zellen, die nur mit Menadion behandelt wurden. Der ROS-Grundlevel wird durch die DMSO-Kontrolle veranschaulicht, bei der keine Behandlung mit Menadion erfolgte.

Die Ergebnisse zur Modulation des Menadion-induzierten ROS-Levels durch die Apfelsaftextrakte AS trüb/klar und die Tresterextrakte AT 4/9 sind in Abbildung 40 dargestellt. Alle Testsubstanzen wurden über einen Konzentrationsbereich von 0,1 - 250 μ g/ml inkubiert.

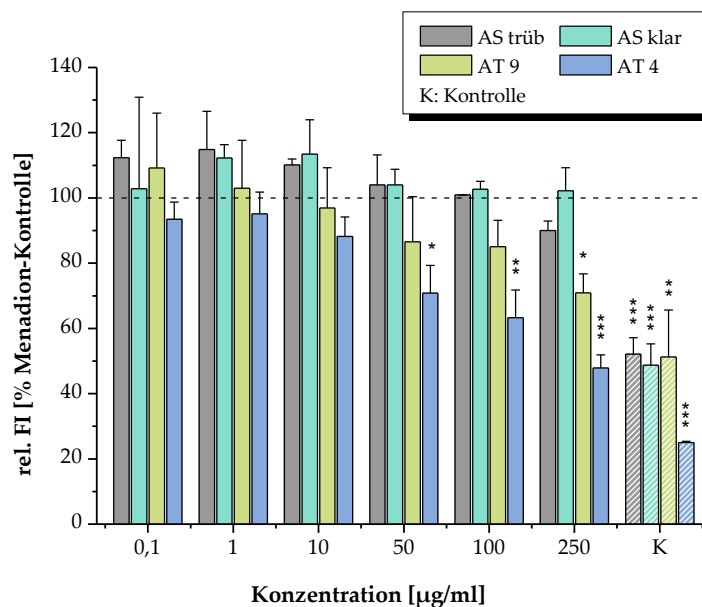


Abbildung 40: Untersuchung von AS trüb/klar, AT 9[#] und AT 4^{##} auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 μ M Menadion. MW $\pm$ SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. K, 1 % DMSO ohne Menadion; AS, Apfelsaftextrakt; AT, Apfeltresterextrakt; FI, Fluoreszenzintensität. [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010), ^{##}(Dissertation Roth, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Hierbei zeigte der AS trüb und AS klar bis 250 µg/ml keine signifikante Verringerung des intrazellulären ROS-Levels. In geringen Konzentrationen deutete sich eher ein leichter Fluoreszenzanstieg an, der sich jedoch nicht als signifikant erwies. Dieser Fluoreszenzanstieg könnte einen Hinweis auf eine prooxidative Eigenschaft beider Apfelsaftextrakte in diesem Konzentrationsbereich darstellen. AT 9 zeigte konzentrationsabhängig eine Verringerung des Menadion-induzierten ROS-Levels. Bis zu einer Extraktkonzentration von 250 µg/ml wurde ein signifikanter Rückgang der Fluoreszenzintensität (FI) auf $70,9 \pm 5,8 \%$ beobachtet [Diplomarbeit Lebherz, 2010].

In vorausgegangenen Untersuchungen des Projekts konnte für AT 4 eine signifikante Reduktion des intrazellulären ROS Levels in HT29-Zellen auf $47,9 \pm 5,8 \%$ FI der Menadion-Kontrolle gezeigt werden [Dissertation Roth, 2010]. Im direkten Vergleich der hier eingesetzten Testsubstanzen mit AT 4 zeigte sich eine deutlich geringere antioxidative Eigenschaft gegenüber Menadion induzierten ROS. Bei Betrachtung der Lösungsmittelkontrolle (K; DMSO ohne Menadion) ist ein merklicher Unterschied des ROS-Grundlevels von AT 4 und den übrigen Testsubstanzen zu erkennen. Dies wurde auf einen erhöhten ROS-Grundstatus der Zelle zurückgeführt. Aufgrund des starken Unterschieds der Kontrollen ist keine eindeutige Aussage möglich, ob AT 9 oder AT 4 ein potenteres antioxidatives Potential aufweist, da die Differenz der Kontrollen etwa so groß ist wie bei den Inkubationsansätzen mit Testsubstanz. Die biologische Wirkung hinsichtlich einer Modulation des intrazellulären ROS Levels wurde wie folgt zusammengefasst: AS klar < AS trüb < AT 4; AT 9.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen vermuten, dass sowohl AS trüb, als auch AS klar in Konzentrationen ≤ 10 µg/ml einen marginalen Anstieg des intrazellulären ROS aufzeigen, der sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte bis 250 µg/ml keine Verringerung des endogenen ROS-Levels durch AS klar/trüb beobachtet werden. Gemäß ihrer Bioaktivität im DCF-Assay unterscheiden sich beide Apfelsaftextrakte kaum voneinander. In der Literatur ist für Apfelextrakte *in vitro* eine ROS generierende Eigenschaft im Zellkulturmedium, abhängig vom Polyphenolgehalt der verwendeten Extrakte, bereits beschrieben [Bellion et al., 2009]. Obgleich sich der Hauptteil der gebildeten ROS extrazellulär befindet, kann eine Aufnahme durch bzw. in die Zelle nicht ausge-

geschlossen werden. Insbesondere für CGA (100 μM) wurde nach 24 h Inkubation eine potente ROS Akkumulation nachgewiesen [Bellion et al., 2009]. In den Experimenten dieser Dissertation wurde einer potentiellen extrazellulären ROS-Bildung durch den Zusatz von Katalase entgegengewirkt (siehe Kapitel 2.4.6).

In vergleichbaren Untersuchungen an HT29-Zellen zeigten Schäfer et al. [2006] für drei Apfelsaftextrakte, dass diese in der Lage waren im tert.-Butylhydroperoxid- (tBH) induzierten DCF-Assay den endogenen Redoxlevel zu verringern. Sie führten die Bioaktivität der Extrakte hauptsächlich auf die Leitverbindungen CGA, Phloretin und Quercetin zurück. CGA wurde in Untersuchungen von Schäfer et al. [2006] ebenfalls als Einzelsubstanz auf eine Änderung des Redoxstatus untersucht und ließ einen U-förmigen Kurvenverlauf mit einem Wirkmaximum bei 10 - 30 μM erkennen.

In ihrer Zusammensetzung weichen die Apfelsaftextrakte dieser Dissertation hauptsächlich in dem Gehalt an CGA (AS klar: $274,4 \pm 0,6$ mg/g; AS trüb: $158,9 \pm 0,7$ mg/g) voneinander ab. Quercetin und Phloretin, die in der Studie von Schäfer et al. [2006] als potent im Hinblick auf eine Reduktion intrazellulärer ROS identifiziert wurden, sind in AS klar/trüb nur in Spuren vorhanden sind. Trotz relativ hoher CGA Konzentrationen (77,5 μM CGA in 250 $\mu\text{g/ml}$ AS klar) waren AS trüb und AS klar nicht in der Lage den Menadion-induzierten ROS Level zu senken. Demnach scheint CGA bezüglich einer ROS verringernden Eigenschaft eine eher untergeordnete Rolle zuzukommen, oder es kommt durch weitere Extraktinhaltsstoffe zu antagonistischen Effekten, die eine ROS-abfangende Wirkung der CGA überlagern und folglich deren ROS-Verringerung nicht mehr beobachtet wird.

Als typische Apfelinhaltsstoffe wurden Procyanidine und Quercetinglykoside ebenfalls als potente Modulatoren des tBH-induzierten ROS-Levels im DCF-Assay identifiziert [Bellion et al., 2010]. Ferner zeigten sich Procyanidine im Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)-Assay als gute Radikalfänger von Peroxylradikalen [Zessner et al., 2008]. Um der Frage nachzugehen, warum die Apfelsaftextrakte dieser Dissertation, im Vergleich zu bereits publizierten Studien, nur eine marginale antioxidative Wirksamkeit aufweisen, könnte die Abwesenheit von Procyanidinen die fehlende Bioaktivität von AS klar und AS trüb erklären. Als weitere Ursache für die Diskrepanz zu genannten Studien könnten ebenfalls Unterschiede der ROS-Induktion der verwendeten Testsysteme sein. Bei Menadion handelt es sich im Gegensatz zu tBH um einen Redoxcyclus, der permanent ROS generiert. tBH hingegen rea-

giert während der Inkubation im Zellkulturmedium unter Bildung redoxaktiver Komponenten ab bis es verbraucht ist. Somit könnte das Verhältnis von ROS/Radikalfänger in den Assays stark unterschiedlich sein.

AT 9 zeigte analog dem AT 4 konzentrationsabhängig eine Verringerung Menadion-induzierter ROS. Im direkten Vergleich scheint AT 4 möglicherweise ein potenteres antioxidatives Potential zu besitzen, wobei beachtet werden muss, dass die Zellen im DCF-Assay durchgeführt von Roth im Rahmen seiner Dissertation ein deutlich geringeres ROS-Grundniveau aufwiesen [Dissertation Roth, 2010]. Das Fluoreszenzniveau der Lösungsmittelkontrolle bei AT 4 beträgt ca. 25 % und für AT 9 ca. 50 %. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Oxidation des Farbstoffs durch Lichteinwirkung während der Untersuchung des AT 9. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass es sich um ein biologisches Testsystem handelt, in dem auch der endogene Redoxstatus der eingesetzten Zellen von Schwankungen betroffen sein könnte.

Die potente Verringerung intrazellulärer ROS durch Apfeltresterextrakte wird durch Untersuchungen von Schäfer et al. [2006] gestützt, die eine signifikante Verringerung tBH-induzierter ROS um ca. 20 % nach 24 h Behandlung mit einem Tresterextrakt in HT29-Zellen beobachteten. Ergänzend dazu wurde in Caco-2 Zellen durch Behandlung mit einem Extrakt aus Schalen von Annurcaäpfeln eine Verringerung der Indometacin-induzierten oxidativen Schädigung der Mitochondrien beobachtet [Carrasco-Pozo et al., 2010].

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Reduktion intrazellulärer ROS direkt eine radikalabfangende Eigenschaft der Inhaltsstoffe selbst darstellt, oder der antioxidativen zellulären Abwehr eine entscheidende Bedeutung zukommt. Ergänzend dazu beobachteten Schäfer et al. [2006] nach Vorinkubation von HT29-Zellen mit einem Apeleextrakt für 2 h und Nachbehandlung mit tBH im DCF-Assay keine Modulation des intrazellulären ROS-Levels, wohingegen eine Behandlung der Zellen über 24 h eine potente Reduktion intrazellulärer ROS erkennen ließ. Demgegenüber zeigten Untersuchungen innerhalb des Arbeitskreises, dass AT 4 im DCF Assay nach Behandlung von HT29-Zellen für 3 h ohne nachfolgende Menadion-Behandlung zu einer Verringerung des endogenen ROS-Levels führt [Dissertation Roth, 2010]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Verringerung des endogenen ROS-Levels der Apfeltresterextrakte nach einer Kurzzeitinkubation scheinbar auf einer direkten radikalabfangenden Eigenschaft der Polyphenole beruht. Diese scheint jedoch nicht so aus-

geprägt, da in der Literatur nach einer Induktion von ROS und 2 h Vorinkubation mit Apfelsaftextrakten keine Verringerung des Redoxlevels erkennbar war [Schaefer et al., 2006]. Dies lässt möglicherweise auf eine Beteiligung der zellulären antioxidativen Abwehr nach einer längerer Behandlungszeit der Testsubstanzen schließen [Nguyen et al., 2003]. Weiterhin wäre denkbar, dass nach 24-stündiger Vorinkubation der Extrakte die Polyphenole größtenteils abgebaut oder metabolisiert wurden und die ROS-senkende Eigenschaft auf Abbauprodukte zurückgeführt werden könnte. In der Literatur konnte der Abbau phenolischer Verbindungen unter *in vitro* Bedingungen innerhalb weniger Stunden durch mehrere Untersuchungen bestätigt werden [Schaefer et al., 2006; Skrbek et al., 2009]. Eine Beteiligung potentieller Abbauprodukte hinsichtlich einer ROS-senkenden Eigenschaft wird in Kapitel 4.2.4.1 näher betrachtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Apfelsaftextrakte keine Modulation des Menadion-induzierten ROS-Levels zeigten. Im Gegensatz dazu wurden Apfeltrestereextrakte, in Übereinstimmung mit der Literatur, als potente Modulatoren Menadion-induzierter ROS-Level identifiziert. Hierbei zeigte AT 4 im DCF-Assay tendenziell ein höheres antioxidatives Potential im Gegensatz zu AT 9 auf, wobei dies in weiterführenden Experimenten verifiziert werden sollte. Die Trestereextrakte AT 9 und AT 4 unterscheiden sich in der Herstellung vom eingesetzten Adsorberpolymer während der Polyphenolextraktion aus entpektinisiertem Rohrtrester. Laut Analysenergebnissen weist AT 4 einen höheren Gesamtpolyphenolgehalt auf (AT 4: 542,0 mg/g; AT 9: 423,9 mg/g), der mitverantwortlich für eine potentere antioxidative Wirkung sein könnte.

4.2.1.2 Modulation der GCL-C Transkription

In vorausgegangenen Untersuchungen innerhalb des Arbeitskreises wurde die Reduktion Menadion-induzierter ROS durch AT 4 mit einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Zelle assoziiert. Ein wichtiges zelluläres Antioxidans stellt das Tripeptid Glutathion dar, bei dessen Biosynthese das Enzym γ -Glutamylcysteinyligase (GCL) den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert. AT 4 konnte hierbei als potenter Induktor der relativen mRNA Menge der katalytischen Untereinheit der GCL (GCL-C) identifiziert werden. Darüber hinaus bewirkte eine Inkubation von HT29-Zellen mit AT 4 eine Erhöhung des intrazellulären Glutathionlevels [Dissertation Roth, 2010]. Diesbezüglich hat sich in den *in vitro* Un-

tersuchungen die relative Transkriptmenge der GCL-C als zuverlässiger Biomarker zur Überprüfung auf eine antioxidative Antwort, im Sinne einer Erhöhung des GSH-Levels, bewährt. Im Folgenden wurde überprüft, inwiefern die Apfelsaftextrakte AS trüb/klar und der Trestereextrakt AT 9 den Transkriptlevel der GCL-C modulieren und ob sich die Extrakte in ihrer Wirkqualität unterscheiden. Der Einfluss oben genannter Testsubstanzen auf eine Modulation der GCL-C Transkripte wurde in HT29-Zellen mittels qPCR nach 24 h Inkubation unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) untersucht. Als Positivkontrolle diente tert.-Butylhydrochinon (tBHQ, 200 µM), ein Induktor der GCL-C [Lavoie et al., 2009].

Eine Inkubation von HT29-Zellen mit den Apfelsaftextrakten AS klar/trüb führte zu keiner substanziellen Veränderung des relativen mRNA-Levels der GCL-C (Abbildung 41). Es konnte bei der maximal getesteten Konzentration 250 µg/ml für AS trüb ein signifikanter Anstieg berechnet werden, der jedoch mit einem Faktor $1,5 \pm 0,2$ sehr gering ist und von untergeordneter biologischer Relevanz zu sein scheint.

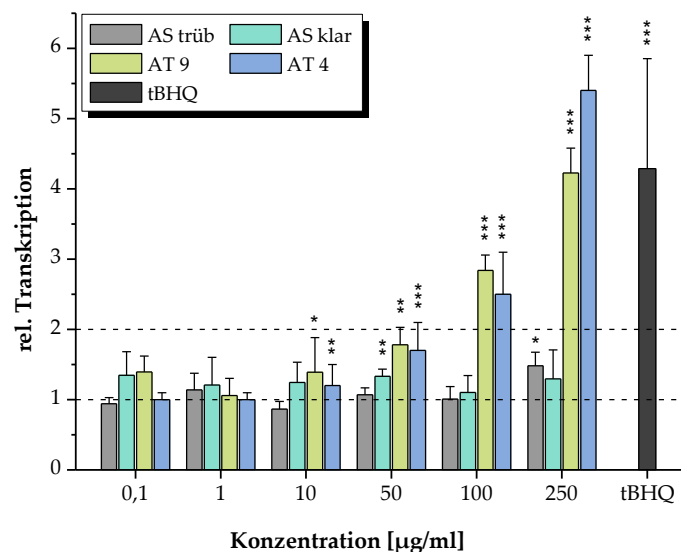


Abbildung 41: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C nach 24 h Inkubation mit AS trüb/klar, AT 9[#] und AT 4^{##} an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. tBHQ, tert.-Butylhydrochinon (200 µM); AS, Apfelsaftextrakt; AT, Apfeltrestereextrakt; [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010), ^{##}(Dissertation Roth, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf 1 % DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Für AT 9 wurde eine konzentrationsabhängige Induktion der GCL-C Transkripte beobachtet. Ab 50 µg/ml AT 9 zeigte sich eine signifikante Zunahme des mRNA-Levels, die bis

250 µg/ml auf einen Faktor von $4,2 \pm 0,4$ weiter anstieg. Im Vergleich dazu wurde unter den getesteten Extrakten für AT 4 die potenteste Induktion der GCL-C beobachtet. Ab 10 µg/ml AT 4 wurde eine signifikante Zunahme der GCL-C Transkripte verzeichnet, die bis 250 µg/ml auf einen Faktor $5,4 \pm 0,5$ weiter anstieg.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die untersuchten Apfelsaftextrakte keinen Einfluss auf die GCL-C auf mRNA-Ebene besitzen. Beide Apfeltresterextrakte unterschieden sich in ihrer Wirkpotenz nur marginal voneinander. In Konzentrationen > 100 µg/ml schien AT 4 gegenüber AT 9 die mRNA Synthese von GCL-C stärker zu beeinflussen, jedoch wurde kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet. Die Wirkstärke hinsichtlich einer Induktion der GCL-C Transkripte kann wie folgt zusammengefasst werden: AT 4, AT 9 $>$ As trüb $>$ AS klar.

Die getesteten Apfelsaftextrakte wiesen jeweils bei einer Konzentration eine signifikante Erhöhung der relativen Transkriptmenge für GCL-C auf. Jedoch ist zu beachten, dass für AS trüb/klar die Änderung des Transkriptlevels einen Faktor 2 nicht übersteigt und somit von marginalen Effekten bzw. experimentellen Schwankungen ausgegangen werden muss. Ergänzend dazu zeigten Untersuchungen von Soyalan im Rahmen seiner Dissertation für verschiedene Apfelsaftextrakte nach 6 h Inkubation in HT29-Zellen ebenfalls keine Induktion der GCL-C Transkripte [Dissertation Soyalan, 2010]. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Dissertation ergab eine Interventionsstudie von Barth et al. [2007] ebenfalls keine Veränderung der relativen Transkriptmenge von Genen der Glutathionhomöostase (GSTM2, GSTP und GCL-C) in Mucosazellen des distalen Kolons von Ratten nach Gabe von procyanidinreichem trübem Apfelsaft. In einer weiteren Tierstudie an männlichen Sprague-Dawley Ratten war nach 10-tägiger Intervention mit naturtrübem Apfelsaft auch keine Änderung der relativen mRNA Gehalte der GCL-C in distalem Kolongewebe nach der Intervention erkennbar. Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung der Transkripte Nrf2-regulierter Gene (GPX2, GSR und CAT), sowie von Nrf2 selbst innerhalb der Tierstudie beobachtet werden [Soyalan et al., 2011]. Ferner konnte Soyalan im Rahmen seiner Forschungsarbeiten nach Behandlung von HT29-Zellen für 24 h mit 100 µg/ml Apfelsaftextrakt eine Induktion der GCL-C auf etwa das 2,3-fache der Lösungsmittelkontrolle verzeichnen [Dissertation Soyalan, 2010]. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen von Soyalan ohne Zusatz von Katalase durchgeführt wurden. Eine Bildung von ROS während der Inkubation und eine da-

durch bedingte Induktion antioxidativer Enzyme, möglicherweise über redoxensitive Signalwege vermittelt, kann somit nicht ausgeschlossen werden. In der Kolonadenomzelllinie LT97 konnte nach Inkubation mit Apfelsaftextrakt (128 µg/ml) für 24 h eine signifikante Induktion verschiedener GST- und UGT-Isoenzyme (GSTP1, GSTT2, GSTA4, UGT1A1 und UGT2B7) detektiert werden [Veeriah et al., 2008]. Ob und inwieweit die Apfelsaftextrakte dieser Dissertation weitere Enzyme neben der GCL-C in ihrer Transkription modulieren wurde nicht untersucht und kann somit nicht beantwortet werden.

Obgleich in der Literatur für Apfelsaftextrakte eine Induktion der GCL-C *in vitro* beobachtet wurde konnte dies in Tierstudien nicht verifiziert werden. Um der Frage nachzugehen welche Inhaltsstoffe der Apfelsaftextrakte für die Induktion verantwortlich sind wurde deren Hauptinhaltsstoff CGA näher betrachtet. Untersuchungen an HT29-Zellen ließen weder nach 6 h, noch nach 24 h eine Änderung der GCL-C Transkriptmenge in Konzentrationen von 10 - 30 µM CGA erkennen. Kaffeesäure, ein Abbauprodukt der CGA bewirkte nach 6 h Inkubation in Konzentrationen von 10 µM und 30 µM eine Induktion der relativen mRNA Transkripte für GCL-C um einen Faktor 4 [Dissertation Soyalan, 2010]. Kaffeesäure ist in den Tresterextrakten dieser Dissertation nicht und in AS klar/trüb nur in Spuren vorhanden, so dass ein Beitrag zur antioxidativen Wirkung auszuschließen ist (Tabelle 4).

Unter den Tresterextrakten zeigte AT 4 gegenüber AT 9 in den Transkriptionsanalysen einen marginal höheren Anstieg der relativen GCL-C mRNA-Level, der sich jedoch nicht als signifikant darstellte. Ein Vergleich der Inhaltsstoffe beider Tresterextrakte ergibt, dass AT 4 einen höheren Gesamtpolyphenolgehalt aufweist (Tabelle 4). Die Verwendung der Adsorberharze Amberlite® XAD-7 (AT 9) und XAD-16 (AT 4) bei der Aufarbeitung des Rohextrakts macht folglich einen Unterschied hinsichtlich der Polyphenolzusammensetzung und dem Gehalt. Auffallend ist der hohe Anteil an Phloridzin in AT 4, der mit 453,3 mg/g Extrakt beinahe doppelt so hoch ist, im Vergleich zu AT 9 (240,2 mg/g Extrakt). Phloridzin zeigte jedoch bis zu einer maximal getesteten Konzentration von 100 µM nach 24 h keine Änderung der GCL-C Transkription in HT29-Zellen (Abbildung 44). Bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml beträgt die Quercetinkonzentration in AT 9 ca. 10 µM und in AT 4 ca. 15 µM. Untersuchungen von Quercetin zeigten in diesem Konzentrationsbereich keine Induktion der GCL-C nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen (Abbildung 44). Demnach scheint das verwendete Adsorberpolymer (AT 4: Amberlite® XAD-16 HP bzw. AT 9: Amberlite® XAD-7) keinen

signifikanten Unterschied hinsichtlich der Wirkpotenz beider untersuchten Extrakte zu bewirken. Darüber hinaus wird von einer Beteiligung weiterer Inhaltsstoffe ausgegangen, die vermutlich zur Transkriptionserhöhung der GCL-C beitragen. Die Charakterisierung der bioaktiven Wirkkomponenten wird ausführlich in Kapitel 4.2.3 diskutiert.

Eine Induktion des Phase-II Enzyms GCL-C wird unter Anderem über die Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs beobachtet [Liu et al., 1998a]. Da für Polyphenole ein ROS-generierendes Potential beschrieben ist, könnte der Anstieg der GCL-C Transkriptmenge durch AT 4 und 9 auch ROS-vermittelt sein [Na und Surh, 2008; Surh et al., 2008]. AT 4 wurde bezüglich einer Modulation des endogenen Redoxstatus nach 3 h Inkubation untersucht. Während dieser Zeit konnte keine Zunahme intrazellulärer ROS detektiert werden [Dissertation Roth, 2010]. Ob und inwieweit es nach längerer Inkubation zu einer Generierung redox-aktiver Komponenten kommt, kann nicht beantwortet werden. Dennoch lassen die Ergebnisse der 3 stündigen Kurzzeitinkubation vermuten, dass die Induktion der GCL-C nicht über eine ROS-abhängige Aktivierung des Nrf2-Signalwegs stattfindet. AT 9 wurde in diesem Kontext nicht auf prooxidative Eigenschaften untersucht. Demnach kann eine Aktivierung des Signalwegs durch ROS bei diesem Extrakt nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Modulation Menadion-induzierten ROS und der Transkriptionsanalyse von GCL-C zeigt deutlich, dass weder AS trüb noch AS klar nach Behandlung von HT29-Zellen für 24 h in der Lage waren intrazelluläre ROS direkt oder über eine Induktion der antioxidativen Abwehr abzufangen. Es könnte postuliert werden, dass keiner der in diesen Extrakten enthaltenen Inhaltsstoffe ein antioxidatives Potential besitzt oder es aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Extrakte zu antagonistischen Wirkungen kommt, die sich gegenseitig überlagern und/oder kompensieren.

Der untersuchte Tresterextrakt AT 9 zeigte, dass er sowohl eine Induktion der GCL-C Transkripte als auch eine Verringerung des endogenen ROS-Levels bewirken kann. Das Enzym GCL ist an der Biosynthese des zellulären Antioxidans Glutathion beteiligt und katalysiert den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von Glutaminsäure und Cystein. In vorausgegangenen Untersuchungen des Arbeitskreises konnte durch AT 4 gezeigt werden, dass eine Induktion der GCL-C mit einer Erhöhung des zellulären Gesamtglutathion-Levels einhergeht und so die antioxidative Kapazität der Zelle gegenüber ROS signifikant ansteigt [Dissertation Roth, 2010]. Glutathion ist in der Lage ROS unter Oxidation zu GSSG abzufan-

gen. Dies würde die protektive Wirkung beider Tresterextrakte gegenüber Menadion-induzierten ROS im DCF-Assay erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ungleich zu bereits publizierten Studien Apfelsaftextrakte, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, keine Induktion des Enzyms GCL-C nach 24 h Inkubation zeigten. Im Gegensatz dazu wurde ein Apfeltresterextrakt aus entpektinisiertem Apfeltrester, der mittels Ethylacetatextraktion und Säulenchromatographie an einer XAD-7 Säule gewonnen wurde, als potenter Induktor der GCL-C identifiziert. Im Vergleich zu dem bereits charakterisierten AT 4 zeigte AT 9 eine vergleichbare Bioaktivität. In den nachfolgenden Untersuchungen zur Aktivierung des Nrf2-Signalwegs, der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung und der *in vitro* Fermentation wurde AT 4 herangezogen, um dessen antioxidatives Potential weiter zu charakterisieren.

4.2.2 Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs und dessen nachgeschaltete Gentranskription durch AT 4

Der Tresterextrakt AT 4 konnte bereits als potenter Induktor des Schrittmacherenzym GCL-C, sowie des Tripeptids GSH identifiziert werden. Darüber hinaus wurde eine signifikante Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Menadion-induzierten DCF-Assay beobachtet. Wie eingangs erwähnt nimmt der Nrf2-ARE Signalweg eine zentrale Rolle in der antioxidativen Abwehr der Zelle ein. In Untersuchungen innerhalb des Projekts deutete sich durch Inkubation von HT29-Zellen eine Translokation von Nrf2 in den Zellkern an, was nachfolgend eine Aktivierung der Transkription Nrf2-abhängiger Gene ermöglichen könnte. Um diese Ergebnisse weiter abzusichern wurde AT 4 mittels Nrf2-Luciferase Reporter-Gen-Assay auf eine Aktivierung des Signalwegs hin untersucht. Darüber hinaus sollte mittels qPCR eine Auswahl an Nrf2-regulierten Genen des Phase-II Metabolismus auf eine Modulation der mRNA Transkripte untersucht werden. Ziel war es eine Aussage treffen zu können, ob die Induktion der GCL-C durch den Tresterextrakt AT 4 Nrf2-vermittelt ist und möglicherweise weitere Gene, die mit einer Regulation des endogenen Redoxstatus in Verbindung stehen, moduliert werden.

4.2.2.1 Nrf2-Luciferase Assay

Am Institut für Pharmakognosie der Universität Wien (AG Prof. Dirsch) wurde AT 4 mittels Luciferase Reportergen Assay auf eine Aktivierung von Nrf2 in ARE-Luc/EGFP transient transfizierten CHO Zellen untersucht. Nach 24 h Inkubation mit AT 4 zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der relativen Luciferase-Aktivität (Abbildung 42). Ab 30 µg/ml AT 4 wurde eine signifikante Erhöhung beobachtet, die im weiteren Verlauf bis 300 µg/ml um das 3-fache der DMSO-Kontrolle anstieg. Als Positivkontrolle diente 100 µM 2-Cyano-3,12 dioxooleana-1,9 dien-28-imidazolid (IM), ein synthetisches Triterpenoid und bekannter Nrf2-Aktivator.

Von Roth wurden im Rahmen seiner Dissertation Western Blot Untersuchungen zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern durchgeführt. Der Trestereextrakt AT 4 ließ hierbei in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 50 µg/ml eine erhöhte Nrf2-Translokation vermuten. Ab einer Konzentration ≥ 100 µg/ml war keine Änderung des Nrf2-Levels zu erkennen, die auf eine Translokation schließen ließ [Dissertation Roth, 2010]. Da die Ergebnisse sehr schwankten wurden sie als orientierende Messungen betrachtet. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Roth zeigten die Ergebnisse des Luciferase-Assays eine konzentrationsabhängige Aktivierung, die sich ab 30 µM AT 4 als signifikant erwies. Darüber hinaus bestätigten die Ergebnisse der Nrf2-Aktivierung die Transkripterhöhung der GCL-C im selben Konzentrationsbereich.

In der Literatur ist beschrieben, dass ROS als bedeutende Induktoren des Nrf2-ARE Signalwegs gelten. Eine ROS-generierende Eigenschaft bis zu 3 h nach Inkubation mit AT 4 konnte mittels DCF-Assay ausgeschlossen werden. Eine potentielle extrazelluläre Bildung von ROS im Zellkulturmedium wurde durch Zusatz von Katalase (100 U/ml) verhindert. Demnach scheinen sowohl die beobachtete Translokation der Western Blot Analysen, als auch der Anstieg der Nrf2-Luciferase Aktivität nicht auf einer ROS-Akkumulation begründet zu sein.

In der Literatur wurden bis dato keine Studien zur Beeinflussung des Nrf2-ARE Signalwegs durch einen komplexen Apfeltrestereextrakt gefunden. Mehrere Studien berichten über eine Induktion von Genen des Phase-I und Phase-II Metabolismus durch Apfelsaftextrakte [Veeriah et al., 2008; Petermann et al., 2009]. Ob und inwieweit es in diesen Studien zu einer Nrf2-abhängigen Geninduktion kam wurde nicht geklärt.

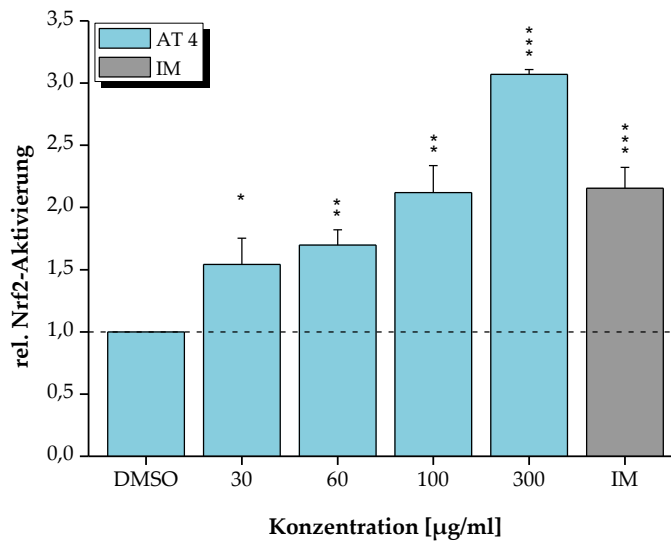


Abbildung 42: Luciferase Reportergen Assay zur Untersuchung der rel. Nrf2-Aktivierung an CHO transient transfizierten Zellen mit ARE-Luc/EGFP (Elke Heiss, persönliche Mitteilung). 24 h Inkubation mit AT 4 und IM (100 nM) als Positivkontrolle. Normalisiert wurde auf EGFP. IM, 2-Cyano-3,12 dioxooleana-1,9 dien-28-imidazolid. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Für einige bekannte Apfelinhaltsstoffe konnte bereits eine Aktivierung des Signalwegs nachgewiesen werden [Tanigawa et al., 2007; Rodríguez-Ramiro et al., 2011]. So zeigte Quercetin eine Induktion des Nrf2-regulierten Enzyms NQO1 nach Inkubation von HepG2 Zellen. In diesem Zusammenhang wurde herausgefunden, dass Quercetin nicht nur die Expression von Nrf2 erhöht, sondern das Protein auch dahingehend stabilisiert, dass es nicht mehr dem proteosomalen Abbau zugeführt wird [Tanigawa et al., 2007]. Eine Beteiligung von Quercetin an der Gesamtwirkung des komplexen Extrakts wird in Kapitel 4.2.3 näher betrachtet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Tresterextrakt AT 4 als potenter Aktivator von Nrf2 in CHO transient transfizierten Zellen identifiziert wurde. Eine Aktivierung des Signalwegs aufgrund prooxidativer Eigenschaften des Extrakts gilt als unwahrscheinlich.

4.2.2.2 Transkriptionsanalyse Nrf2-ARE-abhängiger Gene

Die Ergebnisse der Nrf2-Aktivierung durch AT 4 warfen die Frage auf, ob neben der Induktion der GCL-C auch weitere Nrf2-regulierte Gene in ihrer Transkription moduliert werden. So wurde im Folgenden mittels qPCR die Transkription einer Reihe von Genen des Phase-II Fremdstoffmetabolismus nach Behandlung von HT29-Zellen mit AT 4 erfasst. Im Fokus

standen dabei Enzyme der Glutathionhomöostase (GCL, GST, GSR und GPx), primär/ sekundär antioxidative Enzyme (Kat, SOD1, NQO1 und HO1) und der Transkriptionsfaktor Nrf2 als zentrales Element des Signalwegs.

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von Kat, Nrf2, SOD1, GCL-C/M und HO1 sind in Abbildung 43A dargestellt. Der Extrakt wurde in Anlehnung an die vorausgegangenen Untersuchungen in HT29-Zellen für 24 h inkubiert. Für Nrf2 und SOD1 ist bis 250 µg/ml AT 4 keine Veränderung des relativen Transkriptlevels zu beobachten, wohingegen für Kat eine leichte, nicht signifikante Verringerung ab Konzentrationen > 100 µg/ml AT 4 detektiert wurde. Ergänzend zu den Transkriptionsanalysen der katalytischen Untereinheit der GCL wurde zusätzlich die modulatorische Untereinheit mit erfasst (GCL-M).

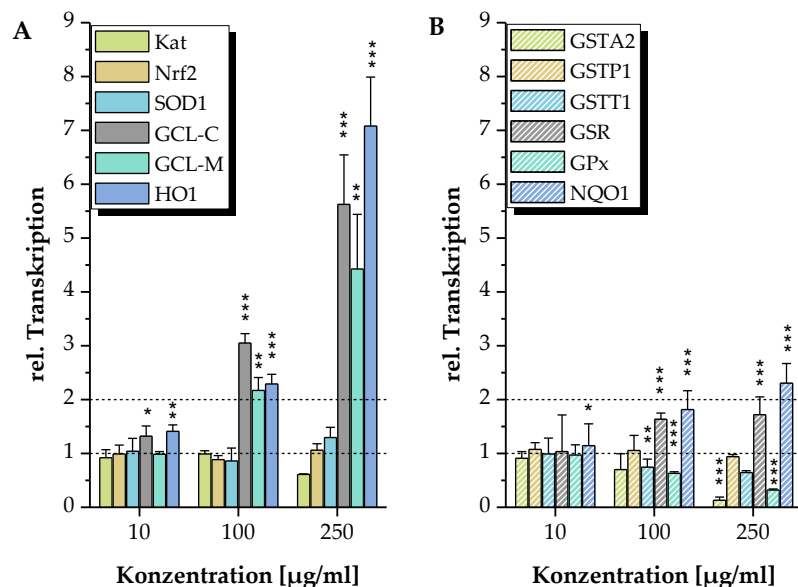


Abbildung 43: A/B: Untersuchung der rel. Transkription Nrf2-ARE-abhängiger Gene nach 24 h Inkubation mit AT 4 an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. AT, Apfeltresterextrakt; Kat, Katalase; SOD1, Superoxiddismutase 1; GCL-C/-M, γ -Glutamylcysteinyligase (katalytische#/modulatorische Untereinheit); HO1, Hämoxygenase 1; GST; Glutathion-S-transferase; GSR, Glutathionreduktase; GPx, Glutathionperoxidase; NQO1, NAD(P)H:Chinonoxidorreduktase 1; # (Dissertation Roth, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf 1 % DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Analog der GCL-C war für GCL-M ab 50 µg/ml ein signifikanter Anstieg um das $2,2 \pm 0,2$ -fache der Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Bei 250 µg/ml AT 4 lag die Induktion der GCL-M bei $4,4 \pm 1,0$ und damit etwas niedriger als die der GCL-C mit $5,6 \pm 1,0$. Die HO1

zeigte von allen getesteten Genen die höchste Induktion mit einem signifikanten Anstieg der mRNA Transkripte $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ AT 4. Bei $250 \mu\text{g/ml}$ AT 4 konnte eine signifikante Induktion der relativen Transkriptmenge für HO1 um das $7,1 \pm 0,9$ -fache der DMSO Kontrolle detektiert werden.

In Abbildung 43B sind die Transkriptionsänderungen für GSTA2, GSTP1, GSTT1, GSR, GPX und NQO1 aufgezeigt. Für GSTP1 und GSTT1 konnte bis $250 \mu\text{g/ml}$ AT 4 keine Veränderung des Transkriptlevels nach 24 h Inkubation beobachtet werden. Die mRNA-Gehalte für GSTA2 und GPx nahmen konzentrationsabhängig ab, bis zu einer signifikanten Senkung auf $0,1 \pm 0,1$ für GSTA2 und $0,3 \pm 0,0$ für GPx relativ zur DMSO-Kontrolle. Für GSR konnte ein signifikanter Anstieg der Transkriptmenge ab $50 \mu\text{g/ml}$ AT 4 gezeigt werden, jedoch wurde eine 2-fache Induktion bis $250 \mu\text{g/ml}$ nicht erreicht. NQO1 zeigte ebenfalls ab $50 \mu\text{g/ml}$ AT 4 einen signifikanten Anstieg der Transkription, der bis $250 \mu\text{g/ml}$ eine Erhöhung um das $2,3 \pm 0,3$ -fache der Kontrolle erreichte. Zusammenfassend lässt sich die Induktion Nrf2-abhängiger Gene durch AT 4 wie folgt einordnen:

HO1 > GCL-C > GCL-M > NQO1 > GSR > Nrf2, SOD1, GSTP1, GSTT1 > Kat > GPx, GSTA2

In der Literatur konnten keine Daten zur Modulation von Apfeltresterextrakten auf den Transkriptlevel von Genen des Phase-II Metabolismus gefunden werden. Veeriah et al. [2006] untersuchten mittels cDNA-Microarray einen polyphenolreichen Apfelsaftextrakt auf eine Veränderung des Expressionsmusters einer Reihe von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HT29-Zellen. Sie beobachteten eine signifikante Induktion der GSTT2 und GSTP1 bei einer Extraktkonzentration von $30 \mu\text{M}$ (angegeben als Phloridzin-Äquivalente). In weiteren Microarray-Untersuchungen wurde zusätzlich eine Induktion der GSTA4, UGT1A1 und UGT2B7 durch Apfelsaftextrakte beobachtet [Veeriah et al., 2008]. Eine Induktion der GSTT2 wird mit einer gesteigerten zellulären Abwehr in Verbindung gebracht. So konnte in einem Versuch an GSTT2-defizienten Zellen gezeigt werden, dass die DNA-Strangbruchrate nach Behandlung der Zellen mit Cumaroylhydroperoxid, im Vergleich zum nicht transfizierten Zelltyp, signifikant höher ist [Petermann et al., 2009]. In einer Studie an männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde in Lebergewebe eine signifikant höhere Transkription der GPx und NQO1 nach Konsum von Apfelsaft detektiert [Soyalan et al., 2011]. Diese *in vivo* Ergebnisse korrelieren mit den in dieser Dissertation erhaltenen *in vitro* Ergebnissen zur Induktion der

NQO1 durch AT 4. Allerdings wurde GPx im Vergleich zu den Untersuchungen von Soyalan et al. [2011] nach Behandlung mit AT 4 in HT29-Zellen deutlich herunter reguliert. Studien zufolge ist die Expression der GPx mitunter abhängig vom endogenen Redoxstatus und oxidativem Stress [Comhair et al., 1999; Comhair und Erzurum, 2005]. Dies würde bedeuten, eine vermehrte Anwesenheit redox-aktiver Komponenten führt zu einer verstärkten Transkription und Expression der GPx. Aufgrund der Annahme könnte postuliert werden, dass durch eine Verringerung des endogenen ROS Levels, teilweise begründet durch die vermehrte Bildung von GSH, es zu einer negativen Regulation der GPx kommt und so die Transkriptlevel sanken.

Die untersuchten GST-Isoenzyme (GSTA2, GSTP1 und GSTT1) konnten im Gegensatz zu vergleichbaren Studien mit Apfelsaftextrakten auf RNA-Ebene nicht induziert werden [Veeriah et al., 2006; Veeriah et al., 2008]. Ein Grund für die Diskrepanz könnten Unterschiede in der Extraktzusammensetzung von Saft- und Tresterextrakten sein.

Besonders hervorzuheben ist die potente Induktion der beiden Isoenzyme der GCL, sowie die HO1. Eine Induktion der HO1 wurde bereits durch eine Reihe von phenolischen Inhaltsstoffen, wie EGCG und Curcumin beschrieben [Balogun et al., 2003; Na und Surh, 2008]. Darüber hinaus wurde für Quercetin, ein bedeutender Apfelinhaltsstoff, in humanen Hepatozyten eine Induktion der HO1 über MAPK/Nrf2 cross-talk nachgewiesen [Yao et al., 2007].

AT 4 zeigte in Untersuchungen innerhalb des Projekts in HT29-Zellen eine signifikante Zunahme der katalytischen Untereinheit der GCL [Dissertation Roth, 2010]. Da das aktive Enzym ein Heterodimer aus der katalytischen und modulatorischen Untereinheit darstellt wurde im Rahmen der Transkriptionsuntersuchungen ebenfalls die GCL-M mit einbezogen. Beide Enzyme führten zu einem signifikanten Anstieg der relativen Transkriptmenge, wobei die GCL-C bei 100 µg/ml AT 4 ($p < 0,01$) eine signifikant höhere Induktion zeigte (Abbildung 43A). Da in vergleichbaren Inkubationsansätzen ein erhöhter Gesamtglutathionspiegel beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass ebenfalls eine erhöhte Expression beider GCL-Isoformen auf Proteinebene zum Tragen kommt. Ergänzend dazu konnten Scharf et al. [2003] in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Quercetin (10 - 50 µM) für 12 h und 24 h eine konzentrationsabhängige Zunahme der GCL-Aktivität nachweisen.

Abschließend betrachtet konnte AT 4 als potenter Induktor Nrf2-abhängiger Gene identifiziert werden. Für HO1, GCL-M und NQO1 ließ sich eine signifikante Erhöhung der relativen

mRNA Transkripte durch AT 4 in HT29 feststellen. Diese Modulation steht im Einklang mit den Ergebnissen des Reporter-gen Assays zur Aktivierung von Nrf2 in transient transfizierten CHO-Zellen durch AT 4 nach 24 h Inkubation und legt eine zytoprotektive Wirkung, im Sinne eines antioxidativen Schutzmechanismus, nahe.

4.2.3 Identifizierung bioaktiver Inhaltsstoffe des AT 4

Der Apfeltrestereextrakt AT 4 konnte als Aktivator des Nrf2-ARE Signalwegs identifiziert werden [Kapitel 4.2.2.1]. Darüber hinaus wurde nach Behandlung von HT29-Zellen mit AT 4 eine signifikante Induktion zytoprotektiver Gene beobachtet. Im Folgenden wurden die Inhaltsstoffe des AT 4 mit Hilfe einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung näher untersucht, um bioaktive Wirkkomponenten des Extrakts zu identifizieren. Die erhaltenen Subfraktionen und bereits bekannte Leitverbindungen des AT 4, die den Hauptpolyphenolanteil ausmachen, wurden mittels DCF-Screening auf eine Modulation des Menadion-induzierten ROS-Levels untersucht. Potente Subfraktionen und Leitverbindungen wurden ebenfalls hinsichtlich einer Änderung der Transkription von GCL-C und HO1 mittels qPCR untersucht, da diese Gene in vorausgegangenen Experimenten die höchste Induktion zeigten und somit als Biomarker einer antioxidativen Wirkung herangezogen wurden.

4.2.3.1 Antioxidative Wirksamkeit ausgewählter Leitverbindungen

Wie in Tabelle 4 dargestellt konnten Quercetin, Phloridzin und Phloretin als Leitverbindungen des AT 4 identifiziert werden. Um eine Aussage treffen zu können, ob sie einen substantiellen Beitrag zur Gesamtaktivität des komplexen Extrakts leisten wurden sie in die Untersuchungen mit einbezogen.

In Abbildung 44 sind die Ergebnisse des Menadion-induzierten DCF-Assays der drei Einzelverbindungen einander gegenübergestellt. Das Dihydrochalkon Phloridzin zeigte nach Behandlung von HT29-Zellen für 24 h keine deutliche Änderung der relativen Fluoreszenzintensität. In der höchsten getesteten Konzentration wurde lediglich eine Verringerung der relativen Fluoreszenz auf $86,5 \pm 6,2$ % erreicht, die sich jedoch als signifikant erwies. Phloretin verringerte nach einer 24 h Inkubation den Menadion-induzierten ROS-Level bis 250 μ M signifikant auf $85,3 \pm 6,0$ % und zeigte somit eine ähnliche Wirkstärke wie das entsprechende Glukosid. Demgegenüber war für Quercetin eine konzentrationsabhängige Abnahme der

relativen Fluoreszenzintensität ab 50 μM zu beobachten. Die relative Fluoreszenzintensität sank bei 250 μM Quercetin signifikant bis auf $68,8 \pm 7,3 \%$ ab. Gegenüber Phloridzin und Phloretin führte Quercetin bei 250 μM zu einer signifikant stärkeren Verringerung intrazellulärer ROS ($p < 0,05$). Die antioxidative Wirkung im DCF-Assay lässt sich für die Leitverbindungen wie folgt zusammenfassen: Quercetin > Phloridzin, Phloretin.

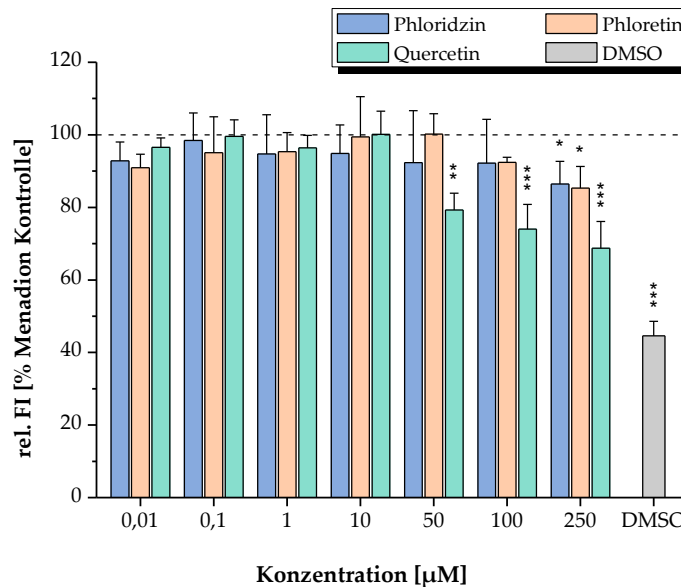


Abbildung 44: Untersuchung von Phloridzin, Phloretin und Quercetin[#] auf antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 μM Menadion. MW $\pm$ SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. DMSO, 1 % DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Ergänzend zu den Ergebnissen des protektiven DCF-Assays wurden die Leitverbindungen ebenfalls hinsichtlich einer Modulation der GCL-C und HO1 mittels qPCR untersucht. Phloridzin stellt mit beinahe 84 %, berechnet auf den Gesamtpolyphenolgehalt, den Hauptinhaltsstoff des AT 4 dar. Phloridzin ließ bis 250 μM nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen keine Modulation der relativen GCL-C Transkripte beobachten (Abbildung 45). Für Phloretin konnte bis 100 μM ebenfalls keine Veränderung der GCL-C Transkription beobachtet werden, jedoch wurde ab 250 μM ein signifikanter Anstieg der mRNA Menge auf $2,5 \pm 0,5$ -fache der Lösungsmittelkontrolle detektiert.

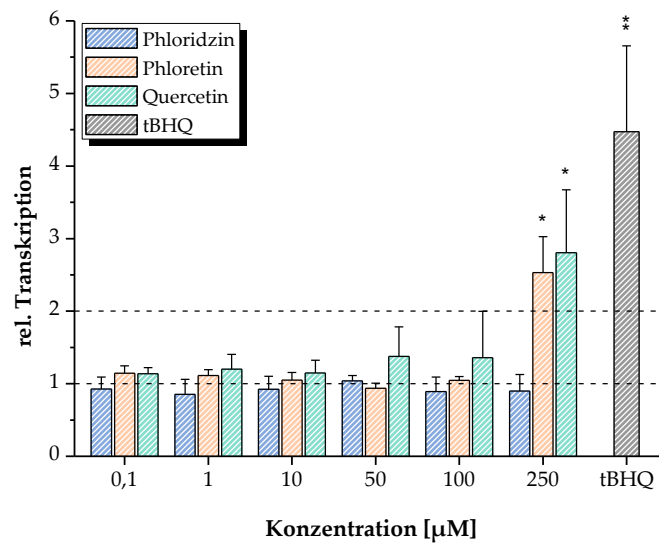


Abbildung 45: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinyligase, katalytische Untereinheit) nach 24 h Inkubation mit Phloridzin, Phloretin und Quercetin[#] an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. tBHQ, tert.-Butylhydrochinon (200 μ M); [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf 1 % DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Analog zu Phloretin wurde auch für Quercetin ab 250 μ M ein Transkriptionsanstieg der GCL-C um einen Faktor $2,8 \pm 0,9$ detektiert, der sich ebenfalls als signifikant erwies. Hierbei unterscheiden sich Phloretin und Quercetin nicht signifikant voneinander. Geringere Quercetinkonzentrationen $< 250 \mu$ M zeigten keine Beeinflussung des Transkriptlevels der GCL-C.

Eine Untersuchung von Phloridzin in HT29-Zellen zeigte bis 250 μ M nach Inkubation keine Modulation der relativen mRNA Transkripte für HO1 (Abbildung 46). Auch das Dihydrochalcon Phloretin ließ bis 100 μ M ebenfalls keine Veränderung der Transkription für die HO1 erkennen. Bei der maximal getesteten Konzentration von 250 μ M Phloretin war ein signifikanter Anstieg der mRNA Menge auf das $2,9 \pm 0,8$ -fache der Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Demgegenüber wurde für Quercetin bei 250 μ M ein Transkriptionsanstieg der HO1 um einen Faktor $3,6 \pm 1,9$ detektiert, der sich jedoch aufgrund hoher Schwankung nicht als signifikant erwies. Zwischen 0,1 und 100 μ M Quercetin zeigte sich keine Beeinflussung des HO1 Transkriptlevels. Analog zu den Ergebnissen der GCL-C Transkription konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Phloretin und Quercetin hinsichtlich einer Erhöhung der HO1-Transkripte beobachtet werden.

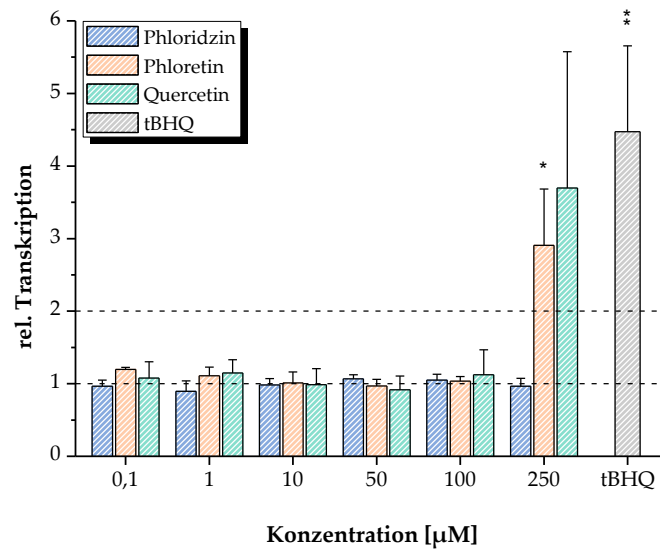


Abbildung 46: Untersuchung der rel. Transkription der HO1 (Hämoxygenase 1) nach 24 h Inkubation mit Phloridzin, Phloretin und Quercetin[#] an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. tBHQ, tert.-Butylhydrochinon (200 μ M); [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010). Student's t-test (bezogen auf 1% DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Phloridzin bis 250 μ M in HT29-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h zu keiner Veränderung der GCL-C und HO1 Transkription führte. Phloretin und Quercetin erwiesen sich in den Transkriptionsuntersuchungen als äquipotent. Beide Substanzen waren lediglich ab einer Konzentration von 250 μ M in der Lage sowohl GCL-C-, als auch HO1-Transkripte teilweise signifikant zu erhöhen.

Phloridzin zeigte in Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation keine modulatorische Wirkung auf den intrazellulären ROS Gehalt, sowie auf eine Induktion der Nrf2-abhängigen Enzyme GCL-C und HO1. In der Literatur konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine entsprechende Wirkung als Radikalfänger, oder Induktor des Nrf2-ARE Signalwegs gefunden werden. Untersuchungen Schäfer et al. [2006] bestätigten die fehlende Potenz des Dihydrochalkonglykosids in den hier untersuchten Testsystemen (1 - 100 μ M), jedoch ohne Zusatz von Katalase zum Inkubationsansatz. Dies würde bedeuten, obwohl Phloridzin ca. 45 % des Gesamtextrakts bzw. über 80 % der enthaltenen Polyphenole einnimmt, es im Rahmen der hier vorgestellten Assays scheinbar nicht zu den bioaktiven Substanzen mit antioxidativem Potential zählt.

Das Aglykon Phloretin ist zu ca. 1 % in AT 4 (1,9 % des Polyphenolanteils) enthalten und zählt neben Phloridzin zu den charakteristischen Apfelinhaltsstoffen (Shao et al., 2008). Von Bedeutung ist Phloretin vor allem, da es ein Abbauprodukt von Phloridzin darstellt und während der gastrointestinalen Passage durch Einwirkung bakterieller β -Glykosidasen entstehen kann. Die Phloretinkonzentration in 250 $\mu\text{g/ml}$ AT 4 beträgt ca. 9,4 μM (nur freies Phloretin) und liegt somit in einem Konzentrationsbereich, der sich in den Untersuchungen dieser Dissertation als unwirksam erwiesen hat. Im Unterschied zu den Experimenten dieser Dissertation konnte in der Literatur für Phloretin eine potentere Wirkung gegenüber einer intrazellulären ROS-Induktion im DCF-Assay gefunden werden. [Schaefer et al., 2006]. So zeigte Phloretin in einem tBH-induzierten DCF-Assay eine signifikante Verringerung intrazellulärer ROS nach 24 h Inkubation bereits ab 30 μM mit einem Fluoreszenzabfall um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle [Schaefer et al., 2006]. In ihrer Dissertation hat Schäfer Phloretin ebenfalls in Caco2-Zellen auf eine Modulation des tBH-induzierten ROS-Levels untersucht. In Konzentrationen von 0,003 - 0,03 μM zeigte Phloretin einen Anstieg der relativen Fluoreszenz im DCF-Assay, was mit einer prooxidativen Wirkung korreliert werden könnte. Dagegen ließ Phloretin zwischen 0,3 und 100 μM analog zu den hier untersuchten HT29-Zellen eine signifikante Verringerung intrazellulärer ROS beobachten [Dissertation Schäfer, 2006]. Sehr wahrscheinlich handelt es sich jedoch hierbei um zellspezifische oder experimentelle Unterschiede in der Verwendung des ROS-Induktors tBH an Stelle von Menadion (siehe Kapitel 4.2.1.1).

Soyalan hatte im Rahmen seiner Dissertation Phloretin gemäß einer Modulation der GCL-C Transkription untersucht [Dissertation Soyalan, 2010]. Sowohl nach 6 h, als auch nach 24 h Inkubation ließen 10 und 30 μM Phloretin keine Veränderung des relativen GCL-C mRNA Levels in den Zelllinien HT29 und Caco2 erkennen. Die Ergebnisse von Soyalan bestätigen die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Dissertation unter Zusatz von Katalase zum Inkubationsmedium durchgeführt wurden dahingehend, dass eine Induktion nur in Konzentrationen $\geq 250 \mu\text{M}$ auftritt.

Quercetin zeigte von den drei getesteten Leitverbindungen die potenteste Verringerung Menadion-induzierter ROS (Abbildung 44). In der Literatur ist eine Modulation des intrazellulären Redoxstatus durch Quercetin im tBH-induzierten DCF-Assay bereits beschrieben, jedoch zeigte sich im Unterschied zu den Studien dieser Arbeit bereits in niedrigeren Konzent-

rationen eine Verringerung des Redoxlevels. In Untersuchungen an HT29-Zellen wurde ein Wirkoptimum von Quercetin bei 30 μM beobachtet, mit einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität auf ca. 83% [Schaefer et al., 2006]. Darüber hinaus zeigte sich in tBH-gestressten Caco2-Zellen ein konzentrationsabhängiger Rückgang des intrazellulären ROS-Levels ab 3 μM Quercetin. Bei 100 μM sank die relative Fluoreszenzintensität auf knapp unter 50 % der Menadion-Kontrolle [Bellion et al., 2008]. Der Gehalt an Quercetin in AT 4 beträgt etwa 1,8%, was einer Molarität von ca. 14,7 μM entspricht. Neben freiem Quercetin ist eine Reihe von Quercetinglykosiden in AT 4 enthalten. In Summe beträgt die Menge an Quercetinäquivalenten bei 250 $\mu\text{g/ml}$ AT 4 ca. 31,6 μM . Unter Berücksichtigung der DCF-Assay Ergebnisse von Quercetin könnte diese Konzentration einen Beitrag zur ROS-senkenden Wirkung des AT 4 leisten, jedoch war keine Induktion der GCL-C/ HO1 < 100 μM Quercetin zu beobachten. Darüber hinaus ist verglichen mit dem komplexen Trestereextrakt AT 4 die Verringerung intrazellulärer ROS bei der maximal getesteten Konzentration von 250 μM Quercetin nicht so ausgeprägt wie es durch 250 $\mu\text{g/ml}$ AT 4 erreicht wurde.

In der Literatur wurde Quercetin mehrfach als Aktivator der Nrf2-ARE-vermittelten Gentranskription beschrieben [Tanigawa et al., 2007; Lavoie et al., 2009]. In HT29-Zellen wurde bereits eine schwache Induktion der GCL-C um das 1,5-fache durch 30 μM Quercetin nach 6 h beschrieben die aber nach einer 24 h Inkubation nicht verifiziert werden konnte. [Dissertation Soyalan, 2010]. In der Leberkarzinomzelllinie HepG2 konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme von GCL-Transkripten nach 12 h und 24 h Inkubation mit 10 - 50 μM Quercetin gezeigt werden. Darüber hinaus führte Quercetin in kultivierten Astrozyten zu einer Erhöhung der GCL-Transkripte und des zellulären GSH-Levels ab 20 μM [Lavoie et al., 2009]. Im Weiteren konnte durch Chow et al. [2005] eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion der HO1 Expression nachgewiesen werden. Hierbei führte 50 μM Quercetin zu einer signifikanten Induktion der HO1 Expression nach 12 h in RAW264.7 Zellen was die Transkriptionsergebnisse der vorliegenden Dissertation stützt. In der Literatur wurde die Induktion der HO1 auf eine Aktivierung extrazellulär regulierter Kinasen (Erk) der Mitogen aktivierten Protein Kinase Kaskade (MAPKK) zurückgeführt [Chow et al., 2005]. Eine Aktivierung der Nrf2-abhängigen Gentranskription durch Elemente der MAPKK ist bereits beschrieben [Zipper und Mulcahy, 2003]. Darüber hinaus scheint Quercetin durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen die Menge an Nrf2-Protein, bei gleichzeiti-

ger Verminderung von Keap1, zu erhöhen, was in einer verstärkten Translokation von Nrf2 in den Zellkern und Transkription ARE-regulierter Gene resultiert [Tanigawa et al., 2007]. Eine Beeinflussung der Erk-Phosphorylierung durch AT 4 wurde nicht untersucht und sollte in weiterführenden Studien mit einbezogen werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Hauptinhaltsstoff Phloridzin bis 250 μ M weder eine Modulation des intrazellulären ROS-Levels bewirkt, noch die Transkription der Enzyme GCL-C und HO1 in HT29-Zellen beeinflusst. Demzufolge scheint eine Beteiligung von Phloridzin an der Bioaktivität des komplexen Extrakts AT 4 auszuschließen. Phloretin zeigte eine marginale Verringerung den Menadion-induzierten ROS-Levels, die sich ab 250 μ M als signifikant erwies. Eine Beeinflussung von GCL-C und HO1 nach 24 h Inkubationszeit konnte lediglich in der höchsten untersuchten Konzentration von 250 μ M Phloretin beobachtet werden. Quercetin zeigte, im Einklang mit bereits publizierten Studien, eine signifikante Verringerung des intrazellulären ROS-Levels ab 50 μ M [Chow et al., 2005; Bellion et al., 2008]. Auch die Induktion Nrf2-abhängiger Gene konnte durch mehrere Studien bestätigt werden [Scharf et al., 2003; Lavoie et al., 2009]. Dennoch kann die Aktivität des komplexen Extrakts nicht mit der Wirkqualität von Quercetin alleine erklärt werden, da dessen Anteil in AT 4 zu gering ist.

Abschließend betrachtet konnten die untersuchten Leitverbindungen nicht als bioaktive Schlüsselverbindungen des komplexen Extrakts AT 4 identifiziert werden. Obgleich die Ergebnisse zeigen, dass Phloretin und Quercetin vor allem in hohen Konzentrationen (250 μ M) eine protektive Wirkung besitzen, scheinen sie lediglich einen geringen Beitrag zur Gesamtaktivität des AT 4 zu leisten. Dieser Beitrag könnte in Anwesenheit weiterer bioaktiver Verbindungen (über)additiv/synergistisch wirken, so dass sich die Gesamtaktivität des AT 4 möglicherweise aus einer Vielzahl an Einzelkomponenten zusammensetzt. Eine Untersuchung auf (über)additive, synergistische oder antagonistische Effekte wurde in Kapitel 4.2.3.3 anhand einer rekonstituierten Mischung des AT 4 vorgenommen.

4.2.3.2 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung des AT 4

Da sich in vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt hatte, dass die Leitsubstanzen Phloridzin, Phloretin und Quercetin nicht für die Hauptwirkung des AT 4 verantwortlich sind, wurde eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt. Ziel war es potentiell präventiv wirksame Inhaltsstoffe zu identifizieren, bzw. unwirksame Extraktkomponenten auszuschließen.

Die Subfraktionierung des AT 4 mittels Sephadex LH-20 Adsorberpolymer wurde am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim (AG Prof. Carle) durchgeführt. In Anlehnung an eine Methode von Lu und Fou [1997] wurden die Phenole des wässrig gelösten Extraktes mit Wasser-Methanol-Gemischen mit zunehmendem Methanolanteil (0 bis 100 %) eluiert. Im Verlauf dieser Trennung wurden insgesamt 66 Unterfraktionen (#) erhalten. Diese wurden mittels HPLC analysiert und entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 17 Sammelfraktionen (A - Q) vereinigt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der HPLC-Charakterisierung der Sammelfraktionen A - Q tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 6). In den ersten Fraktionen Q (#1 - 5), P (#6 - 9) und O (#10 - 14), die mit Methanolanteilen von 0 bis 20 % eluiert wurden, konnten mittels HPLC-DAD-MSⁿ keine bekannten phenolischen Verbindungen identifiziert werden, obwohl vergleichsweise komplexe Chromatogramme erhalten wurden. Dasselbe galt für die mit 30 - 50 % Methanol eluierten Fraktionen F (#15 - 20), G (#21 - 26) und H (#27 - 32). Bei einem deutlich höheren Methanolanteil von 80 % in den Fraktionen 50 bis 53 (Sammelfraktion E) wurde ebenfalls eine Vielzahl verschiedener Substanzen eluiert, von denen lediglich Quercetin-3-O-rhamnosid eindeutig identifiziert werden konnte [persönliche Mitteilung, Matthias Fromm].

Zunächst erfolgte die Identifizierung der Subfraktionen mit antioxidativem Potential gegenüber Menadion-induzierten ROS im DCF-Assay. Die Inkubation erfolgte analog zu den bisher untersuchten Extrakten und Einzelsubstanzen. Der DCF-Assay erlaubt einen hohen Probendurchsatz und ist aufgrund dessen als Screening-Methode gut geeignet. Fraktionen, die im DCF-Assay ein antioxidatives Potential erkennen ließen, wurden im weiteren Verlauf mittels qPCR auf eine Induktion der Enzyme GCL-C und HO1 untersucht. Alle Fraktionen wurden in Konzentrationen getestet, wie sie in 200 µg/ml bzw. 500 µg/ml des komplexen Extrakts AT 4 anteilig vorliegen. In Tabelle 6 ist der Anteil der Subfraktionen an AT 4 aufgeführt, um so deren Aktivität in den Zellassays besser mit AT 4 vergleichen zu können.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Charakterisierung der Sammelfractionen der Sephadex-Trennung mit Methanol-Wassergemischen unterschiedlicher Polarität [Matthias Fromm, persönliche Mitteilung].
n.i., nicht identifiziert; M, Molare Masse; -, keine Polyphenole detektiert.

Fraktion	% des AT 4	Substanz	[mg/g Subfraktion]
A	5,24	Phloretin-2'-xyloglucosid	485,1
		Phloridzin	6,3
		Phloretin	9,5
		Kaffeesäure	1,7
		<i>p</i> -Cumarsäure	11,6
		Ferulasäure	13,4
		n.i., M: 308 g/mol	14,1
B	20,79	Phloridzin	689,4
		3-Hydroxyphloridzin	21,7
		Phloretin	3,9
C	3,06	Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	146,3
		Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	98,6
		Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	13,0
		Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucosid	9,7
		Phloretin	4,7
		n.i., M: 470 g/mol	295,2
D	2,44	Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	41,7
		Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	15,4
		Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	138,4
		n.i., M: 470 g/mol	310,4
E	0,92	-	
F	0,76	-	
G	0,89	-	
H	1,14	-	
I	0,45	Phloretin	357,9
		Phloridzin	7,9
		n.i., M: 288 g/mol	14,4
		n.i., M: 308 g/mol	7,4

Ergebnisse und Diskussion

Fraktion	% des AT 4	Substanz	[mg/g Subfraktion]
J	0,16	Phloretin	431,8
		Phloridzin	29,5
		n.i., M: 308 g/mol	74,9
		n.i., M: 290 g/mol	32,1
K	0,18	n.i., M: 308 g/mol	273,2
		Phloretin	148,0
		Phloridzin	30,9
		n.i., M: 290 g/mol	19,4
		n.i., M: 470 g/mol	273,2
L	0,09	n.i., M: 308 g/mol	201,2
		n.i., M: 290 g/mol	9,2
		n.i., M: 470 g/mol	24,3
		n.i., M: 332 g/mol (Quercetinderivat)	116,1
		Quercetin-3-O-galactosid	12,5
		Quercetin-3-O-glucosid	12,5
		Phloridzin	14,4
		Phloretin	13,3
M	1,48	Quercetin	683,0
		n.i., M: 332 g/mol (Quercetinderivat)	18,8
		n.i., M: 308 g/mol	7,9
		Phloretin	5,5
N	3,16	Quercetin	95,0
		n.i., M: 336 g/mol (Quercetinderivat)	11,3
O	1,15	-	
P	3,61	-	
Q	6,41	-	

Einige Fraktionen stellen jedoch nur einen sehr geringen Anteil des AT 4 dar. Deshalb wurden die Subfraktionen zusätzlich in einer Konzentration von 100 µg/ml mitgeführt. Im Falle, dass sich die antioxidative Wirkung des AT 4 auf mehrere Subfraktionen verteilt, würde diese in einer höheren Konzentration eher erkannt werden. Ansonsten wäre nicht auszuschließen, dass die Effekte unterhalb der Nachweisgrenze liegen und nicht miterfasst werden.

Modulation Menadion-induzierter ROS durch Subfraktionen

Die Ergebnisse der Subfraktionen A - D im DCF-Assay sind in Abbildung 47 zusammengefasst. Fraktion A ist gekennzeichnet durch sehr hohe Gehalte an Phloretin-2'-xyloglukosid, während B hauptsächlich Phloridzin beinhaltet. C und D sind reich an verschiedenen Quercetinglykosiden. Die Fraktionen A - D zeigten nach 24 h Inkubation keine Modulation des intrazellulären ROS-Levels. Die relative Fluoreszenzintensität der DMSO-Kontrolle ohne Menadion-Behandlung liegt bei 37 %. Da keine messbare Änderung des relativen ROS-Levels detektiert werden konnte scheinen die Inhaltsstoffe dieser Subfraktionen keinen Beitrag zur Gesamtaktivität des AT 4 zu leisten.

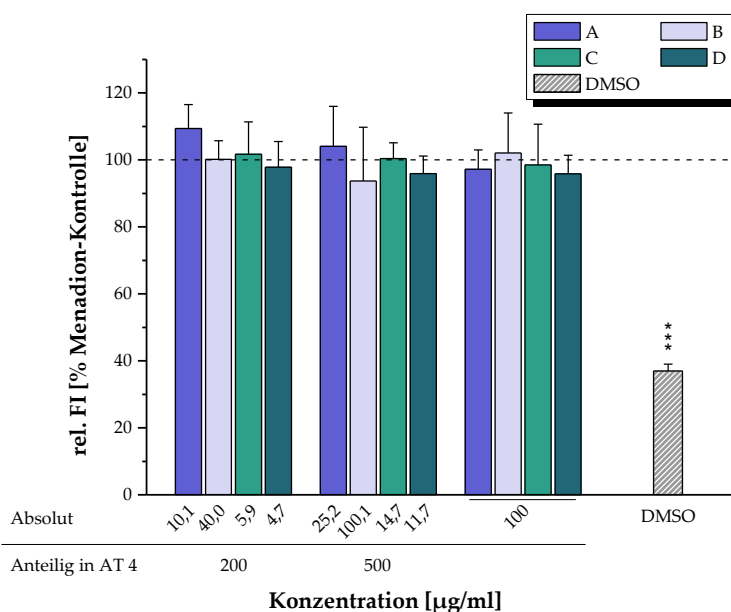


Abbildung 47: Untersuchung der Subfraktionen A, B, C und D auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 µM Menadion. MW ± SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. DMSO, 1% DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), *** = *p* < 0,005.

Die Subfraktionen E und F zeigten eine signifikante Verringerung des intrazellulären ROS-Levels auf $78 \pm 9\%$ (E) bzw. $61 \pm 9\%$ (F) (Abbildung 48). Fraktion F ließ auch in niedrigen Konzentrationen ($4,4\ \mu\text{g/ml}$, entsprechend $500\ \mu\text{g/ml}$ AT 4) eine marginale Verringerung des Redoxlevels vermuten, die sich jedoch nicht als signifikant erwies. Nach Inkubation mit G kam es zu keiner merklichen Veränderung des zellulären Redoxstatus. In der niedrigsten getesteten Konzentration (entsprechend $200\ \mu\text{g/ml}$ AT 4) deutete sich bei Fraktion G und H ein geringer Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität an.

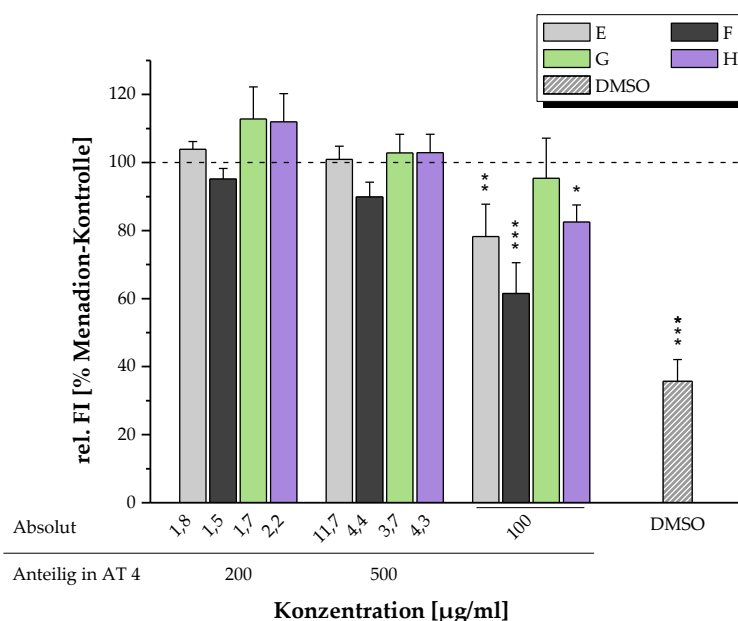


Abbildung 48: Untersuchung der Subfraktionen E, F, G und H[#] auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit $20\ \mu\text{M}$ Menadion. MW $\pm$ SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. DMSO, 1% DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Bei einer Absolutkonzentration von $100\ \mu\text{g/ml}$ war für H eine leichte, signifikante Verringerung Menadion-induzierter ROS zu erkennen. Da laut Analysendaten keine bekannten phenolischen Verbindungen in den Subfraktionen identifiziert werden konnten ist eine Zuordnung der Bioaktivität somit nicht möglich.

Zu den Hauptinhaltsstoffen der Subfraktionen I, J und K zählen Phloridzin, Phloretin und einige bisher nicht identifizierte Verbindungen, von denen lediglich die Molmassen bestimmt werden konnten. Alle vier Subfraktionen erwiesen sich in Konzentrationen, die de-

nen des komplexen Extrakts AT 4 entsprachen, hinsichtlich einer Veränderung Menadion-induzierter ROS, als unwirksam (Abbildung 49), jedoch zeigten sie in der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µg/ml absolut) eine Abnahme des zellulären ROS-Levels. Als besonders effektiv erwies sich Fraktion K mit der stärksten Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität auf 59 ± 2 %, gefolgt von Fraktion J mit einer Verringerung auf 70 ± 18 %. Fraktion L führte zu einer Verringerung des endogenen ROS-Levels auf 73 ± 15 % und Fraktion I auf 75 ± 15 % nach 24 h Inkubation.

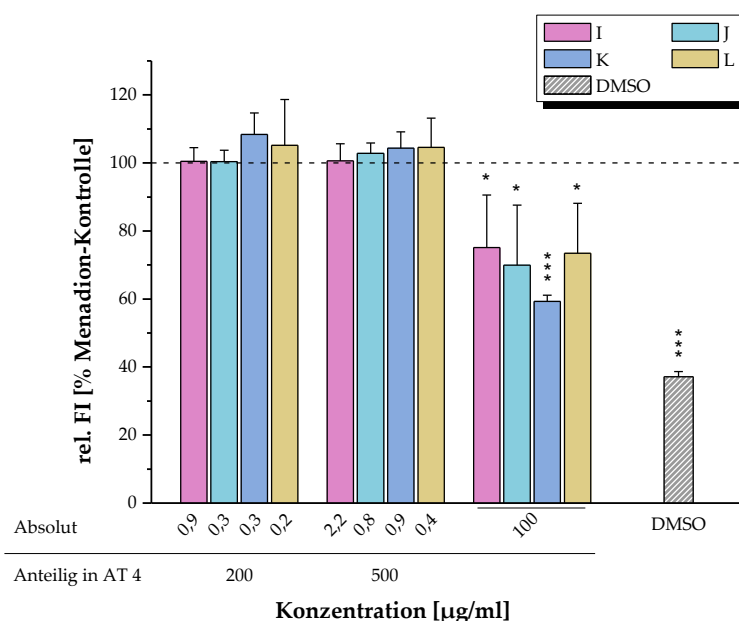


Abbildung 49: Untersuchung der Subfraktionen I, J, K und L[#] auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 µM Menadion. MW $\pm$ SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. DMSO, 1% DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$.

Die Standardabweichungen für I, J und L liegen zwischen 20 - 25% und somit relativ hoch. Zusätzliche Wiederholungen der Experimente waren jedoch aufgrund der geringen Substanzmengen nicht möglich.

Die Inhaltsstoffe von M, N, O, P und Q beinhalten laut Analysendaten keine Polyphenole, oder verwandte phenolische Verbindungen. Für alle vier Subfraktionen konnte in der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 µg/ml eine Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität gezeigt werden, die sich bis auf die von Fraktion P als signifikant erwies (Abbildung

50). Der Einfluss von P auf den Redoxstatus bei 100 µg/ml wurde als eher gering eingestuft, jedoch zeigte sich eine leichte Reduktion intrazellulärer ROS in Konzentrationen, die 200 µg/ml bzw. 500 µg/ml AT 4 entsprechen.

Fraktion O verringerte die relative Fluoreszenzintensität auf 80 ± 4 % relativ zur Menadion-Kontrolle. In der niedrigsten Konzentration stieg für O die relative Fluoreszenzintensität bis auf 112 ± 12 % an, was auf ein prooxidative Potential hindeutet. Die Fraktionen M und N verringerten die relative Fluoreszenzintensität in der höchsten eingesetzten Konzentration bis auf 66 ± 4 % für M und 70 ± 9 % für N. In Konzentrationen, die denen des AT 4 entsprechen, konnte keine Beeinflussung des Redoxstatus durch M und N beobachtet werden.

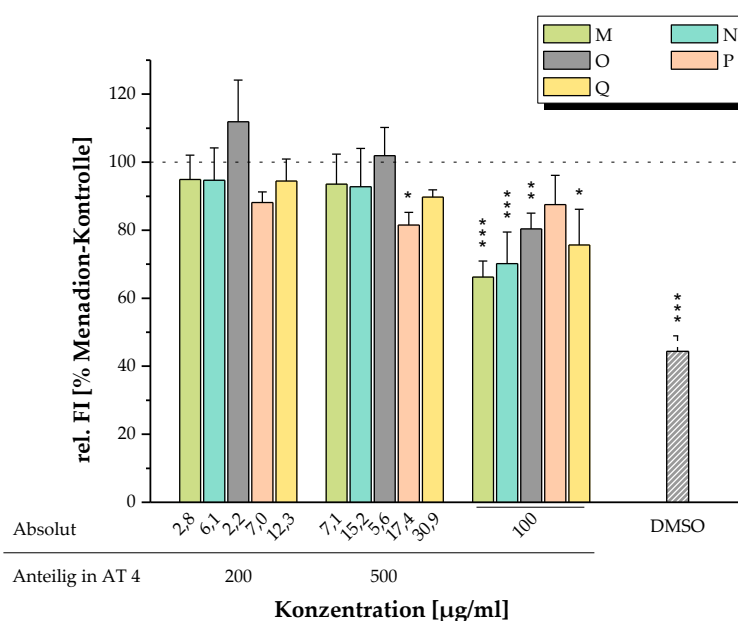


Abbildung 50: Untersuchung der Subfraktionen M, N, O, P und Q[#] auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 µM Menadion. MW $\pm$ SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. DMSO, 1% DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$.

Der Hauptbestandteil von Subfraktion A stellt Phloretin-2'-xyloglukosid mit einem Gehalt von ca. 48,5 % dar (Tabelle 6). Daneben sind geringe Mengen < 2 % an Phloretin, Phloridzin, Ferulasäure und Kaffeesäure enthalten. Im DCF-Assay zeigte A über den getesteten Konzentrationsbereich keine Modulation des ROS-Levels. Da Phloretin-2'-xyloglukosid nicht erhältlich war konnte die Verbindung nicht im DCF-Assay mitgeführt werden. Auch in der Literatur konnten keine Studien zum antioxidativen Potential der Verbindung gefunden

werden. Aufgrund der Unwirksamkeit der Subfraktion im DCF-Assay wird davon ausgegangen, dass Phloretin-2'-xyloglukosid keinen Beitrag zur ROS-senkenden Wirkung des Gesamtexttrakts leistet.

Fraktion B besteht fast ausschließlich aus Phloridzin (68,9 %). Als Nebenbestandteile sind 3-Hydroxyphloridzin (2,2 %) und Phloretin (0,4 %) enthalten (Tabelle 6). Fraktion B zeigte ebenfalls keine Modulation des intrazellulären ROS-Levels in HT29-Zellen. Phloridzin erwies sich in vorausgegangenen Untersuchungen ebenfalls als unwirksam hinsichtlich einer ROS-modulatorischen Eigenschaft. Phloretin zeigte lediglich in hohen Konzentrationen (250 μM) eine marginale Verringerung des intrazellulären ROS-Levels (Abbildung 44). Diese Konzentrationen an Phloretin werden selbst bei 100 $\mu\text{g/ml}$ der Fraktion B nicht erreicht. Beide Dihydrochalkone wurden bereits in Kapitel 4.2.3.1 ausführlich diskutiert. Somit legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass B ebenfalls keinen substanziellen Beitrag zur Wirkung des AT 4 leistet.

In den Subfraktionen C und D konnten eine Reihe von Quercetinglykosiden (Galaktosid, Glukosid und Rhamnosid) identifiziert werden. Darüber hinaus ist in beiden Fraktionen eine Verbindung mit der molaren Masse 470 g/mol vertreten. Diese stellt sowohl bei C (29,5 %) als auch bei D (31,0 %) den Hauptinhaltsstoff dar. Ob es sich beides Mal um dieselbe Verbindung handelt konnte nicht beantwortet werden. Über den getesteten Konzentrationsbereich konnte jedoch weder durch C, noch durch D eine Veränderung des Redoxlevels detektiert werden. Quercetin wurde als Leitverbindung ebenfalls in den Untersuchungen mitgeführt und zeigte ab 50 μM eine signifikante Reduktion des intrazellulären ROS-Levels (Abbildung 44). Das Ausbleiben einer biologischen Wirkung der Quercetinglykoside könnte mit einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit im Vergleich zum Aglykon Quercetin begründet sein. So wird Quercetin-3-glukosid in Caco2-Zellen signifikant geringer resorbiert, als freies Quercetin [Boyer et al., 2004]. Folglich tragen weder die Substanz mit 470 g/mol, noch die identifizierten Quercetinglykoside zur Wirkung des Gesamtexttrakts bei.

Die Inhaltsstoffe der Fraktionen E, F, G und H konnten mittels HPLC/MSⁿ-Analyse nicht identifiziert werden. Laut Chromatogramm sind keine polyphenolischen Verbindungen enthalten. Für Inkubationen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ der Fraktionen E und H konnte im DCF-Assay eine signifikante Verringerung der relativen Fluoreszenzintensität auf ca. 80 % der Menadion-Kontrolle beobachtet werden. F zeigte in derselben Konzentration eine signifikante Verringe-

rung der relativen Fluoreszenz auf ca. 61 ± 9 %. Ebenfalls deutete sich in geringen Konzentrationen entsprechend 500 $\mu\text{g/ml}$ AT 4 eine leichte Modulation des intrazellulären ROS-Levels durch F an. Alle drei Subfraktionen nehmen mit jeweils ≤ 1 % einen sehr geringen Anteil des AT 4 ein. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch E, H und F nur eine marginale Beteiligung an der Gesamtaktivität des AT 4 denkbar wäre. Fraktion G zeigte im getesteten Konzentrationsbereich keine Veränderung des Menadion-induzierten ROS-Levels. Daher wurde ein Beitrag der Fraktion G zur Bioaktivität des komplexen Extrakts ausgeschlossen.

Die Subfraktionen I, J, K und L verringerten signifikant den intrazellulären ROS-Level nach 24 h Inkubation. Allen voran senkte K das relative Fluoreszenzniveau auf ca. 60 % der Menadion-Kontrolle. Phloretin zählt in den Subfraktionen I (36 %), J (43 %) und K (15 %) zu den Hauptkomponenten (Tabelle 6). In der höchsten untersuchten Konzentration der Subfraktionen (100 $\mu\text{g/ml}$) beträgt die Molarität von Phloretin 130 μM (I), 160 μM (J) und 55 μM (K). Phloretin wurde bis 250 μM auf eine Modulation des intrazellulären ROS-Levels untersucht. Bis 100 μM Phloretin zeigte sich nur eine marginale antioxidative Wirkung im DCF-Assay (Abbildung 44). Folglich kann Phloretin nicht alleine für die potente antioxidative Wirkung der Subfraktionen I, J und K verantwortlich sein. L enthält darüber hinaus geringe Mengen an Quercetinglykosiden, deren Beitrag zur antioxidativen Wirkung des AT 4 bereits ausgeschlossen werden konnte (siehe oben). Zusätzlich enthalten die Subfraktionen bisher nicht identifizierte Substanzen, von denen lediglich die Molmassen bekannt sind (Tabelle 7).

Tabelle 7: Nicht identifizierte Verbindungen mit bekannten Molmassen, analysiert mittels ESI-MS [persönliche Mitteilung, Matthias Fromm].

Verbindung [g/mol]	Subfraktion
308	I, J, K, L
288	I
290	J, K, L
470	K, L, C, D
332	L

Die unbekannte Verbindung mit der Molmasse 470 g/mol ist eine Hauptkomponente von Fraktion K. Sollte es sich hierbei um dieselbe Verbindung handeln, die ebenfalls in den inaktiven Fraktionen C und D zu finden ist, kann deren Beitrag zur antioxidativen Wirkung des AT 4 ausgeschlossen werden.

Auffällig ist, dass die antioxidative Wirkung von I, J, K und L mit dem Anteil der unbekannten Substanz mit der Molmasse 308 g/mol korreliert (Tabelle 6). In den Fraktionen I, J und K nimmt deren Anteil zu, während parallel dazu eine Verringerung der relativen Fluoreszenzintensität beobachtet wurde. In Fraktion L ist der Anteil der Substanz wieder geringer, woraufhin die Verringerung der relativen Fluoreszenzintensität leicht zurückging. Dennoch muss beachtet werden, dass diese vier Subfraktionen zusammen weniger als 1 % des Gesamtextrakts ausmachen. Somit zählt diese Verbindung mit 308 g/mol zu den Minorkomponenten des komplexen Extrakts, sodass die antioxidative Wirkung möglicherweise nicht alleine auf diese Substanz zurückzuführen ist. Über die übrigen unbekannten Verbindungen kann aufgrund mangelnder Ausschlusskriterien nur schlecht eine Aussage getroffen werden. Die Hauptkomponente der Fraktion M ist Quercetin mit einem Anteil von 68 % (Tabelle 6). Bei einer Inkubation von 100 µg/ml M wurde eine Verringerung der relativen Fluoreszenz auf etwa 66 % beobachtet. In diesem Inkubationsansatz sind etwa 225 µM Quercetin enthalten. Untersuchungen mit Quercetin haben bei 250 µM eine Verringerung des Fluoreszenzlevels auf 69 % beobachtet (Abbildung 44). Neben Quercetin konnten in der Fraktion M lediglich Spuren von Phloretin und einem weiteren Quercetinderivat < 2 % identifiziert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise Quercetin allein für die antioxidative Wirkung der Subfraktion M verantwortlich zu sein scheint. In Fraktion N beträgt der Quercetinanteil lediglich 10 %. Das entspricht einem Quercetiningehalt von ca. 30 µM bei 100 µg/ml der Fraktion N. Bei einer Konzentration von 50 µM zeigte Quercetin bereits eine Verringerung der relativen Fluoreszenzintensität auf ca. 80 % (Abbildung 44). Bei einer Konzentration von 10 µM konnte keine Modulation des intrazellulären ROS-Levels detektiert werden. Die relative Fluoreszenzintensität von 100 µg/ml N im DCF-Assay liegt bei ca. 70 %. Dies würde bedeuten, dass neben Quercetin noch weitere bioaktive Komponenten in N enthalten sein müssten. Sowohl N, als auch M enthalten eine Verbindung mit der Molmasse 336 g/mol, die ebenfalls zur potenten Wirkung der Subfraktionen beitragen könnte.

In den Fraktionen O, P und Q konnten mittels HPLC-MSⁿ Analyse keine bekannten Polyphenole gefunden werden. Die Fraktionen P und Q stellen vergleichsweise einen hohen Anteil des AT 4 dar (Tabelle 6). Die Untersuchungen der Subfraktionen im Hinblick auf eine Modulation des intrazellulären Redoxlevels deuteten eine antioxidative Wirkung in Konzentrationen an, die 200 µg/ml bzw. 500 µg/ml AT 4 entsprechen. Trotz fehlender Kenntnis der Inhaltsstoffe wäre eine Beteiligung der Subfraktionen zur antioxidativen Wirkung des AT 4 möglich.

Die Untersuchungen zur Modulation des Menadion-induzierten ROS-Levels im DCF-Assay haben gezeigt, dass bis auf P alle Subfraktionen in niedrigen Konzentrationen die 200 µg/ml bzw. 500 µg/ml AT 4 entsprechen den intrazellulären ROS-Level nicht modulieren. Bei einer Konzentration der Subfraktionen von 100 µg/ml zeigten viele eine signifikante Reduktion intrazellulärer ROS. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse des Menadion-induzierten DCF-Assays zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse des Menadion-induzierten DCF-Assays durch AT 4-Subfraktionen [100 µg/ml].

Relative Fluoreszenzintensität [%]	Subfraktion
< 60	F, K
60 - 70	J, M
70 - 80	E, I, L, N, Q
80 - 90	H, O, P
> 90	A, B, C, D, G

Abschließend betrachtet lässt sich sagen, dass nach aktivitätsgeleiteter Fraktionierung des AT 4 mittels Sephadex LH-20 Adsorberpolymer potente Subfraktionen hinsichtlich einer Reduktion Menadion-induzierter ROS identifiziert werden konnten. Die Fraktionen F und K zeigten in einer Konzentration von 100 µg/ml eine ähnlich potente antioxidative Wirkung im Vergleich zum komplexen AT 4, überstiegen dessen Wirkstärke jedoch nicht. Da Fraktion F und K nur geringe Anteile (< 1 %) des AT 4 darstellen, scheint es unwahrscheinlich, dass sie für dessen Gesamtwirkung verantwortlich sind. Quercetin trägt vermutlich zur Wirkung des Gesamtextraktes bei. Dabei kann Quercetin aber nicht allein für die bioaktive Wirkung ver-

antwortlich sein, da Quercetinkonzentrationen $< 50 \mu\text{M}$ in vorausgegangenen Untersuchungen keine Modulation der ROS-Levels zeigten. Ebenso scheinen Phloretin und Phloridzin von untergeordneter Bedeutung hinsichtlich einer Reduktion des intrazellulären ROS-Levels sein. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass der Effekt des AT 4 nicht auf eine einzelne Substanz(klasse) zurückzuführen ist, sondern sich vielmehr aus mehreren (teilweise noch unbekannten) Verbindungen über additive oder synergistische Wirkungen zusammensetzt.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen, wurden ausschließlich die Subfraktionen auf eine Modulation der mRNA Transkripte der GCL-C und HO1 untersucht, die eine Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität ($\leq 90 \%$) zeigten. Die Subfraktionen wurden analog zu den untersuchten Extrakten und Einzelverbindungen in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) untersucht.

Transkriptionsanalyse der GCL-C und HO1 durch AT 4 Subfraktionen

Inkubationen mit Fraktion E ließen für beide untersuchten Enzyme keine effektive Änderung des relativen Transkriptlevels bis $100 \mu\text{g/ml}$ erkennen (Abbildung 51). Bei $100 \mu\text{g/ml}$ E konnte für die HO1-Transkripte eine signifikante Zunahme beobachtet werden, die jedoch mit $1,6 \pm 0,3$ sehr niedrig war und somit biologisch nicht von Relevanz zu sein scheint. Demgegenüber war für Fraktion F eine signifikante Erhöhung der GCL-C und HO1 Transkripte und einen Faktor 2 bei einer absoluten Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ erkennbar.

In Konzentrationen, die 200 bzw. $500 \mu\text{g/ml}$ AT 4 entsprechen, bewirkte F keine Modulation der Gentranskription beider Enzyme. Analog zu E konnte für die Fraktion H keine merkliche Änderung der mRNA-Level über einen Faktor 2 für GCL-C und HO1 beobachtet werden.

Die Subfraktionen I, J und K zeigten im DCF-Assay eine potente Verringerung des intrazellulären ROS-Levels. Für I wurde jedoch keine Modulation der untersuchten Enzyme bis $100 \mu\text{g/ml}$ detektiert (Abbildung 52). Fraktion J bewirkte einen signifikanten Anstieg ($p = 0,057$) der HO1-Transkriptmenge nach 24 h Inkubation bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ auf $7,3 \pm 4,1$. Dieses Ergebnis unterliegt jedoch einer starken Schwankung. Die GCL-C Transkription erfuhr durch Inkubation mit J keine Veränderung. Für Fraktion K konnte für $100 \mu\text{g/ml}$ ein Anstieg der GCL-C Transkripte um den Faktor $4,0 \pm 1,9$ und für die HO1 um den Faktor $5,4 \pm 2,4$ beobachtet werden.

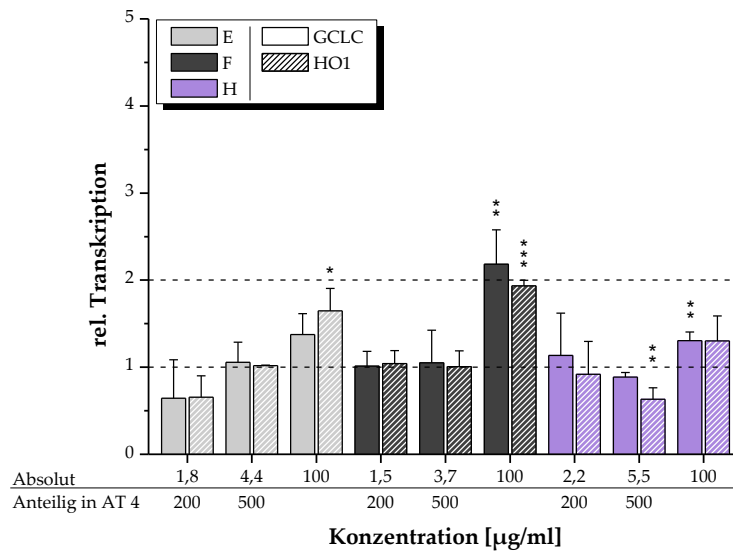


Abbildung 51: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinyligase, katalytische Untereinheit) und HO1 (Hämoxygenase 1) nach 24 h Inkubation mit den Subfraktionen E, F und H[#] an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die Subfraktionen wurden in 100 µg/ml absolut und zusätzlich in Konzentrationen, wie sie in 200 und 500 µg/ml AT 4 enthalten sind, inkubiert. Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

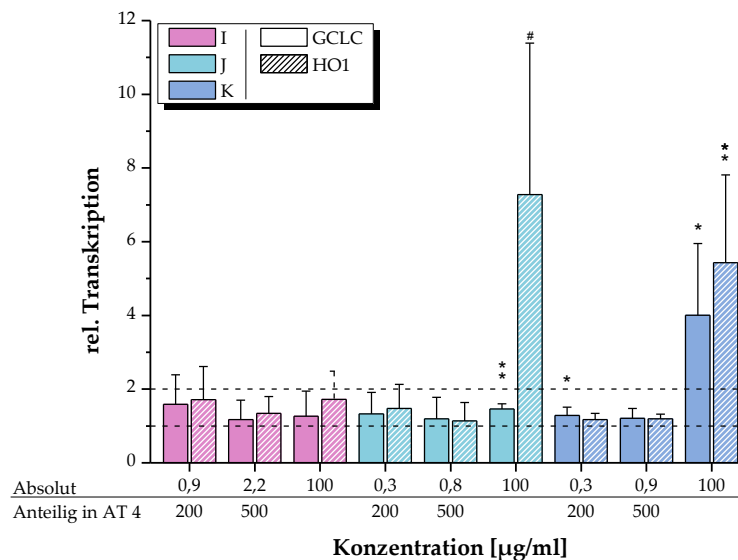


Abbildung 52: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinyligase, katalytische Untereinheit) und HO1 (Hämoxygenase 1) nach 24 h Inkubation mit den Subfraktionen I, J und K[#] an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die Subfraktionen wurden in 100 µg/ml absolut und zusätzlich in Konzentrationen, wie sie in 200 und 500 µg/ml AT 4 enthalten sind, inkubiert. Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; # = $p = 0,057$.

Für Fraktion L deutete sich ein Anstieg der relativen Transkription der GCL-C ab einer Konzentration entsprechend 500 µg/ml AT 4 an, jedoch ist die hohe Schwankung zu berücksichtigen (Abbildung 53). Bei 100 µg/ml L stiegen die Transkripte signifikant bis auf $4,4 \pm 1,9$ (GCL-C) und $4,8 \pm 2,3$ (HO1) an. Die Subfraktionen M und N zeigten in den Konzentrationsbereichen entsprechend 200 µg/ml und 500 µg/ml AT 4, keine Veränderung der mRNA Transkripte. Fraktion M ließ bei 100 µg/ml eine Induktion der GCL-C Transkripte auf $2,6 \pm 0,7$ und der HO1 auf $2,1 \pm 1,0$ erkennen. N zeigte ab 100 µg/ml einen Anstieg der GCL-C Transkription auf $3,1 \pm 1,4$.

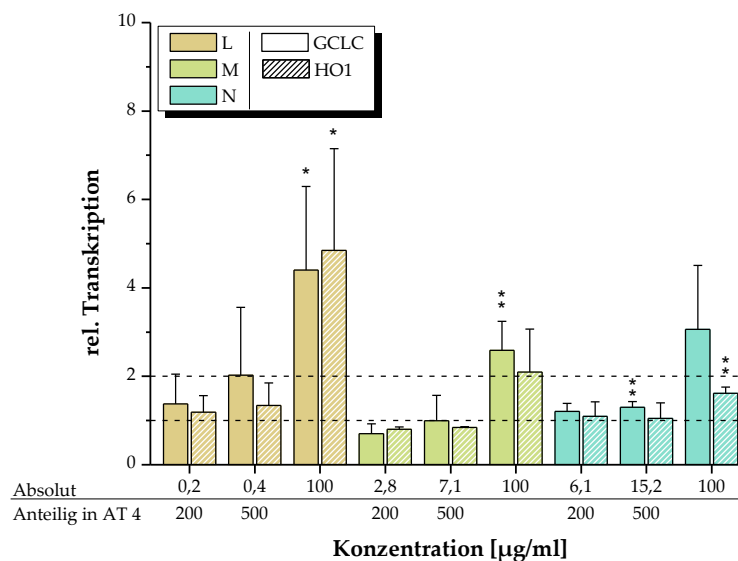


Abbildung 53: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinylase, katalytische Untereinheit) und HO1 (Hämoxygenase 1) nach 24 h Inkubation mit den Subfraktionen L, M und N[#] an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die Subfraktionen wurden in 100 µg/ml absolut und zusätzlich in Konzentrationen, wie sie in 200 und 500 µg/ml AT 4 enthalten sind, inkubiert. Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test (bezogen auf 1% DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Durch die Fraktionen O, P und Q kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Transkriptmengen sowohl der GCL-C als auch der HO1 (Abbildung 54). Fraktion O führte in der höchsten eingesetzten Konzentration zu einer Erhöhung der mRNA-Gehalte der GCL-C auf $4,6 \pm 1,6$ und der HO1 auf $2,0 \pm 0,3$ relativ zur Lösungsmittelkontrolle. Für Fraktion P konnte ebenfalls in den Konzentrationen entsprechend 200 µg/ml und 500 µg/ml AT 4 eine Modulation der GCL-C detektiert werden. Diese Modulation zeigte sich in einem konzentrationsabhängigen Verhältnis. Bereits ab 7,0 µg/ml und 17,4 µg/ml konnte Fraktion P eine signifikante GCL-C

Induktion über einen Faktor 2 detektiert werden. In der höchsten Konzentration von 100 µg/ml wurden die GCL-C Transkripte mit $6,9 \pm 1,8$ und die HO1 mit $5,7 \pm 2,6$ am stärksten induziert. Fraktion Q zeigte bei 100 µg/ml eine signifikante Erhöhung der relativen GCL-C mRNA Menge auf $3,8 \pm 1,7$ und der HO1-Transkriptmenge auf $2,0 \pm 0,7$.

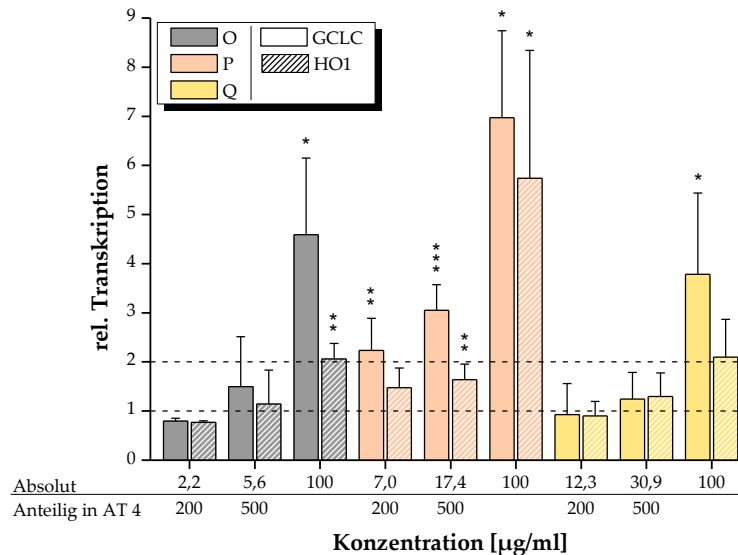


Abbildung 54: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinylase, katalytische Untereinheit) und HO1 (Hämoxygenase 1) nach 24 h Inkubation mit den Subfraktionen O, P und Q[#] an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die Subfraktionen wurden in 100 µg/ml absolut und zusätzlich in Konzentrationen, wie sie in 200 und 500 µg/ml AT 4 enthalten sind, inkubiert. Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. [#](Diplomarbeit Lebherz, 2010); Student's *t*-test (bezogen auf 1% DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Zusammenfassend haben die Transkriptionsuntersuchungen ergeben, dass P als einzige Subfraktion in der Lage war in extraktrelevanten Konzentrationen entsprechend 200 µg/ml AT 4 eine potente Induktion des Enzyms GCL-C zu erzielen. Die Transkription der HO1 wurde hierbei nur ab 100 µg/ml Subfraktion moduliert. Eine signifikante Modulation der GCL-C Transkripte um mehr als einen Faktor 4 bei 100 µg/ml wurde von Fraktion P hervorgerufen, gefolgt von O, L, K und Q (Abbildung 55). Für die Fraktionen N, M und F wurde ein Anstieg auf ein relatives Transkriptlevel ≥ 2 beobachtet. Im Gegensatz dazu ist für E, H, I und J keine Modulation der GCL-C Transkripte zu beobachten. Die potenteste Erhöhung der Transkriptmenge der HO1 (100 µg/ml) erfolgte durch J und P, gefolgt von K und L. Eine Induktion der HO1 Transkripte > 2 wurde bei F, I, O, M und Q beobachtet. Keine substanzielle Modulation der HO1 wurde durch E, H und N erhalten.

Die Induktion der GCL-C durch den komplexen Extrakt AT 4 beträgt bei 100 µg/ml $2,5 \pm 0,6$ und bei 250 µg/ml $5,4 \pm 0,5$ [Dissertation Roth, 2010]. Für die HO1 konnte bei 100 µg/ml AT 4 eine Erhöhung der mRNA-Level um einen Faktor 2 und bei 250 µg/ml um 7 beobachtet werden (Abbildung 43). Ein Vergleich der Inkubationen mit 100 µg/ml Subfraktion zeigt, dass einige die Bioaktivität des komplexen Extrakts AT 4 übersteigen.

Gegenüberstellung der Modulation des endogenen ROS-Levels und der Transkriptionsanalyse von GCL-C und HO1

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse des DCF-Assays und die Transkriptionsanalysen in Abbildung 55 zusammengefasst. Die Subfraktionen wurden bei einer Konzentration von 100 µg/ml untersucht, da nur hier eine signifikante Veränderung des Transkriptlevels beider Biomarker detektiert wurde. Für die Fraktionen E und H war eine signifikante Verringerung des intrazellulären ROS-Levels im DCF-Assay zu erkennen. Nach 24 h Inkubation konnte jedoch keine Induktion der GCL-C und HO1 durch beide Subfraktionen beobachtet werden. Denkbar wäre, dass andere zytoprotektive Gene induziert werden, die eine Verringerung des ROS-Levels bewirken. Darüber hinaus könnte eine radikalabfangende Eigenschaft der Inhaltsstoffe selbst oder durch deren Abbauprodukte in Frage kommen [Lu und Yeap Foo, 2000]. Ein substanzieller Beitrag der Fraktionen E und H im Hinblick auf eine Induktion der GCL-C und HO1 kann jedoch ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse des DCF-Assay zeigten für Fraktion F eine signifikante Reduktion des intrazellulären ROS-Levels auf. Bestätigend hierzu ließ die Transkriptionsanalyse eine signifikante Induktion beider Enzyme um einen Faktor 2 relativ zur Lösungsmittelkontrolle beobachten. Im Vergleich zu anderen Subfraktionen ist die Induktion der GCL-C und HO1 durch F relativ gering, trotz potenter antioxidativer Wirkung im DCF-Assay. Dies lässt ebenfalls auf eine Induktion anderer Enzyme oder eine Wirkung der Fraktion F als direkter Radikalfänger schließen.

Eine signifikante Verringerung des ROS-Levels wurde ebenfalls durch die Subfraktion I beobachtet. Analog zu den Fraktionen E und H war trotz einer Reduktion intrazellulärer ROS keine Enzyminduktion erkennbar. Hauptbestandteil der Fraktion stellt Phloretin mit ca. 36 % dar (Tabelle 6). In 100 µg/ml Fraktion F beträgt die Phloretinkonzentration etwa 130 µM. Phloretin zeigte in vorausgegangenen Untersuchungen bis 100 µM keine Änderung der

GCL-C und HO1 Transkripte. Erst ab 250 μ M war eine signifikante Induktion > 2 beider Gene erkennbar (Abbildung 44). Obgleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass Phloretin zur antioxidativen Wirkung des AT 4 möglicherweise über additive Wirkungen in Kombination mit anderen Inhaltsstoffen beiträgt scheint die Phloretinmenge in 100 μ g/ml I nicht auszureichen um die GCL-C oder HO1 zu induzieren, was die Transkriptionsdaten bestätigt. Die Anwesenheit weiterer, bisher nicht identifizierter bioaktiver Inhaltsstoffe ist aufgrund der marginalen Effektivität der Subfraktion in den Zellkulturuntersuchungen auszuschließen.

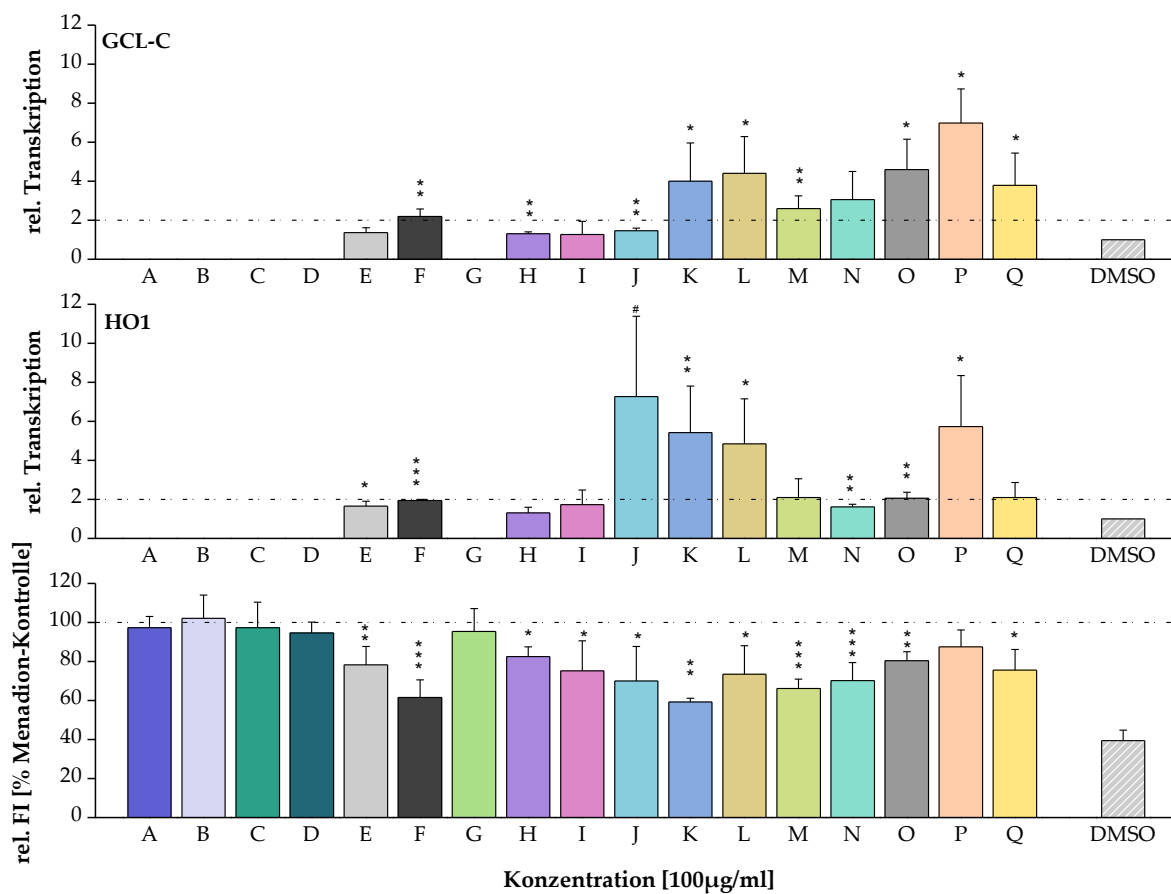


Abbildung 55: Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Modulation der Transkription der GCL-C (oben) und HO1 (mitte) und des Menadion-induzierten intrazellulären ROS-Levels (unten) durch die Subfraktionen des AT 4 nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen (100 U/ml Katalase). Die Ergebnisse der qPCR wurden auf β -Aktin als internes Kontrollgen normalisiert. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten (Diplomarbeit Lebherz, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf 1 % DMSO), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Die Fraktion K wurde als potenteste Fraktion im DCF-Assay identifiziert. Sie führte zu einer signifikanten Erhöhung der GCL-C ($4,0 \pm 1,9$) und HO1 ($5,4 \pm 2,4$) Transkriptmenge. Ferner

schien die erhöhte Transkription der Enzyme mit einer antioxidativen Wirkung im DCF-Assay zu korrelieren. Daneben zeigte auch Fraktion L eine Induktion der GCL-C und HO1 bei gleichzeitiger Reduktion intrazellulärer ROS nach Menadionbehandlung. Auch Fraktion J führte zu einer Verringerung des zellulären ROS-Levels, wobei hier nur eine Induktion der HO1 detektiert werden konnte. Die Transkription der GCL-C wird bis 100 µg/ml J nicht moduliert. Dies lässt vermuten, dass die beiden Enzyme nicht gleichermaßen über den Nrf2-ARE Signalweg reguliert werden und weitere Mechanismen wie Transaktivierungen anderer Signalwege von Bedeutung sein könnten. Ferner bedingt eine Aktivierung des Nrf2-Signalwegs, im Sinne einer Nrf2 Translokation, nicht immer eine Hochregulierung entsprechender Enzyme. Entscheidend ist unter Anderem die Wahl des Heterodimerpartners von Nrf2 und nachfolgende spezifische Anlagerung an ARE [Jaiswal, 2004].

Bei näherer Betrachtung der Inhaltsstoffe der drei Fraktionen J, K und L fällt auf, dass die unbekannte Substanz mit der Molmasse 308 g/mol in nennenswerten Konzentrationen (J: 7,5 %, K: 27 %, L: 20 %) vorliegt. Daneben sind Spuren von Phloretin, Phloridzin, Quercetinglykosiden und weiteren bisher unbekannten Verbindungen enthalten, deren Beitrag zur Transkripterhöhung der GCL-C und HO1 in vorliegenden Konzentrationen jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. So liegt die Vermutung nahe, dass diese Substanz mit der Molmasse 308 g/mol einen erheblichen Beitrag zur Bioaktivität dieser Subfraktionen leisten könnte.

Um diese potentiell bioaktiven Verbindungen zu identifizieren, wurde im Rahmen des Projekts von der Universität Hohenheim (AG Prof. Carle) sowohl auf MS-Daten als auch auf UV-Spektren der Subfraktionierung zurückgegriffen. Die molaren Massen wurden anhand von Massenspektren im ESI(-)-Modus bestimmt. Ein Vergleich der UV-Spektren bekannter Polyphenole mit den nicht identifizierten Verbindungen zeigte große Ähnlichkeit mit Phloridzin (Verbindung mit 470 g/mol) bzw. Naringin (Verbindung mit 308 g/mol). Folglich könnte es sich bei den unbekannten Substanzen um Verbindungen mit Dihydrochalcon- bzw. Flavanongrundstruktur handeln. Die UV-Spektren der nicht identifizierten Komponenten mit 470 g/mol unterschied sich geringfügig von dem der Verbindung mit 308 g/mol, da letztere eine deutlich erkennbare Schulter bei einer Wellenlänge von 338 nm im UV Spektrum aufwies. So wurde angenommen, dass es sich bei der Verbindung mit 470 g/mol um ein Derivat der Verbindung mit der Molmasse 308 g/mol handelt, da deren Molekülonen unter

Freisetzung eines Ions mit dem m/z-Verhältnis 307 fragmentierten. Generell waren die Fragmentierungsmuster der beiden Komponenten sehr ähnlich. So waren für alle drei Verbindungen Fragmente bei m/z 201, 243 und 165 charakteristisch. Bei der Fragmentierung von Verbindung mit 470 g/mol wurde ein Neutralmassenverlust von 162 Da beobachtet, was auf das Vorhandensein einer Hexose hindeutet. Trotz intensiver Literaturrecherche konnten die genannten Verbindungen allerdings nicht zugeordnet werden. Eine Bildung von neuen Verbindungen während des Verlaufs der Gewinnung des Pektinnebenproduktes kann nicht ausgeschlossen werden [Matthias Fromm, persönliche Mitteilung; Abschlussbericht FEI/AiF FV 15617 N].

Die quercetinreichen Fraktionen M und N wiesen ebenfalls eine Korrelation zwischen antioxidativer Wirkung im DCF-Assay und einer Induktion der untersuchten Enzyme auf. Wie bereits erwähnt beträgt die Quercetinkonzentration in 100 µg/ml Subfraktion für M 225 µM und N 30 µM. Die Transkriptionsuntersuchungen zu Quercetin haben nur in der maximal getesteten Konzentration (250 µM) eine Induktion der GCL-C ($2,8 \pm 0,9$) und HO1 ($3,7 \pm 1,9$) gezeigt (Abbildung 44). Demnach könnte für die Subfraktion M die Induktion der beiden Enzyme auf Quercetin zurückgeführt und gleichzeitig die Anwesenheit weiterer bioaktiver Inhaltsstoffe weitestgehend ausgeschlossen werden. In N leistet Quercetin möglicherweise einen Beitrag zur Gesamtwirkung, jedoch müssen noch weitere Substanzen enthalten sein, da Untersuchungen mit Quercetin bis 50 µM keine Veränderung des Transkriptlevels beobachten ließen.

Inkubationen mit den Subfraktionen O, P und Q zeigten ebenfalls eine potente Erhöhung der relativen Transkriptmenge der GCL-C und HO1. Interessanterweise konnte für Fraktion P auf Transkriptionsebene die höchste Induktion verzeichnet werden, obwohl sich im DCF-Assay nur eine marginale Modulation des ROS-Levels beobachten ließ. Unter der Annahme, dass sich die Veränderungen auf mRNA Ebene ebenfalls auf Proteinebene in einer erhöhten Translation der Gene widerspiegeln würde dies bedeuten, dass die untersuchten Gene nur einen geringen Einfluss auf die antioxidative Wirkung besitzen. Dies müsste jedoch in zukünftigen Untersuchungen durch Genexpressions- und Aktivitätsuntersuchungen verifiziert werden.

In einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung von Apfelsaft konnten mittels Auftrennung durch Sephadex LH20 Säulenmaterial Subfraktionen identifiziert werden, die eine Induktion

der NQO1-Aktivität aufzeigten [Zessner et al., 2008]. In Folgeuntersuchungen wurden als bioaktive Verbindung zum einen Quercetin und 3-Hydroxyphloretin identifiziert [Dissertation Hümmer, 2009]. Als weitere Komponente, die zu einer Erhöhung der NQO1-Aktivität führte, wurden gewisse Aromakomponenten aus Apfelsaft diskutiert. Diese konnten in nachfolgenden Studien als 3-Hydroxy- β -damascon und Di-(2-ethylhexyl)-phthalat identifiziert werden [Gerhäuser et al., 2009]. Prozessbedingt erfährt der Trester direkt nach dem Pressen der Äpfel hohe Temperaturen um einen mikrobiellen Verderb zu vermeiden. Dies führt zu einer starken Abreicherung der flüchtigen Substanzen, sodass 3-Hydroxy- β -damascon nach der Pektinextraktion praktisch nicht mehr im Flavonoidextrakt zu finden ist. Da es sich bei 3-Hydroxy- β -damascon um eine flüchtige Verbindung handelt ist eine Anwesenheit in den Subfraktionen, bzw. im Tresterextrakt auszuschließen.

Die Ergebnisse der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung legen den Schluss nahe, dass die Bioaktivität des AT 4 in den untersuchten Testsystemen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus mehreren Einzelsubstanzen zusammensetzt. So konnte als antioxidativ wirkender Inhaltsstoff in Tresterextrakten Quercetin identifiziert werden, das bereits in der Literatur für seine Induktion von Phase-II Enzymen beschrieben ist [Tanigawa et al., 2007; Yao et al., 2007]. Für das Dihydrochalcon Phloridzin, sowie für die enthaltenen Quercetinglykoside ist eine Beteiligung an der Gesamtaktivität unwahrscheinlich. Phloretin könnte über (über)additive oder synergistische Wirkungen, in Kombination mit weiteren Substanzen, ein antioxidatives Potential besitzen. Darüber hinaus wurden bisher nicht identifizierte Substanzen in den Subfraktionen detektiert, die scheinbar eine entscheidende Rolle hinsichtlich einer Senkung des intrazellulären ROS-Levels, als auch einer Induktion Nrf2-abhängiger Gene besitzen. Fraktionen die beispielsweise eine Verbindung mit der Molmasse 308 g/mol besitzen zeigten in Abhängigkeit von deren Konzentration eine potente Wirkung in den untersuchten Testsystemen. In weiteren Untersuchungen gilt es nun diese Inhaltsstoffe zu isolieren und eine Charakterisierung des Wirkprofils vorzunehmen. Darüber hinaus muss geklärt werden, ob und inwieweit es sich hierbei um natürliche Apfelinhaltsstoffe handelt, oder ob während der Tresterprozessierung es zu einer Generierung/Anreicherung dieser Verbindungen kommt. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass die potente antioxidative Wirkung des Gesamtextraktes mit hoher Wahrscheinlichkeit auf bisher unbekannte Extraktinhaltsstoffe zurückzu-

führen ist. Ferner könnte die bioaktive Wirkung teilweise durch additive Effekte bekannter Inhaltsstoffe erklärt werden. Ergänzend dazu sollte überprüft werden, ob überadditive oder synergistische/antagonistische Effekte unter den bekannten Inhaltsstoffen eine Rolle spielen.

4.2.3.3 Modulation des endogenen ROS-Levels und Transkriptionsanalyse von GCL-C und HO1 durch einen rekonstituierten Extrakt

Um die Ergebnisse der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung zu verifizieren, wurde von der Universität Hohenheim (AG Prof. Carle) anhand der vorliegenden Struktur-Aktivitätsdaten gezielt eine rekonstituierte Mischung des AT 4 hergestellt. Diese sollte ermöglichen, dass überadditive/synergistische oder antagonistische Wirkungen der Einzelverbindungen miterfasst werden. Da nur ein gewisser Prozentsatz der Inhaltsstoffe des AT 4 identifiziert werden konnte, wurde bei der Herstellung der rekonstituierten Mischung der restliche Anteil mit Glukose auf 100 % aufgefüllt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung des rekonstituierten Extrakts [persönliche Mitteilung, Matthias Fromm].

Inhaltsstoffe	AT 4 rek. (mg/g)
Phloretin	10,29
Phloretinxyloglukosid	16,94
Hydroxyphloridzin	7,91
Phloridzin	453,4
p-Cumarsäure	1,11
Quercetin	17,78
Quercetin-3-rhamnosid	11,98
Quercetin-3-galaktosid	12,89
Quercetin-3-glukosid	6,07
Ferulasäure	1,34
Isorhamnetin-3-O-hexosid	2,32
Glukose	458,2

Als Marker für die biologische Aktivität dienten die Modulation Menadion-induzierter ROS im DCF-Assay und die Beeinflussung der Transkription der Nrf2-abhängigen Gene GCL-C und HO1 nach 24 h Inkubation in der Zelllinie HT29.

In Abbildung 56 sind die Ergebnisse des rekonstituierten AT 4 bezüglich einer Modulation des Menadion-induzierten Redoxstatus zu sehen. Es zeigt sich deutlich, dass der rekonstituierte Extrakt den intrazellulären ROS-Level nach Behandlung mit dem Redoxcyclus Menadion kaum beeinflusst. Es deutete sich lediglich eine marginale Verringerung intrazellulärer ROS bei 250 µg/ml AT 4 rek. an ($89,2 \pm 14,5 \%$), die sich als nicht signifikant erwies. Zu erwarten wäre theoretisch eine Reduktion, die durch die Summe aller bioaktiven Substanzen zustande kommt und im Bereich des nativen AT 4 ($47,9 \pm 5,8 \%$) liegt.

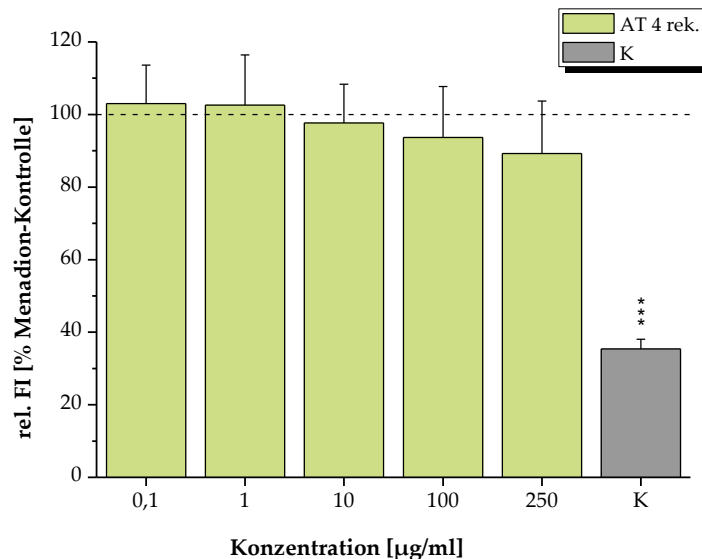


Abbildung 56: Untersuchung des rekonstituierten AT 4 auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 µM Menadion. MW $\pm$ SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. K, 1 % DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), *** = $p < 0,005$.

Ergänzend dazu ergaben die Ergebnisse qPCR keinen Hinweis auf eine Transkripterhöhung der GCL-C oder HO1 nach einer 24 h-Inkubation mit rekonstituiertem AT 4. Bis 250 µg/ml verblieben die mRNA Transkripte für GCL-C und HO1 auf gleichem Niveau. Zum direkten Vergleich wurde AT 4 (250 µg/ml) mitgeführt, der einen signifikanten Anstieg der relativen mRNA-Transkripte beider Enzyme aufzeigte.

Bei einer Gegenüberstellung der DCF-Assay Ergebnisse mit den Transkriptionsanalysen könnte postuliert werden, dass die enthaltenen Polyphenole nur ein geringes ROS-abfangendes Potential besitzen, da lediglich eine schwache Reduktion des intrazellulären ROS-Levels detektiert wurde. Eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs durch den rekonstituierten Extrakt scheint fraglich, da bis 250 µg/ml keine Änderung des relativen mRNA-Levels beider Enzyme verzeichnet wurde. Dies müsste jedoch in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden, um eine genauere Aussage treffen zu können.

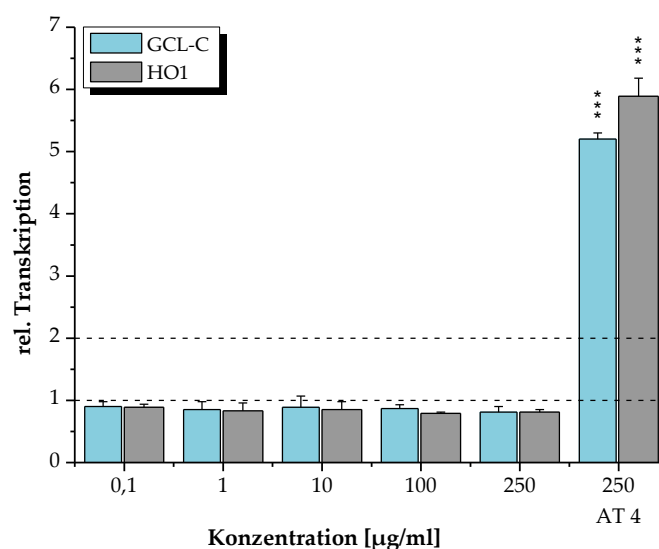


Abbildung 57: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinyligase, katalytische Untereinheit) und HO1 (Hämoxygenase 1) nach 24 h Inkubation mit dem rekonstituierten AT 4 an HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle diente AT 4 (250 µM). Student's *t*-test (bezogen auf 1 % DMSO), *** = $p < 0,005$.

Die Ergebnisse des rekonstituierten Extrakts bestätigten dahingehend die Untersuchungen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung, dass die beobachteten biologischen Effekte des Extrakts nur zu einem geringen Teil auf die bisher identifizierten Inhaltsstoffe zurückzuführen sind. Demnach rückt vermehrt die Verbindung mit der Molmasse 308 g/mol, die bereits in Kapitel 4.2.3.2 mit einer potentiellen antioxidativen Wirkung diskutiert wurde, in den Fokus des Interesses. Darüber hinaus sind bis dato unbekannte Extraktinhaltsstoffe mit ähnlichem Wirkpotential nicht auszuschließen. Synergistische und/oder additive Effekte der eingesetzten Substanzen untereinander konnten im Rahmen dieser Untersuchungen der rekonstituierten Mischung nicht beobachtet werden.

4.2.4 Verdauungsmimetischer Ansatz zur Simulation der gastrointestinalen Passage

Zur besseren Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf eine *in vivo* ähnliche Situation ist eine Berücksichtigung von Veränderungen während der gastrointestinalen Passage unerlässlich. So wurde im Folgenden anhand eines verdauungsmimetischen Ansatzes der Fragestellung nachgegangen, ob sich die biologische Aktivität des AT 4 während der Passage des Gastrointestinaltrakts verändert. Da der Dickdarm als potenzielles Zielorgan für eine mögliche chemopräventive Wirkung der Polyphenole am Ende des Gastrointestinaltrakts lokalisiert ist, könnten große Anteile an Apfelpolyphenolen durch Resorption, Zerfall oder bakteriellen Abbau bis zum Erreichen des Dickdarms verloren gehen [Barth et al., 2005; Gossé et al., 2005; Kahle et al., 2007]. Die Methode der *in vitro* Batch Fermentation sollte die Bereiche des Gastrointestinaltrakts, ausgehend von der Mundhöhle, über Magen, Dünndarm bis hin zum Dickdarm, möglichst den *in vivo* Bedingungen angepasst, simulieren (Abbildung 58) [Glei et al., 2006; Borowicki et al., 2010].

Die Simulation der einzelnen Kompartimente erfolgte unter Berücksichtigung des jeweiligen physiologischen pH, Puffers und unter Zugabe entsprechender Verdauungsenzyme. Die Resorptionsvorgänge des Dünndarms wurden durch den Einsatz von Dialyseschläuchen mit einer Molmassengrenze (molecular weight Cut-Off, MWCO) von 100 - 500 Da mitberücksichtigt. Die semianaerobe Atmosphäre des Dünndarms bzw. die anaerobe Atmosphäre des Dickdarms wurde durch mehrmaliges Vakuumziehen und Begasen mit Fermentationsgas (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) eingestellt. Das Milieu des Dickdarms mit seiner mikrobiellen Flora wurde durch die Zugabe einer humanen Fäzessuspension realisiert. Die Probennahme erfolgte zum einen nach 6 h Dünndarmsimulation (Dünndarm 6 h) sowie jeweils nach 1, 3, 6 und 24 h Fermentation mit humaner Fäzessuspension (Fermentat 1 h - 24 h).

Für Zellkulturuntersuchungen wurden die verdauungsmimetischen Ansätze durch Zentrifugation und Sterilfiltration aufbereitet um eine mikrobielle Kontamination der Zellkultur zu verhindern (Fermentationsüberstände).

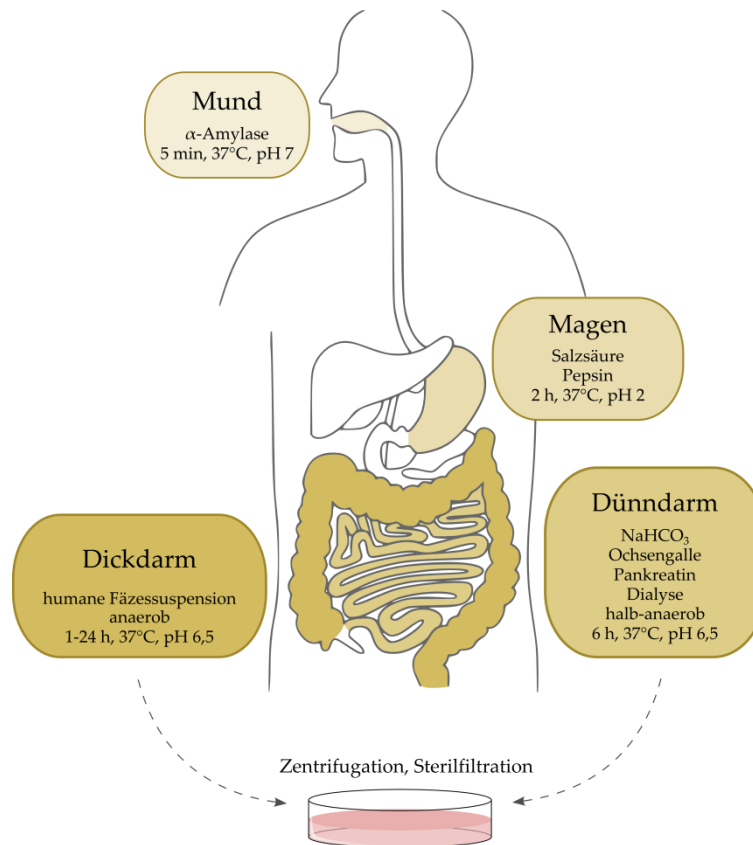


Abbildung 58: Darstellung des verdauungsmimetischen Ansatzes mittels *in vitro* Batch Fermentation zur Simulation des Gastrointestinaltrakts [in Anlehnung an Gleib et al., 2006; Borowicki et al., 2010].

Parallel zum AT 4 wurde ein weiterer Fermentationsansatz durchgeführt, der keinen polyphenolhaltigen Extrakt enthielt. Mit diesem Blank wurden die benötigten Konzentrationsreihen der Fermentationsüberstände hergestellt, damit in jeden Inkubationsansatz der gleiche Anteil an Fermentationsmatrix enthalten ist. Dieser Blank diente darüber hinaus als Negativ- bzw. Lösungsmittelkontrolle in den Untersuchungen.

Als Marker für die biologische Aktivität der Fermentate wurde ihre antioxidative Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS im DCF-Assay, sowie ihre Wirkung auf die Transkription der Nrf2-regulierten Gene GCL-C und HO1 gewählt, um die Ergebnisse mit vorausgegangenen Untersuchungen des nativen Extrakts vergleichen zu können. Darüber hinaus sollte analog zum unfermentierten AT 4 eine Modulation des zellulären GSH-Levels nach der Methode von Tietze et al. [1969], sowie eine DNA-protektive Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS im Comet Assay nach Tice et al. [2000] miterfasst werden.

4.2.4.1 Modulation Menadion-induzierter ROS durch Fermentationsüberstände

Ein potenzieller Einfluss der Fermentationsüberstände auf die antioxidative Kapazität der Zelle wurde analog vorangegangener Untersuchungen mittels DCF-Assay erfasst. Die fermentierten Proben wurden in Konzentrationen von 0,1 - 250 µg/ml in den Experimenten eingesetzt. In Abbildung 59 ist die antioxidative Wirkung der Fermentationsüberstände im DCF-Assay der Wirkung des nativen, unfermentierten AT 4 gegenübergestellt. Die simulierte Dünndarmprobe (Dünndarm 6 h) zeigte bis 250 µg/ml eine Verringerung Menadion-induzierter ROS auf $82,3 \pm 12,5$ %, wohingegen AT 4 eine Senkung des ROS-Levels auf ca. 50 % erkennen ließ. Dies lässt auf eine deutliche Abnahme der Bioaktivität im Vergleich zu AT 4 schließen.

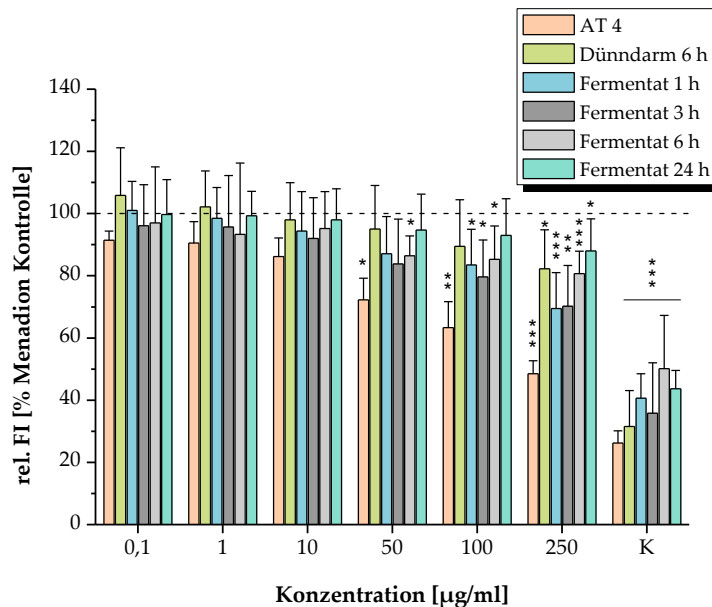


Abbildung 59: Untersuchung der Fermentationsüberstände des AT 4 und AT 4[#] auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachbehandlung mit 20 µM Menadion. MW ± SD von mind. 3 unabhängigen Experimenten einer Sechsfachbestimmung normiert auf Menadion behandelte Zellen. K, 1 % DMSO ohne Menadion; FI, Fluoreszenzintensität; [#](Dissertation Roth, 2010); Student's *t*-test (bezogen auf Menadion-Kontrolle), * = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,005.

Die Dickdarmproben (Fermentate 1 h - 24 h) zeigten eine konzentrationsabhängige Verringerung intrazellulärer ROS. Die potenteste Reduktion auf maximal $69,4 \pm 11,5$ % wurde bei einer relativ kurzen Fermentationsdauer von 1 h, beobachtet. Mit zunehmender Fermentationsdauer sank die Fähigkeit der Fermentate intrazelluläre ROS zu reduzieren ab, bis auf das

Niveau der simulierten Dünndarmprobe. Auffällig war dass der mitgeführte Blank der jeweiligen Fermentate (3 h - 24 h) analog anstieg. Die Modulation des intrazellulären ROS-Levels durch AT 4 und dessen Fermentationsüberstände kann wie folgt zusammengefasst werden: AT 4 > Dünndarm 6 h > Fermentat 1 h, 3 h > Fermentat 6 h > Fermentat 24 h.

Grundsätzlich zeigten die Fermentationsüberstände konzentrationsabhängig eine signifikante Verringerung des Menadion-induzierten ROS-Levels in HT29-Zellen. Obgleich unter allen Fermentationsüberständen die Kolonsimulation nach 1 h die potentesten Effekte zeigte, war im Vergleich zum unfermentierten AT 4 die Reduktion intrazellulärer ROS jedoch deutlich geringer. Auffällig war vor allem der Rückgang der Bioaktivität nach der Dünndarmpassage (Dünndarm 6 h) im Vergleich zu AT 4. Eine mögliche Erklärung könnte der Abbau relevanter Inhaltsstoffe sein. Weiterhin ist eine Diffusion bioaktiver Inhaltsstoffe während der Dünndarmsimulation durch den Dialyseschlauch in den umliegenden Puffer denkbar. In weiterführenden Experimenten könnte diese Frage zum einen mit einer Untersuchung des Dialysepuffers auf bekannte Inhaltsstoffe und/oder Abbauprodukte beantwortet werden, um so den Aktivitätsverlust der Proben anhand der Zusammensetzung des Dialysepuffers besser bewerten zu können.

Ein möglicher Erklärungsansatz hinsichtlich des Anstiegs der Bioaktivität von Dünndarm 6 h bis Fermentat 1 h wäre die Bildung neuer Komponenten/Inhaltsstoffe mit erhöhtem Wirkpotential während der Behandlung mit humaner Fäzessuspension. Denkbar wäre eine Spaltung der Polyphenolglykoside durch bakterielle β -Glykosidasen. Unterschiede in der Aufnahme von Polyphenolglykosiden und deren Aglyka ist bereits beschrieben. Obwohl im Fall von Quercetin gezeigt werden konnte, dass auch Quercetinglykoside über den Natrium-abhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1) resorbiert werden können, wurde für das Aglykon eine höhere Resorptionsrate beobachtet [Walgren et al., 2000; Boyer et al., 2004]. So zeigte beispielsweise Quercetin-3-O-rhamnosid durch Abspaltung des Zuckerrests eine bessere zelluläre Aufnahme, was sich wiederum in den Experimenten dieser Dissertation in einer erhöhten Bioaktivität widerspiegeln würde [Morand et al., 2000]. In verschiedenen Fermentationsmodellen konnten hohe Level an β -Glukosidasen und β -Rhamnosidasen, die zur Spaltung von Quercetinglykosiden oder Phloridzin befähigt sind in der Darmmikroflora nachgewiesen werden [Bokkenheuser et al., 1987; Schneider et al., 1999; Aura et al., 2002]. Diese

Studien bestätigen die Vermutung dahingehend, dass im Darm teilweise eine Hydrolyse der Glykoside stattfindet.

Bei Betrachtung der mitgeführten Blanks fällt ein zeitabhängiger Anstieg intrazellulärer ROS auf (Abbildung 59). Dieser Anstieg der Kontrollwerte könnte in einem erhöhten endogenen Redoxstatus der Zellen begründet sein. Denkbar wäre, dass infolge des Fermentationsprozesses mit humaner Fäzessuspension, unabhängig von der Testsubstanz, redox-aktive Komponenten gebildet werden. Dies würde sich in einer kleineren Differenz der Fluoreszenzwerte zwischen Blank mit Menadion und Blank ohne Menadion abzeichnen. Der zeitabhängige Anstieg der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay war ebenfalls bei den einzelnen Proben erkennbar. Die Fluoreszenz stieg jedoch nie signifikant > 100 % an, so dass immer noch von einer Schutzwirkung gesprochen werden kann. Ob es sich bei den Proben der Kolonsimulation bei steigender Fermentationsdauer um eine Abnahme der Bioaktivität aufgrund von Degradationsprozessen handelte, oder sich aufgrund einer Überlagerung der ROS-bildenden Eigenschaft der Fäzessuspension eine Abnahme der Gesamtaktivität der Fermentationsüberstände darstellte, kann allerdings nicht eindeutig beantwortet werden. Festzuhalten bleibt, dass Fermentationsüberstände bis zu einer Konzentration von 250 µg/ml nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen eine signifikante Verringerung des zellulären ROS-Levels zeigten. Eine Restaktivität der Proben, nach Erreichen des Dickdarms scheint demnach zu bestehen.

In einer analog durchgeführten Fermentationsstudie von Bellion et al. [2008] wurde ebenfalls eine Reduktion des tBH-induzierten ROS-Levels durch fermentierte Apfelsaftextrakte beobachtet, wobei die Fermentationsdauer 24 h betrug. Die ROS-senkende Aktivität konnte neben den enthaltenen Polyphenolen auch auf die Bildung kurzkettiger Fettsäuren zurückgeführt werden, die während der Fermentation aus ballaststoffreichen Nahrungsbestandteilen, Zuckern und Polyphenolen entstehen können [Blaut et al., 2003; Veeriah et al., 2007].

Der Tresterextrakt AT 4 besitzt als Leitverbindungen Phloridzin, Phloretin und Quercetin, deren Beitrag zur ROS-Modulation im tBHQ-induzierten DCF-Assay in Kapitel 4.2.3.1 ausführlich diskutiert wurde. Wie bereits erwähnt, kann Phloridzin durch bakterielle β -Glukosidasen zu Phloretin und Glukose abgebaut werden. Weitere fermentative Abbauprodukte des Phloretins stellen Phloroglucinol (PG) und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (4HPPA) dar (Abbildung 25). Zu den Abbauprodukten von Quercetin durch die mikrobielle

Darmflora zählen PG und 3,4-Dihydroxyphenylacetat (3,4DHPAA). Letztere Verbindung kann weiter zu 3-Hydroxyphenylacetat (3HPAA) umgewandelt werden (Abbildung 24). Untersuchungen dieser Abbauprodukte (0,3 - 100 μ M) bezüglich einer Modulation des tBH-induzierten ROS-Levels in Caco2-Zellen zeigten ebenfalls nach 24 h Inkubation eine ROS-senkende Wirkung für PG, 3,4DHPAA und 4HPPA, die jedoch im Vergleich zur Muttersubstanz geringer ausfiel [Bellion et al., 2008]. 3HPAA erwies sich bis 100 μ M als ineffektiv hinsichtlich einer Modulation des ROS-Levels. Ob und in wie weit die Abbauprodukte einen Einfluss auf die Induktion Nrf2-regulierter Gene besitzen wurde in der Studie nicht berücksichtigt. Die Untersuchungen von Bellion et al. [2008] wurden sowohl mit Zusatz von Katalase (100 U/ml) zum Inkubationsmedium, als auch ohne Zusatz durchgeführt, wobei sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich einer intrazellulären ROS-Modulation der Testsubstanzen zeigten. Folglich wurde angenommen, dass die antioxidative Wirkung der phenolischen Inhaltsstoffe/Abbauprodukte nicht durch ROS-Bildung und nachfolgender Induktion der antioxidativen Abwehr beeinträchtigt wurden [Bellion et al., 2008].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Fermentationsüberstände des AT 4 bis zu einer Fermentationsdauer von 24 h der Kolonsimulation eine ROS-senkende Eigenschaft im DCF-Assay aufzeigten. Die Wirkstärke aller Fermentationsproben ist im Vergleich zum unfermentierten Extrakt als geringer einzustufen. Auffällig war ein Rückgang der Bioaktivität nach 6 h Dünndarmsimulation, der durch Diffusionsprozesse und einer Degradierung relevanter Inhaltsstoffe erklärt werden könnte. Diese Annahme müsste jedoch in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden. Der Anstieg der antioxidativen Wirkung, nach erfolgter Fermentation mit humaner Fäzessuspension für 1 h, könnte in der Bildung aktiver Komponenten begründet sein. So wäre beispielsweise eine Deglykosylierung und/oder weitere Fragmentierung von Polyphenolglykosiden durch die mikrobielle Darmflora zu PG, 3,4DHPAA und 4HPPA möglich.

4.2.4.2 Transkriptionsanalyse der GCL-C und HO1 durch Fermentationsüberstände

In Anlehnung an die Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung der Fermentationsüberstände wurde die Transkription der Nrf2-abhängigen Enzyme GCL-C und HO1 mittels qPCR untersucht.

Die Analysen der GCL-C Transkription ergaben, dass die Fermentationsüberstände konzentrationsabhängig ab 100 µg/ml eine potente Erhöhung der relativen mRNA-Menge für GCL-C bewirkten (Abbildung 60). Einzig die Probe der Kolonsimulation nach 1 h ließ erst ab 250 µg/ml eine Zunahme der relativen Transkripte auf $3,0 \pm 1,1$ erkennen.

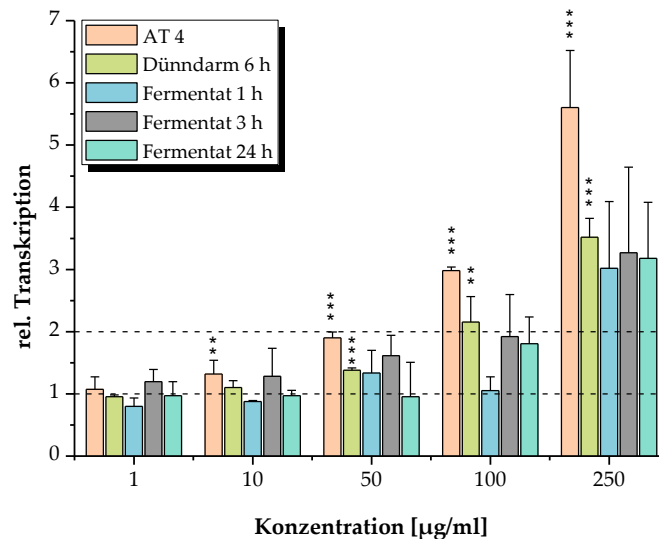


Abbildung 60: Untersuchung der rel. Transkription der GCL-C (γ -Glutamylcysteinligase, katalytische Untereinheit) nach 24 h Inkubation durch AT 4[#] und dessen Fermentationsüberstände in HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 2-3 unabhängigen Experimenten. [#](Dissertation Roth, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf Blank), ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Die höchste Induktion der GCL-C Transkripte konnte für die Probe Dünndarm 6 h beobachtet werden. Sie zeigte ab 100 µg/ml eine signifikante Erhöhung auf $3,5 \pm 0,3$ relativ zur Kontrolle.

Im direkten Vergleich zum unfermentierten AT 4 fällt auf, dass die *in vitro* Fermentation zu einer leichten Verminderung der GCL-C Transkriptmenge führte. Für AT 4 konnte eine maximale Induktion der GCL-C auf das $5,6 \pm 0,9$ -fache gezeigt werden. Insgesamt erscheint die Erhöhung der GCL-C Transkripte nach Fermentation der Proben geringer als durch den unfermentierten Extrakt. Eine wesentliche Transkriptzunahme über einen Faktor 3 konnte bis 250 µg/ml nicht erreicht werden.

Die HO1-Transkriptmenge in HT29-Zellen zeigte eine marginale konzentrationsabhängige Zunahme nach 24 h Inkubation mit den Fermentationsüberständen (Abbildung 61). Eine

deutliche Transkriptionserhöhung von ca. 2 relativ zur Lösungsmittelkontrolle konnte erst ab 250 µg/ml der fermentierten Proben erreicht werden. Im Vergleich zur HO1-Induktion des unfermentierten Extrakts ($7,0 \pm 0,9$ bei 250 µg/ml) sind die Effekte der Fermentationsüberstände um etwa einen Faktor 3 geringer. Die Modulation der Transkription durch AT 4 und dessen Fermentationsüberstände lässt sich wie folgt zusammenfassen: AT 4 > Dünndarm 6 h, Fermentat 1 h, 3 h, 24 h.

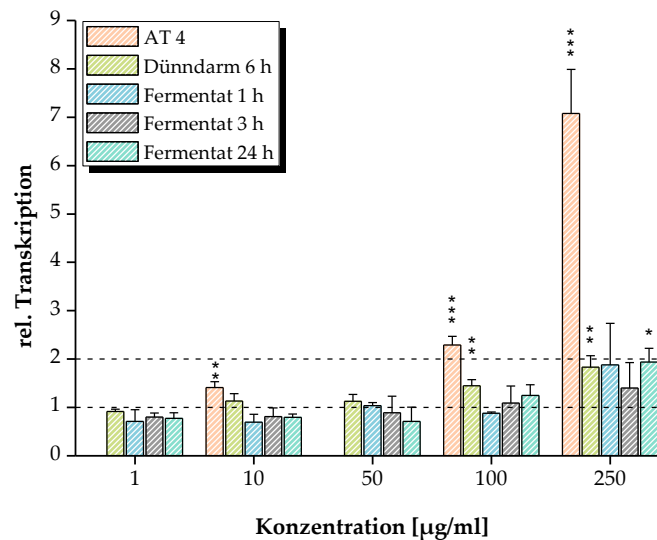


Abbildung 61: Untersuchung der rel. Transkription der Hämoxygenase 1 (HO1) nach 24 h Inkubation durch AT 4[#] und dessen Fermentationsüberständen in HT29-Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Normalisiert wurde auf β -Aktin. MW $\pm$ SD von mindestens 2-3 unabhängigen Experimenten. [#](Dissertation, Matthias Roth). Student's t-test (bezogen auf Blank), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Unter Berücksichtigung der DCF-Assay Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen der qPCR, dass es während der Fermentation zu einem Verlust und/oder Abbau gewisser Extraktinhaltsstoffe kam. Hierbei schienen vor allem Verbindungen, die für eine Transkriptionserhöhung der HO1 relevant sind, betroffen zu sein. In der Literatur konnten nur wenige Daten zur aktuellen Fragestellung gefunden werden, dennoch ist für verschiedene Polyphenolabbauprodukte eine Induktion Nrf2-regulierter Gene beschrieben. In Studien an LT97-Zellen untersuchten Miene et al. [2011] den Einfluss zweier Polyphenolabbauprodukte auf die Transkription der GSTT2. Durch Inkubation mit dem Quercetinabbauprodukt 3,4DHPAA (2,5 µM) für 12 h konnte eine erhöhte Transkription der GSTT2 um das 1,7-fache der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Nach längeren Inkubationszeiten (24 h) wurde

ebenfalls eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung der GSTT2-Gentranskription detektiert. Darüber hinaus war keine Konzentrationsabhängigkeit in den Untersuchungen feststellbar.

Eine Behandlung von V79 Zellen mit PG führte zu einem Anstieg der Expression, sowie der Aktivität des Enzyms Katalase und schützte vor H₂O₂ induzierten Zellschädigungen [Kang et al., 2006]. Eine Induktion der Katalase über den Nrf2-ARE Signalweg wurde bereits beschrieben [Zhu et al., 2005]. Weiterführende *in vitro* Untersuchungen mit PG konnten nach dessen Inkubation eine verstärkte Phosphorylierung von ERK nachweisen [Kang et al., 2006]. Dies lässt vermuten, dass die protektive Wirkung von PG gegenüber oxidativem Stress auf eine Transaktivierung von Nrf2 über ERK, als vorgeschalteter Signalweg, zurückzuführen ist. Aufgrund des hohen Anteils an Phloridzin und der Anwesenheit von Quercetin, sowie dessen Glykoside in AT 4 wäre eine Beteiligung von PG und 3,4DHPAA an der Enzyminduktion von GCL-C und HO1 über eine Aktivierung von Nrf2 denkbar. Dies müsste jedoch in weiterführenden Untersuchungen mit den jeweiligen Abbauprodukten verifiziert werden. Ferner könnten durch Deglykosylierung von Phloridzin durch die mikrobielle Darmflora beachtliche Mengen an Phloretin entstehen und so einen Beitrag zur Aktivität der Kolonfermentate leisten. Phloretin zeigte bei 250 µM eine signifikante Induktion der GCL-C und HO1 in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation.

Im Rahmen ihrer Forschungsarbeit hat Claudia Miene ebenfalls mit Humanfäzes fermentierten Apfelsafttrub auf eine Modulation der GSTT2-Transkripte untersucht [Dissertation Miene, 2010]. Die Analytik der Fermentationsüberstände mittels Gaschromatographie zeigte eine signifikante Zunahme an Butyrat während des Fermentationsprozesses. Butyrat wurde bereits mit einer Reihe chemopräventiver Wirkungen, darunter die Induktion von Phase-II Enzymen, in Verbindung gebracht [Kirlin et al., 1999]. Eine Behandlung von LT97 Zellen mit fermentiertem Apfelsafttrub ließ jedoch keine Veränderung der GSTT2, GSTP1, UGT1A1 und COX2 erkennen.

Ferner wurden im Rahmen einer humanen Interventionsstudie mit normal- und übergewichtigen Männern Fäzesproben gesammelt und durch Zentrifugation das Fäzeswasser (FW) isoliert. Während der Intervention mussten die Probanden täglich 750 ml naturtrüber Apfelsaft trinken, während sie eine ansonsten polyphenolarme Diät einhielten. Durch Zentrifugation wurden unlösliche Bestandteile, sowie ein Großteil der Mikroorganismen abgetrennt,

sodass das isolierte FW ausschließlich alle löslichen Substanzen des Koloninhalts beinhaltet. Darunter zählten ebenfalls Polyphenole und deren Abbauprodukte, die im Dünndarm nicht resorbiert wurden. Nach Inkubation von LT97-Zellen mit FW konnte keine Modulation des Transkriptionsniveaus der GSTT2 zwischen normalgewichtigen und adipösen Probanden beobachtet werden [Dissertation Miene, 2010], obwohl Untersuchungen mit einem Apfelextrakt in LT97 Zellen eine Induktion der GSTT aufzeigten [Miene et al., 2011]. Ob die Unwirksamkeit der FW auf eine zu starke Degradation der Inhaltsstoffe zurückzuführen ist wurde nicht näher untersucht.

Dennoch konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmals gezeigt werden, dass nach einer Fermentation eines polyphenolreichen Apfeltresterextrakts über 24 h mit humaner Fäzessuspension es zu keinem vollständigen Verlust von dessen Bioaktivität kommt. Bei 250 µg/ml Fermentationsüberstand ist bei beiden untersuchten Enzymen eine Transkripterhöhung detektierbar. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der antioxidativen Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS im DCF-Assay durch die Fermentationsüberstände. Zur besseren Zuordnung der Bioaktivität sollte in weiterführenden Experimenten der Einfluss von Butyrat und der Abbauprodukte von Quercetin und Phloretin/Phloridzin auf die Transkription der GCL-C und HO1 erfasst werden. Nach jetzigem Wissensstand kann keine Aussage getroffen werden, ob die Induktion teilweise auf eine Deglykosylierung von Phloridzin zu Phloretin, oder Aufgrund einer weiteren Degradierung der Polyphenole durch mögliche Abbauprodukte zurückzuführen ist.

4.2.4.3 Einfluss der Fermentationsüberstände auf den zellulären GSH-Level

In ersten Untersuchungen zur Charakterisierung des Wirkprofils von AT 4 konnte nach Behandlung von HT29-Zellen für 24 h ab 100 µg/ml eine signifikante Zunahme der zellulären GSH-Menge detektiert werden [Dissertation Roth, 2010]. Diese Zunahme wurde mit einem Anstieg des relativen mRNA-Levels der GCL-C begründet und steht im Einklang mit der beobachteten antioxidativen Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS im DCF-Assay. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass Fermentationsüberstände des AT 4 eine vielversprechende Induktion der GCL-C aufwiesen, stellte sich nachfolgend die Frage, ob zusätzlich eine Modulation des zellulären Gesamtglutathiongehalts (tGSH) vorliegt.

Die Bestimmung des tGSH erfolgte nach der Methode von Tietze [1969]. Das Prinzip beruht auf einer Reduktion des oxidierten Glutathions (GSSG) mittels GSR und NADPH zu GSH, das im Anschluss über eine Farbreaktion photometrisch ($\lambda = 412 \text{ nm}$) bestimmt werden kann. Als Positivkontrolle wurde Buthioninsulfoximin (BSO; 1 mM) in den Experimenten mitgeführt. BSO wirkt als kompetitiver Inhibitor, indem es mit L-Glutamat um die Substratbindungsstelle des Enzyms GCL konkurriert und so eine Depletion von GSH verursacht. Neben BSO wurde bei den Proben der *in vitro* Fermentation als weitere Kontrolle zusätzlich tBHQ als GSH-Induktor mitgeführt.

Analog zu den Untersuchungen im DCF-Assay und der qPCR wurden HT29-Zellen für 24 h mit den Fermentationsüberständen in Gegenwart von Katalase inkubiert. Um Artefakte aufgrund einer zytotoxischen Wirkung auszuschließen wurden vor der GSH Bestimmung die Zellen vorsichtig mit Trypsin abgelöst und eine Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellviabilität lag bei den zugrundeliegenden Untersuchungen stets $\geq 90 \%$. Die Fermentationsüberstände wurden über einen Konzentrationsbereich von 1 - 250 $\mu\text{g/ml}$ auf eine Änderung des zellulären GSH-Levels untersucht (Abbildung 62). Die Proben der Kolonsimulationen nach 3 h und 6 h wurden nicht in die Untersuchungen mit einbezogen, da die Transkriptionsuntersuchungen keinen merklichen Unterschied der Wirkqualität nach 1 h und 24 h Fermentation gezeigt hatten.

Bis 50 $\mu\text{g/ml}$ wurde durch keinen Fermentationsüberstand eine deutliche Änderung des GSH-Grundlevels im Vergleich zur Kontrolle erzielt. Inkubationen der Fermentationsüberstände mit 100 $\mu\text{g/ml}$ ließen eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung des GSH-Levels vermuten, die sich ab 250 $\mu\text{g/ml}$ (Dünndarm 6 h, Fermentat 24 h) mit einem Anstieg auf ca. 200 % als signifikant erwies. Vergleichend dazu konnte für AT 4 bereits ab 100 $\mu\text{g/ml}$ ein signifikanter Anstieg des tGSH-Levels auf ca. 200 % der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden [Dissertation Roth, 2010].

Die Fermentationsüberstände zeigten untereinander nur marginale Unterschiede in ihrer Bioaktivität. So ist der GSH-Anstieg für die Fermentate nach 1 h und 24 h etwas ausgeprägter, als bei der Dünndarmsimulation. Die Modulation des intrazellulären GSH-Levels durch AT 4 und dessen Fermentationsüberstände kann wie folgt zusammengefasst werden: AT 4 > Dünndarm 6 h, Fermentat 1 h, 24 h.

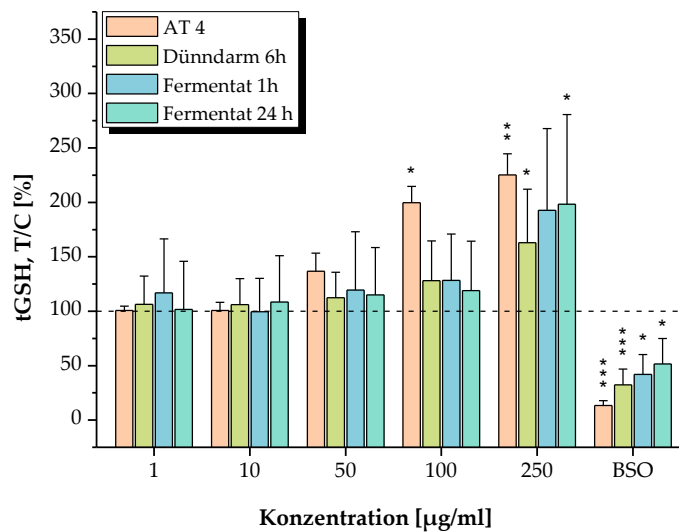


Abbildung 62: Modulation des zellulären Gesamtglutathion-Gehaltes (tGSH) von AT 4[†] und dessen Fermentationsüberstände in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation, serumhaltig, 100 U/ml Katalase; MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. [†](Dissertation Roth, 2010). Student's *t*-test (bezogen auf Blank), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Der Anstieg des zellulären tGSH-Levels steht im Einklang mit den PCR-Ergebnissen zur Induktion des Enzyms GCL-C, sowie der potenten Reduktion Menadion-induzierter ROS im DCF-Assay. Eine potente Erhöhung des tGSH-Levels durch Fermentationsüberstände zeigte sich lediglich in der höchsten Konzentration (250 µg/ml), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Fermentationsstufen und -zeiten erkennbar war. Während sich im DCF-Assay eine Verringerung der Bioaktivität mit steigender Fermentationsdauer andeutete, konnte für die Kolonsimulationen eine marginal höhere Zunahme des zellulären GSH-Levels beobachtet werden. Unerwarteterweise bewegte sich der GSH-Anstieg auf annähernd gleichem Niveau wie für den unfermentierten Extrakt AT 4, obgleich die Fermentationsüberstände in den anderen Assays eine geringere Bioaktivität aufzeigten.

In einer Studie an Caco2-Zellen konnte mit einem durch Humanfäzes fermentierten Apfel-saftextrakts nach 6 h und 24 h Inkubation ebenfalls eine marginale Zunahme des tGSH beobachtet werden [Bellion et al., 2008]. Daneben wurde in einem separaten Inkubationsansatz nur mit Fermentationsmatrix (ohne Polyphenolzusatz) eine Verringerung des zellulären GSH-Levels detektiert. Die Autoren erklärten sich diese Depletion zum einen durch eine Induktion von GST-Isoenzymen durch kurzkettige Fettsäuren der Fermentationsmatrix, die eine Konjugation von GSH mit Xenobiotika katalysieren und es so zu einer Abnahme des

GSH-Levels kommen kann. Andererseits ist eine Konjugation von GSH durch Phenolsäuren der Fermentationsmatrix möglich, sodass dieses nicht mehr detektiert werden kann [Treptow-van Lishaut et al., 1999; Moridani et al., 2001; Bellion et al., 2008].

Es stellte sich die Frage welche Inhaltsstoffe der Fermentationsüberstände für die Induktion des zellulären tGSH-Levels verantwortlich waren. Für die Leitverbindungen Phloretin und Quercetin ist eine Erhöhung des GSH-Levels *in vitro* beschrieben. Phloretin bewirkte in HT29-Zellen bereits ab 10 μ M eine signifikante Zunahme von GSH nach einer Behandlungszeit von 24 h [Janzowski et al., 2004]. Für Quercetin konnte in Caco2- und HT29-Zellen nach 24 h Inkubation eine signifikante Zunahme des tGSH detektiert werden [Scharf et al., 2003; Schaefer et al., 2006]. Im Gegensatz dazu zeigte das Quercetinglykosid Rutin keine Beeinflussung des GSH-Status, was möglicherweise auf eine schlechtere zelluläre Aufnahme zurückzuführen ist [Schaefer et al., 2006]. Aufgrund der Instabilität von Quercetin im Zellkulturmedium wurden die beobachteten Effekte auf den GSH Haushalt hauptsächlich Quercetinmetaboliten und dessen Abbauprodukten zugeschrieben [Schaefer et al., 2006].

Für PG, das Abbauprodukt von Phloridzin und Phloretin, konnte in V79 Zellen neben einer Induktion der GCL-C ebenfalls eine Wiederherstellung des GSH-Grundlevels nach UV-Licht Bestrahlung beobachtet werden [Kang et al., 2010]. Ferner zeigten Kim und Kim [2010] eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion des intrazellulären GSH-Levels in HT1080-Zellen durch PG. Eine Beteiligung von Butyrat scheint jedoch keinen Einfluss auf die Glutathionhomöostase zu besitzen, da weder eine Modulation der Aktivität von GPx und SOD, noch eine Änderung des GSH-Levels detektiert werden konnte [Yano und Tierney, 1989].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fermentationsüberstände des AT 4 in Übereinstimmung der GCL-C Induktion eine Erhöhung des intrazellulären GSH-Levels aufzeigten. Insbesondere das fermentative Abbauprodukt PG der Leitverbindungen Phloridzin, Phloretin und Quercetin scheint von besonderer Bedeutung zu sein. Aufgrund des hohen Anteils an Phloridzin in AT 4 wäre eine Beteiligung von PG hinsichtlich einer verstärkten GSH-Synthese denkbar. In weiterführenden Untersuchungen sollte zukünftig geklärt werden, ob und in welchem Maße eine Degradierung der Extraktinhaltsstoffe zu PG stattfindet.

4.2.4.4 Einfluss der Fermentationsüberstände auf die DNA-Integrität

Als ein weiterer Endpunkt zur Bestimmung eines protektiven Potentials von Testsubstanzen hinsichtlich einer antioxidativen Wirkung wird die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) herangezogen. Der Comet-Assay ermöglicht den Nachweis der DNA-schädigenden Wirkung von Testsubstanzen *in vitro* und *in vivo*. Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen vorinkubiert, woraufhin im Anschluss eine Induktion von oxidativem Stress durch den Redoxcyclus Menadion analog zum DCF-Assay erfolgte. Nach der Lyse der Zellen unter Verwendung von basischem Puffer werden sowohl DNA-Einzel- als auch DNA-Doppelstrangbrüche mittels Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid detektiert. Auch alkalisensitive Stellen und Quervernetzungen der DNA mit weiteren Makromolekülen werden selbst bei geringer Schädigung miterfasst. Während der Elektrophorese kommt es zur Wanderung kleinerer DNA-Fragmente im elektrischen Feld, während hoch-kondensierte DNA kaum migriert. Im Mikroskop erscheint die geschädigte DNA als Schweif, ähnlich dem eines Kometen. Die Menge an DNA im Kometenschweif korreliert dabei direkt mit der Menge an DNA-Schäden.

Durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (Fpg) werden darüber hinaus Fpg-sensitive Stellen, als Hinweis auf eine mögliche oxidative Schädigung, der DNA detektiert. Die Auswertung erfolgt softwareunterstützt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

In Vorarbeiten des Projekts wurde AT 4 bereits auf eine Modulation Menadion-induzierter DNA-Schäden untersucht [Dissertation Roth, 2010]. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der DNA-Schäden mit einem Wirkmaximum bei 1 µg/ml AT 4. Höhere Konzentrationen ließen dagegen keine protektive Wirkung erkennen. Die durch Fpg detektierten oxidativen Schädigungen der DNA konnten im Konzentrationsbereich von 1 - 100 µg/ml potent vermindert werden, wobei sich ein U-förmiger Kurvenverlauf mit einem potentiellen Wirkmaximum bei 1 µg/ml AT 4 abzeichnete. Ab einer Extraktkonzentration von 250 µg/ml konnte keine deutliche Verringerung oxidativer DNA-Schäden detektiert werden. Darüber hinaus wurde AT 4 auch auf ein direkt strangbrechendes Potential hin untersucht, wobei bis 250 µg/ml keine Hinweise nach einer 3 h Inkubation gefunden werden konnten [Dissertation Roth, 2010]. Um der Frage nachzugehen, ob die Fermentationsüber-

stände des AT 4 ebenfalls ein DNA-protektives Potential besitzen wurden die Proben Dünndarm 6 h und Kolon 1 h in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Ergebnisse des protektiven Comet-Assays in HT29-Zellen für die Probe Dünndarm 6 h sind in Abbildung 63 dargestellt. Als Negativkontrolle diente der entsprechende Blank ohne Menadionbehandlung wodurch sich der Grundstatus der zellulären DNA-Schädigung darstellen ließ. Alle Proben wurden auf Menadion-behandelte Zellen normiert (100 %). Es zeigte sich deutlich eine konzentrationsabhängige Verringerung der DNA-Strangbruchrate sowohl mit, als auch ohne Fpg-Behandlung über den getesteten Konzentrationsbereich. Bei der höchsten getesteten Konzentration konnte eine Verringerung der DNA-Schäden bis zu dem Niveau der Negativkontrolle erzielt werden. Zwischen 1 - 100 µg/ml wurde eine marginal potentere Reduktion oxidativer DNA-Schäden beobachtet, die sich jedoch im Vergleich zu Zellen ohne Fpg-Behandlung als nicht signifikant erwies.

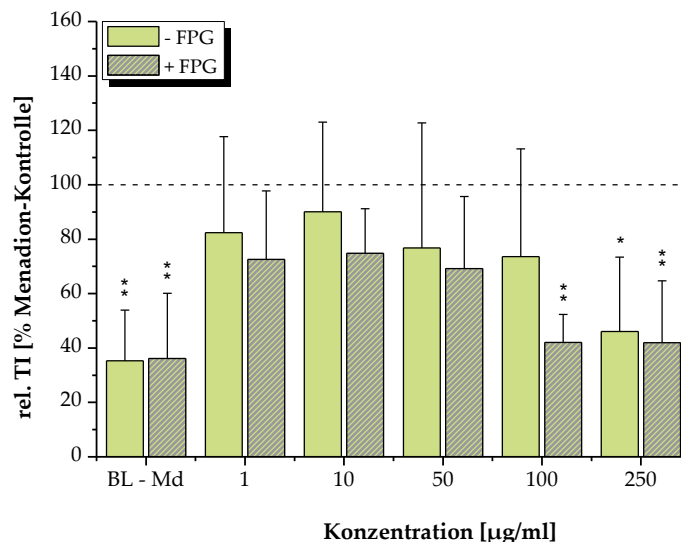


Abbildung 63: Untersuchung des Fermentationsüberstands Dünndarm 6 h auf eine DNA-protektive Wirkung im Comet Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte $\pm$ SD aus mind. 4 unabhängigen Versuchen; BL-Md, Blank ohne Menadion. Student's t-test (bezogen auf Blank), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Demgegenüber kam es nach Inkubation mit Kolon 1 h zu keiner Veränderung ROS-vermittelter DNA-Schäden nach 24 h Inkubation (Abbildung 64). In hohen Konzentrationen (> 100 µg/ml) deutete sich eine marginale Zunahme der DNA-Schäden mit und ohne Fpg-

Behandlung an. Erste orientierende Messungen weiterer Fermentationsüberstände (Kolon 3 h, Kolon 24 h) ließen ebenfalls keine DNA-protektive Wirkung nach 24 h Inkubation erkennen (Daten nicht gezeigt).

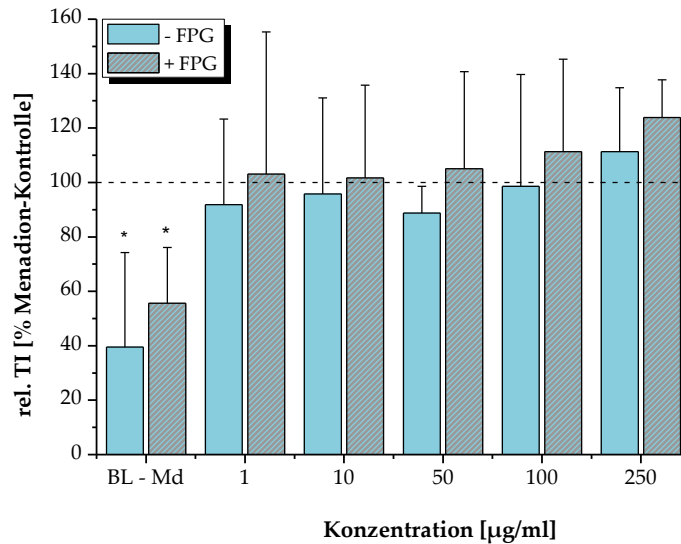


Abbildung 64: Untersuchung des Fermentationsüberstands Kolon 1 h auf eine DNA-protektive Wirkung im Comet Assay. 24 h Inkubation an HT29-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml Katalase. Einstündige Nachinkubation mit 20 µM Menadion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte $\pm$ SD aus mind. 4 unabhängigen Versuchen; BL-Md, Blank ohne Menadion. Student's t-test (bezogen auf Blank), * = $p < 0,05$.

Dieses Resultat steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen des DCF-Assays und der Transkriptionsanalyse, da für die Fermentationsüberstände entsprechend Kolon 1 h - 24 h sowohl eine Verringerung des zellulären ROS-Levels, als auch eine Induktion der GCL-C und GSH detektiert wurden, die gemeinsam eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität nahelegen. Generell wurden bei den Untersuchungen im Comet-Assay mit den Fermentationsüberständen starke Schwankungen innerhalb der einzelnen Experimente beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass der protektive Comet-Assay möglicherweise kein geeignetes Testsystem zur Untersuchung von Fermentationsüberständen darstellt.

Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen von 6 h fermentierten Apfelsaftextrakten in Caco2-Zellen bestätigt, die ebenfalls nur eine marginale Reduktion von DNA-Schäden in Menadion behandelten Zellen erkennen ließen [Bellion et al., 2008]. Nachfolgende Experimente von Bellion et al. [2008] mit 24 h fermentierten Apfelsaftextrakten zeigten keine Änderung der DNA-Strangbruchrate im Comet-Assay. Eine Beteiligung der Abbauprodukte von

Polyphenolen wie Butyrat konnte durch Untersuchungen von Rosignoli et al. [2001] gezeigt werden. In einer Präinkubation von HT29-Zellen mit Natriumbutyrat oder einer Mischung kurzkettiger Fettsäuren für 15 min und einer nachfolgenden Zugabe von H_2O_2 wurde eine signifikante Verringerung der DNA-Strangbruchrate detektiert [Rosignoli et al., 2001]. Über das DNA-protektive Potential weiterer Abbauprodukte konnte in der Literatur nichts gefunden werden.

Für Quercetin, Quercetin-3-O-rutinosid und Phloretin konnte in Menadion-gestressten Caco2-Zellen eine signifikante Verringerung von DNA-Schäden nachgewiesen werden. Das Wirkmaximum von Quercetin lag bei 30 μM und für Phloretin zwischen 1-10 μM [Schaefer et al., 2006]. Aufgrund des raschen Abbaus der Polyphenole innerhalb weniger Stunden unter Zellkulturbedingungen und während der Fermentation scheint ein Beitrag der Inhaltsstoffe zur Effektivität der Dünndarmsimulation unwahrscheinlich. In weiterführenden Untersuchungen wäre es hilfreich die Konzentrationen der Leitverbindungen und deren Abbauprodukte in den Fermentationsüberständen zu ermitteln um zu klären, ob die Wirkung der Fermentate auf bekannte Abbauprodukte zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach 6 h Dünndarmsimulation der AT 4 noch ein DNA-protektives Potential besitzt, das sich im Gegensatz zum unfermentierten Extrakt in einem konzentrationsabhängigen Dosis-Wirkungsverhältnis darstellen ließ. Mit steigender Fermentationsdauer scheint die protektive Wirkung gegenüber DNA-Schäden, möglicherweise aufgrund von Degradationsprozessen relevanter Inhaltsstoffe, verloren zu gehen. Die marginal potentere Verringerung oxidativer DNA-Schäden durch Dünndarm 6 h im Comet-Assay könnte mit einem Anstieg der antioxidativen Kapazität der Zelle, bedingt durch die Induktion von GSH, der GCL-C und HO1 Transkripte, erklärt werden. Somit legen diese Untersuchungen nahe, dass Apfeltresterextrakte in einem eingeschränkten Zeitfenster (bis zu 1 h) nach Erreichen des Kolons eine protektive Wirkung gegenüber DNA-schädigenden Agenzien wie ROS ausüben könnten.

4.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Epigenetische Veränderungen des Genoms zählen zu den frühen Prozessen der Kanzerogenese. In zahlreichen Tumoren wurde eine Stilllegung von Tumorsuppressorgenen, Genen der DNA-Reparatur oder Zellzyklusregulation beobachtet, wobei als Ursache eine Hypermethylierung von Promotorregionen gilt [Esteller, 2007]. Das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} zählt zu den tumorassoziierten Genen, die mit Hypermethylierungen und dem Verlust ihrer Genexpression in humanen Neoplasien in Verbindung gebracht werden [Gonzalez-Zulueta et al., 1995; Baylin et al., 1998; Hermann et al., 2004].

Im Fokus des ersten Abschnitts dieser Dissertation stand der Einfluss des polyphenolreichen Apfelextrakts BAE, sowie dessen Hauptinhaltsstoff CGA, auf die Modulation des Methylierungsstatus von p16^{INK4a} und dessen Transkription in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29. Ferner sollte im Rahmen einer Pilotstudie an Typ-II Diabetes Patienten untersucht werden, ob hypermethyliertes p16^{INK4a} in isolierten Kolonozyten aus Stuhlproben detektiert und durch den Konsum von Apfelsaft moduliert werden kann.

Um eine Veränderung der DNA-Methylierung untersuchen zu können ist es von entscheidender Bedeutung zu wissen, in welchem Stadium des Zellzyklus die Methylierung des Cytosins erfolgt. Direkt nach der Zellteilung besitzt die Zelle einen hemimethylierten DNA-Doppelstrang, d.h. nur der parentale DNA-Strang trägt das Methylierungsmuster. Dieses wird direkt im Anschluss an die Zellteilung durch die Enzymklasse der DNMT entsprechend des komplementären Strangs vervollständigt.

Mittels Langzeitinkubationen der Testsubstanzen sollte zunächst der Einfluss von BAE und CGA auf die DNA-Methylierung untersucht werden. Da bereits beschrieben ist, dass Apfelpolyphenole eine Hemmung proliferationsassoziierter Signalkaskaden bewirken können, wurde vorab ihr Einfluss auf das Zellwachstum untersucht [Kern et al., 2005; Fridrich et al., 2007a; Fridrich et al., 2007b]. Bis 100 µg/ml BAE und 100 µM CGA konnten keine signifikanten Effekte auf das Zellwachstum beobachtet werden, die einen weiteren Einsatz der Testsubstanzen in nachfolgenden zellbasierten Assays aufgrund einer Veränderung der Zellproliferation limitieren könnten.

Zur Untersuchung der DNA-Methylierung von HT29-Zellen durch oben genannte Testsubstanzen wurde das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} ausgewählt. Das Protein besitzt eine essentielle Rolle in der Regulation und Kontrolle des Zellzyklus beim Übergang von der G₁- in die

S-Phase. Insbesondere in Tumorzellen, die ein starkes Proliferationsverhalten aufweisen, ist p16^{INK4a} aufgrund einer exzessiven Methylierung der Promotorregion stillgelegt. In vorausgegangenen MS-PCR Untersuchungen konnte bereits eine Hypermethylierung des Gens in HT29-Zellen detektiert werden [Diplomarbeit Blust, 2008]. Nachfolgende Inkubationen innerhalb dieser Dissertation mit BAE für 48 h und 96 h ließen eine Abnahme der Promotormethylierung von p16^{INK4a} vermuten. Nach beiden untersuchten Zeitpunkten konnte bei 20 µg/ml BAE eine Zunahme der Bande für unmethylierte DNA im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle detektiert werden (Abbildung 30 und Abbildung 31). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass weder eine Konzentrationsabhängigkeit, noch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Inkubationszeiten beobachtet wurde. Demgegenüber konnte in ersten Untersuchungen innerhalb des Projekts keine Modulation der Promotormethylierung nach 24 h Inkubation beobachtet werden, so dass die Inkubationszeit möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf das Demethylierungspotential einer Substanz besitzt [Diplomarbeit Blust, 2008]. Eine Behandlung der HT29-Zellen mit CGA ließ nach 48 h bei 50 µM (Abbildung 32) und nach 96 h bei 0,5 und 100 µM (Abbildung 33) reproduzierbar ein Fragment für unmethylierte DNA erkennen, was auf eine Demethylierung der DNA rückschließen ließ. Analog dazu konnte durch den DNMT-Inhibitor 5-Aza-dC nach einer Behandlungszeit von 48 h eine Zunahme der Bande für unmethylierte DNA ermittelt werden. In diesem Versuchsansatz zeigte die Bande für methylierte DNA auch im Falle der Positivkontrolle optisch keine Intensitätsänderung. Dies lässt vermuten, dass es weder durch 5-Aza-dC, noch durch die Testsubstanzen zu einer vollständigen Demethylierung des Promotors kam. Diese Annahme wurde durch nachfolgende Transkriptions- und Expressionsuntersuchungen mit BAE und CGA bestätigt. Im Gegensatz zu bereits publizierten Studien erwiesen sich beide Testsubstanzen in der vorliegenden Arbeit sowohl nach 48 h, als auch nach 96 h Inkubation unwirksam hinsichtlich einer Modulation des relativen mRNA-Levels von p16^{INK4a} (Abbildung 34 und Abbildung 35) [Lee und Zhu, 2006; Fini et al., 2007]. Obgleich für 5-Aza-dC keine Änderung des Transkriptlevels für p16^{INK4a} beobachtet wurde, zeigte sich nach einer Behandlungszeit von 48 h eine potente Zunahme des Proteinlevels (Abbildung 36).

In der Literatur ist bereits eine Modulation der DNA-Methylierung durch Polyphenole aus Äpfeln und grünem Tee beschrieben [Fang et al., 2003; Fini et al., 2007]. Als Ursache werden verschiedene Mechanismen diskutiert wie phenolische Substanzen die DNA-Methylierung

beeinflussen können. Mittels Enzymaktivitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Polyphenole als nicht-kompetitive Inhibitoren von Methyltransferasen wirken können [Fang et al., 2003; Fang et al., 2007]. Insbesondere Verbindungen mit einem Gallatrest scheinen eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum der Enzyme zu besitzen und verhindern dadurch eine Bindung des Enzyms an die DNA. Neben EGCG konnte ein inhibitorisches Potential ebenfalls für strukturverwandte Catechine bestätigt werden [Lee et al., 2005]. Demnach scheint die Hemmung der Enzyme durch Polyphenole mit einem Gallatrest nicht auf einer einfachen Proteinbindungsaffinität zu beruhen. Im Vergleich zur Studie von Lee et al. [2005] sind die im hier vorliegenden Extrakt BAE enthaltenen Catechine jedoch in geringeren Konzentrationen zu finden, sodass deren Einfluss auf die Enzymaktivität möglicherweise von untergeordneter Rolle ist.

Neben einer direkten Interaktion der Extraktinhaltsstoffe mit DNMT wird ebenfalls eine negative Feedback-Inhibierung diskutiert. Polyphenole mit Catecholstruktur gelten als Substrat der COMT, einem Enzym des Fremdstoffmetabolismus, das hauptsächlich für die Inaktivierung der Neurotransmitter in den sympathischen Nerven zuständig ist. Als Methyl donor dient bei dieser Reaktion SAM, das durch die Abgabe der Methylgruppe zu SAH umgewandelt wird. SAH konnte als Feedback-Inhibitor der DNMT und COMT identifiziert werden [Coward et al., 1972; Coward und Slisz, 1973; Saavedra et al., 2009]. Für CGA und Kaffeesäure wurde *in vitro* und *in vivo* eine Verschiebung des SAH/SAM Gleichgewichts zugunsten von SAH beschrieben, was einen Aktivitätsverlust der DNMT nach sich ziehen könnte [Olthof et al., 2001a]. Ferner wurde in Untersuchungen an T-47D-Brustkrebszellen mit CGA bereits ab 20 μ M eine Demethylierung von p16^{INK4a} und in MCF7 Zellen eine konzentrationsabhängige Demethylierung des RAR β -Promotors beobachtet [Lee und Zhu, 2006]. Diese Studien bestätigen die MS-PCR Ergebnisse von CGA in dieser Dissertation und legen auch dessen Beitrag zum demethylierenden Potential des BAE nahe.

Mehrere *in vitro* Studien berichten ebenfalls von einer Abnahme der DNMT-Expression und dadurch bedingten Rückgang der Methylierung nach Behandlung mit Apfelpolyphenolen oder Sojaisoflavonen [Day et al., 2002; Fini et al., 2007]. Da in beiden Studien auf RNA-Ebene keine Änderung des Transkriptlevels der DNMT beobachtet werden konnte, gingen die Autoren von einer Beeinflussung der Proteintranslation aus. Ob und inwieweit eine Expressi-

onsänderung der DNMT in den Untersuchungen dieser Dissertation eine Rolle spielt kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Gegensatz zu den Experimenten dieser Dissertation konnte eine Reaktivierung der Transkription hypermethylierter Gene unter anderem durch EGCG, Quercetin und einen polyphenolreichen Extrakt aus Annurca Äpfeln gezeigt werden [Fang et al., 2003; Lee et al., 2005; Stresemann et al., 2006; Tan et al., 2009]. Ein großer Unterschied zu bereits publizierten Studien ist die Behandlungszeit der Zellen mit den Testsubstanzen. In der Literatur kamen häufig sehr lange Inkubationszeiten von bis zu 40 d zum Einsatz. Diese Tatsache bekräftigt die Annahme, dass die Inkubationszeit und die dadurch bedingte Zellteilungsrate einen wesentlichen Einfluss auf das demethylierende Potential der Extraktinhaltsstoffe besitzen. Dies würde teilweise auch die Heterogenität der MS-PCR Ergebnisse dieser Dissertation erklären, da innerhalb der Experimente nicht immer eine reproduzierbare Demethylierung detektiert werden konnte. Durch eine längere Behandlungszeit der Zellen mit den Testsubstanzen könnte eine potentere Demethylierung hypermethylierter Gene erzielt werden, was insbesondere für eine erfolgreiche Reaktivierung stillgelegter Gene essentiell ist.

Aufgrund der fehlenden Reexpression des p16^{INK4a} Gens durch BAE und CGA unter den vorliegenden Bedingungen scheint eine protektive Wirkung anhand der *in vitro* Ergebnisse fraglich. Dies mag für stark hypermethylierte Gene, wie es bei p16^{INK4a} in HT29-Zellen der Fall ist, zutreffen. Dennoch muss beachtet werden, dass Veränderungen der DNA-Methylierung bereits in einem sehr frühen Stadium des Kanzerogeneseprozesses auftreten. So wären demethylierende Effekte durch die Testsubstanzen möglicherweise nicht in der Lage eine Hypermethylierung aufzuheben, könnten jedoch andererseits einen Beitrag, im Sinne einer chemopräventiven Wirkung, gegen die Entstehung verstärkt methylierter Promotorregionen leisten.

Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde im Rahmen einer humanen Interventionsstudie die Promotormethylierung von p16^{INK4a} in Typ-II Diabetes Patienten untersucht. Zunächst sollte geklärt werden, inwiefern das Probandenkollektiv eine hypermethylierte Promotoregion von p16^{INK4a} besitzt, und ob der Methylierungsstatus durch den Konsum von Apfelpolyphenolen moduliert werden kann. Die Studie, mit einer Teilnehmerzahl von 15 männlichen Probanden, wurde im Max-Rubner Institut (Karlsruhe) durchgeführt. Die Teilnehmer wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe über einen

Zeitraum von vier Wochen 750 ml naturtrüben Apfelsaft konsumierte. Die zweite Gruppe trank stattdessen ein isokalorisches polyphenolfreies Kontrollgetränk. Zu Beginn der Intervention konnte bei 2 von 15 Probanden eine methylierte Promotorregion von p16^{INK4a} in Kolonozyten-DNA aus Fäzesproben detektiert werden (Abbildung 38). Im Gegensatz zu den *in vitro* Untersuchungen an HT29-Zellen wurde bei beiden Probanden mit einem positiven Ergebnis für methylierte DNA auch eine Bande für unmethylierte DNA detektiert, was für ein frühes Stadium der Promotormethylierung spricht. Demnach scheint die Methylierung von p16^{INK4a} in Typ-II Diabetes Patienten, ohne Diagnose eines kolorektalen Karzinoms, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies wird ebenfalls durch eine Studie von Petko et al. [2005] bestätigt, die eine Hypermethylierung von p16^{INK4a} in 5 % der Gewebeproben aus Hyperplasien detektierten.

Nach der Intervention mit Apfelsaft zeigten beide Probanden, die zu Beginn der Studie eine methylierte Promotorregion aufwiesen, einen Rückgang der Promotormethylierung (Abbildung 39). Obwohl die *in vitro* Ergebnisse heterogene Ergebnisse zeigten, konnte im Rahmen der humanen Interventionsstudie ein Rückgang der Methylierung nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum detektiert werden. Um die Ergebnisse statistisch abzusichern müsste das Experiment mit einem größeren Probandenkollektiv und mehreren relevanten Biomarkern wiederholt werden. Dennoch geben die hier dargestellten Ergebnisse erste Hinweise, dass ein Langzeitkonsum von Apfelsaft über vier Wochen einen Einfluss auf die Promotorregion besitzen kann. Ferner, scheint in Übereinstimmung mit der Literatur die Methode der MS-PCR aus Fäzes-DNA geeignet um Veränderungen der DNA-Methylierung erfassen zu können und stellt eine Alternative für bisherige invasive Methoden dar [Leung et al., 2004; Song et al., 2004; Lenhard et al., 2005; Nagasaka et al., 2009].

Im zweiten Abschnitt dieser Dissertation wurde der Frage nachgegangen inwiefern polyphenolreiche Apfeltresterextrakte, die als Nebenprodukt der Apfelsaftherstellung anfallen, den endogenen Redoxstatus humaner Kolonkarzinomzellen beeinflussen und ob sie sich in ihrer Wirkqualität von analog hergestellten Extrakten aus Apfelsaft unterscheiden. Im Fokus standen hierbei die antioxidative Wirkung der Testsubstanzen gegenüber Menadion-induziertem oxidativem Stress und die Beteiligung des redoxsensitiven Nrf2-ARE Signalwegs mit nachgeschalteter Genregulation. Ferner sollten neben der Testung identifizierter

Leitverbindungen auf oben genannte Parameter eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt werden, um wertgebende Komponenten anhand ausgewählter Biomarker bzw. Endpunkte weiter zu charakterisieren und identifizieren. Eine Übertragbarkeit der bisher erzielten *in vitro* Ergebnisse auf eine *in vivo* ähnliche Situation, unter Berücksichtigung der gastrointestinalen Passage, wurde unter Anwendung eines gastromimetischen Modells realisiert.

In Vorarbeiten innerhalb des Projekts konnte durch eine Ethylacetatextraktion und Säulenchromatographie mit dem unpolaren Adsorberharz Amberlite® XAD-16 ein Apfeltrestereextrakt (AT 4) generiert werden, der in verschiedenen Testsystemen ein potentes antioxidatives Potential aufwies [Dissertation Roth, 2010]. Für AT 4 konnte die Erhöhung der antioxidativen Kapazität unter anderem auf eine verstärkte Transkription der GCL-C und eine gesteigerte GSH-Biosynthese zurückgeführt werden. Im Vergleich dazu wurde ein weiterer Apfeltrestereextrakt (AT 9), der unter Verwendung des polaren Adsorberharzes Amberlite® XAD-7 generiert wurde, sowie zwei Extrakte aus klarem und trübem Apfelsaft in die Untersuchungen mit einbezogen.

Im Unterschied zu bereits publizierten Studien ließen die Apfelsaftextrakte dieser Dissertation AS klar und AS trüb nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen keine Änderung des Menadion-induzierten ROS-Levels, sowie keine substanzielle Veränderung des relativen mRNA-Levels der GCL-C erkennen (Tabelle 10, Abbildung 40, Abbildung 41) [Schaefer et al., 2006; Bellion et al., 2008; Bellion et al., 2010].

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Modulation der Transkription der GCL-C und des Menadion-induzierten intrazellulären ROS-Levels im DCF-Assay durch AS trüb, AS klar, AT 4, AT 9 in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation (250 µg/ml). Transkriptionserhöhung der GCL-C: < 2 -, ≥ 4 ↑↑, ≥ 6 ↑↑↑; Verringerung Menadion-induzierter ROS im DCF-Assay: > 80 % -, ≤ 70 % ↑↑, ≤ 60 % ↑↑↑.

Extrakt	GCL-C	DCF
AS trüb	-	-
AS klar	-	-
AT 9	↑↑	↑↑
AT 4	↑↑	↑↑↑

In vergleichbaren Untersuchungen mit Apfelsaftextrakten in einem tBH-induzierten Testsystem wurde die beobachtete ROS-senkende Eigenschaft der Extrakte auf die Leitverbindungen Phloretin, Quercetin und CGA zurückgeführt [Schaefer et al., 2006]. Für Phloretin konnte diese protektive Wirkung in Untersuchungen dieser Dissertation an tBHQ-induzierten Zellen nicht bestätigt werden, da erst ab 250 µg/ml eine marginale Verringerung intrazellulärer ROS detektiert wurde. Darüber hinaus sind Phloretin und Quercetin in AS klar/trüb nur in Spuren enthalten (Tabelle 4). So werden effektive Wirkkonzentrationen, wie sie in oben genannten Studien beobachtet wurden, durch Inkubationen der Apfelsaftextrakte dieser Dissertation nicht erreicht. Demnach erscheint ein Beitrag zur ROS-senkenden Wirkung von Phloretin und Quercetin vernachlässigbar und würde die fehlende Bioaktivität von AS klar/trüb erklären. CGA stellt den Hauptinhaltsstoff von AS klar/trüb dar (Tabelle 4). Obwohl CGA in der Literatur eine Verringerung intrazellulärer ROS in HT29-Zellen zwischen 10 µM - 30 µM aufzeigte [Schaefer et al., 2006; Schäfer, 2006], konnte in den Untersuchungen dieser Dissertation keine signifikante Änderung des ROS-Levels durch AT klar/trüb (44,9 µM CGA in 100µg/ml AS trüb) detektiert werden. Eine mögliche Erklärung könnten antagonistische Effekte weiterer Extraktinhaltsstoffe sein. Ergänzend dazu könnte die Abwesenheit von Procyanidinen in AS klar/trüb, möglicherweise durch Unterschiede in der Extraktaufarbeitung oder des verwendeten Ausgangsmaterials, ebenfalls zum Ausbleiben einer antioxidativen Wirkung beitragen. Für Procyanidine wurde neben einer Reduktion intrazellulärer ROS im DCF-Assay auch eine potente Wirkung als Radikalfänger im ORAC-Assay beobachtet [Zessner et al., 2008; Bellion et al., 2010].

Trotz der Diskrepanz zu bereits publizierten Studien bestätigen die Transkriptionsergebnisse dieser Forschungsarbeit die Unwirksamkeit der Apfelsaftextrakte im DCF-Assay. Nach 24 h Inkubation wurde weder für AS klar, noch für AS trüb eine Änderung des GCL-C Transkriptlevel beobachtet. Diese Beobachtungen werden durch zwei Interventionsstudien mit Apfelsaft an Ratten unterstützt, die eine Induktion verschiedener Nrf2-abhängiger Gene beobachteten, jedoch der relative GCL-C Transkriptlevel keine Veränderung erfuhr [Barth et al., 2007; Soyalan et al., 2011]. Ob und inwieweit andere Gene als die GCL-C durch AS klar/trüb moduliert werden wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Demnach scheinen die Inhaltsstoffe von AS klar/trüb nach 24 h in den *in vitro* Untersuchungen dieser Dissertation

weder eine direkte ROS-abfangende Wirkung zu besitzen, noch eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität durch eine GCL-C Induktion zu bewirken.

Im Unterschied zu den getesteten Apfelsaftextrakten erwies sich der Apfeltrestereextrakt AT 9 bei 250 µg/ml als potent bezüglich einer Verringerung intrazellulärer ROS auf maximal $70,0 \pm 5,8$ % der Menadion-Kontrolle (Abbildung 40). Weiterhin ließ AT 9 bereits ab 50 µg/ml eine signifikante Zunahme der GCL-C Transkripte erkennen, die bei 250 µg/ml eine maximale Induktion von $4,2 \pm 0,4$ erreichte (Abbildung 41). Gegenüber AT 4 erwies sich AT 9 in den DCF-Untersuchungen als weniger potent, wobei die großen Unterschiede in der mitgeführten endogenen Kontrolle beachtet werden müssen. In den nachfolgenden Transkriptionsuntersuchungen zeigten sich beide Extrakte als äquipotent hinsichtlich einer Induktion der GCL-C Transkripte.

Diese Ergebnisse der Trestereextrakte stehen im Einklang mit entsprechenden Untersuchungen in HT29- und Caco2-Zellen, die ebenfalls eine Verringerung intrazellulärer ROS bzw. oxidativen Schädigungen der Mitochondrien nach 24 h Inkubation beobachteten [Schaefer et al., 2006; Carrasco-Pozo et al., 2010]. In der Literatur wurden für Apfeltrestereextrakte keine Hinweise zur Induktion von Enzymen, die mit einem antioxidativen Potential in Verbindung gebracht werden gefunden. Dennoch lässt sich auf Basis der Untersuchungen dieser Dissertation eine deutliche Tendenz erkennen, dass unter den hier eingesetzten Extrakten die Trestereextrakte eine potentere antioxidative Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS besitzen, und darüber hinaus zu einer signifikant höheren Induktion der GCL-C führen als analog hergestellte Extrakte aus trübem oder klarem Apfelsaft. Ergänzend dazu kann gesagt werden, dass durch Verwendung eines apolaren Adsorberharzes (Amberlite® XAD-16 HP) während der Herstellung von AT 4 eine vergleichbare Bioaktivität in den Zellassays beobachtet wurde wie bei AT 9, bei dem ein polares Adsorberharz zum Einsatz kam. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde AT 4 für die nähere Charakterisierung der Bioaktivität gewählt.

Zur Beantwortung der Frage inwiefern es zu einer Reduktion des zellulären ROS-Levels kam wurden vorausgegangene Untersuchungen einer Kurzzeitinkubation von AT 4 herangezogen [Dissertation Roth, 2010]. Für AT 4 konnte nach 3 h Inkubation eine Verringerung des endogenen ROS-Levels von HT29-Zellen, die nicht mit Menadion nachbehandelt wurden, beobachtet werden. Das bedeutet, dass bis zu einer Behandlungszeit von 3 h nach der Inku-

bation keine prooxidative Wirkung des AT 4 erkennbar war. Ergänzend dazu beobachteten Schäfer et al. [2006] nach Behandlung von HT29-Zellen mit Apfelsaftextrakten für 2 h keine Verringerung des tBH-induzierten ROS-Levels, wohingegen eine 24 h Inkubation signifikant den intrazellulären ROS-Level reduzierte. Auf Basis der Annahme, dass Polyphenole selbst radikalabfangende Eigenschaften besitzen könnte postuliert werden, dass die Verringerung des ROS-Levels nach einer Kurzzeitinkubation (2 - 3 h) auf einer direkten antioxidativen Wirkung der Polyphenole beruht. Diese scheint jedoch nicht so stark ausgeprägt zu sein, da nach einer Induktion von ROS keine Änderung des Redoxlevels mehr zu beobachten war [Schaefer et al., 2006]. Demnach könnte nach einer Langzeitinkubation (24 h) der zelleigenen antioxidativen Antwort eine bedeutende Rolle zukommen, die folglich eine Abnahme des ROS-Levels bedingt.

Um dies zu verifizieren wurde AT 4 hinsichtlich einer Modulation des Nrf2-ARE Signalwegs untersucht, der maßgeblich an der Regulation einer Vielzahl von Genen der antioxidativen Abwehr der Zelle einnimmt [Kensler et al., 2007]. Hierbei wurde durch AT 4 nach 24 h Inkubation eine potente Aktivierung von Nrf2 in transient transfizierten CHO Zellen beobachtet (Abbildung 42) [persönliche Mitteilung, Elke Heiss]. Diese Ergebnisse sprechen für eine Induktion der GCL-C, die möglicherweise über eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs vermittelt wird. Um dieser Vermutung weiter nachzugehen wurden neben der GCL-C weitere Nrf2-abhängige Gene auf eine Änderung ihrer Transkription untersucht. Hierbei erwies sich AT 4 als potenter Induktor der HO1, GCL-M und NQO1 bereits ab 100 µg/ml (Abbildung 43). Für Apfelsaftextrakte ist *in vitro* bereits eine Induktion verschiedener GST- und UGT-Isoenzyme beschrieben [Veeriah et al., 2006; Veeriah et al., 2008]. Darüber hinaus konnte für Quercetin in verschiedenen *in vitro* Modellen sowohl eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs, als auch die Induktion Nrf2-abhängiger Enzyme nachgewiesen werden, was die Rolle von Quercetin als bioaktive Komponente weiter bestärkt [Scharf et al., 2003; Yao et al., 2007].

Um einen direkten Vergleich zu ziehen, ob die identifizierten Leitverbindungen einen maßgebenden Beitrag zur Gesamtaktivität des AT 4 unter analogen Zellkulturbedingungen leisten, wurden Quercetin, Phloridzin und Phloretin im weiteren Verlauf der Dissertation auf eine Änderung des ROS-induzierten Redoxlevels und auf eine Transkriptionsänderung der GCL-C und HO1 untersucht. Quercetin zeigte sich in Übereinstimmung mit bereits publi-

zierten Studien in HT29- und Caco2-Zellen ab 50 μM als potent, gemäß einer Reduktion intrazellulärer ROS nach 24 h Inkubation (Abbildung 44) [Schaefer et al., 2006; Bellion et al., 2008]. In den Transkriptionsanalysen wurde ab 250 μM Quercetin eine teilweise signifikante Induktion der GCL-C ($2,8 \pm 0,9$) und HO1 ($3,6 \pm 1,9$) ersichtlich (Abbildung 45 und Abbildung 46). In der Literatur wurde eine Induktion der GCL Transkripte und HO1 Expression durch Quercetin teilweise auf eine MAPK/Nrf2 Transaktivierung zurückgeführt [Chow et al., 2005; Tanigawa et al., 2007; Lavoie et al., 2009]. Da jedoch die Konzentration, in der Quercetin in AT 4 vorliegt, außerhalb von dessen Effektkonzentration liegt und selbst sehr hohe Konzentrationen von Quercetin von 250 μM die Wirkstärke des AT 4 nicht überstiegen liegt der Schluss nahe, dass die Wirkung des komplexen AT 4 nicht allein durch Quercetin erklärt werden kann.

Die Dihydrochalkone Phloridzin und Phloretin erwiesen sich entsprechend einer Verringerung des zellulären ROS-Levels als weitestgehend unwirksam (Abbildung 44). Lediglich ab 250 μM konnte für beide Verbindungen eine marginale Verringerung des Menadion-induzierten ROS-Levels detektiert werden. Obgleich sich die Verringerung des Redoxlevels bei 250 μM Phloridzin und Phloretin als signifikant erwies scheint der Effekt, aufgrund der geringen Senkung intrazellulärer ROS, von geringer biologischer Relevanz zu sein. Phloridzin zeigte nachfolgend keine Änderung der mRNA-Transkripte für beide untersuchten Enzyme. Das Aglykon Phloretin ließ hingegen ab 250 μM eine signifikante Erhöhung der Transkriptlevel der GCL-C ($2,5 \pm 0,5$) und HO1 ($2,9 \pm 0,8$) erkennen (Abbildung 45 und Abbildung 46). Da für Phloridzin in der Literatur keine Hinweise auf ein antioxidatives Potential gefunden wurde ist, unter Bezugnahme der Analysendaten dieser Dissertation, davon auszugehen, dass der Hauptinhaltsstoff keinen Beitrag zur Gesamtwirkung des AT 4 leistet [Schaefer et al., 2006]. Für das Aglykon Phloretin hingegen konnte im Unterschied zu dieser Dissertation in einem tBH-induzierten DCF-Assay in HT29- und Caco2-Zellen eine signifikante Verringerung des zellulären ROS-Levels gezeigt werden. Dies ist möglicherweise auf Unterschiede in der ROS-Induktion der Studien (tBH bzw. Menadion) zurückzuführen. Darüber hinaus wurde Phloretin nach 6 h und 24 h auf eine Änderung der GCL-C Transkripte untersucht, während bis 30 μM in Übereinstimmung mit den Experimenten dieser Dissertation keine Änderung der mRNA-Levels detektiert wurde [Soyalan, 2010]. Dies spricht für die beobachtete Enzyminduktion in hohen Konzentrationen (250 μM), in denen gleichzeitig eine

marginale Reduktion intrazellulärer ROS detektiert wurde. Es ist anzunehmen, dass Phloretin aufgrund des geringen Anteils in den getesteten Extraktkonzentrationen des AT 4 im Hinblick auf ein antioxidatives Potential eine untergeordnete Rolle zukommt. Von Interesse ist Phloretin vor allem, da es durch Deglykosylierung ein Abbauprodukt von Phloridzin darstellt [Blaut et al., 2003]. So könnten aufgrund des hohen Phloridzinanteils durch die Anwesenheit bakterieller β -Glykosidasen beachtliche Mengen Phloretin entstehen und nachfolgend einen Beitrag zur antioxidativen Wirkung von AT 4 leisten.

Da die Leitverbindungen nicht bzw. nur für einen sehr geringen Anteil der beobachteten Effekte des AT 4 verantwortlich sind wurde zur weiteren Identifizierung wertgebender Komponenten eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt. Die Subfraktionierung des AT 4 erfolgte am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim (AG Prof. Carle) unter Verwendung eines Sephadex LH-20 Adsorberpolymers und Elution mit Methanol-Wasser-Gemischen. Die 17 erhaltenen Subfraktionen (A - Q) wurden mittels HPLC-MSⁿ analysiert, wobei in den Subfraktionen E - H und O - Q keine bekannten Inhaltsstoffe identifiziert werden konnten (Tabelle 6). Die Ergebnisse der Subfraktionen im Hinblick auf eine antioxidative Wirkung im DCF-Assay, sowie die Transkriptionsanalysen der GCL-C und HO1 sind in Tabelle 11 einander gegenübergestellt.

Die Subfraktionen A - D wurden nicht in die Transkriptionsuntersuchungen mit einbezogen, da sie keine Änderung des Menadion-induzierten ROS-Levels nach 24 h Inkubation erkennen ließen. Als Hauptbestandteile von A - D wurden Phloridzin, Phloretin, Phloretin-2'-xyloglukosid, Quercetinglykoside und eine unbekannte Substanz mit der molaren Masse von 470 g/mol identifiziert. Ein wesentlicher Beitrag der Dihydrochalkone Phloridzin und Phloretin an der Gesamtwirkung von AT 4 konnte durch Untersuchungen der Einzelverbindungen bereits ausgeschlossen werden (Abbildung 44, Abbildung 45 und Abbildung 46). Fraktion A, die durch hohe Gehalte an Phloretin-2'-xyloglukosid charakterisiert ist, zeigte sich ebenso unwirksam wie die quercetinglykosidreichen Fraktionen C und D oder Fraktion G, in der keine bekannten phenolischen Verbindungen identifiziert werden konnten (Abbildung 47 und Abbildung 48). Möglicherweise ist die Unwirksamkeit der Quercetinglykoside in einer geringen Bioverfügbarkeit im Vergleich zum Aglykon begründet [Boyer et al., 2004]. Auch die unbekannte Substanz mit der Molmasse 470 g/mol der Fraktionen C und D schien ebenfalls keine ROS-modulierende Wirkung zu besitzen.

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Modulation der Transkription der GCL-C und des Menadion-induzierten intrazellulären ROS-Levels durch die Subfraktionen des AT 4. Transkriptionserhöhung: < 2 -, ≥ 2 ↑, ≥ 4 ↑↑, ≥ 6 ↑↑↑; Verringerung Menadion-induzierter ROS: > 80 % -, ≤ 80 % ↑, ≤ 70 % ↑↑, ≤ 60 % ↑↑↑.

Subfraktion	GCL-C	HO1	DCF
E	-	-	↑
F	↑	↑	↑↑↑
H	-	-	-
I	-	-	↑
J	-	↑↑↑	↑↑
K	↑↑	↑↑	↑↑↑
L	↑↑	↑↑	↑
M	↑	↑	↑↑
N	↑	-	↑
O	↑↑	↑	-
P	↑↑↑	↑↑	-
Q	↑	↑	↑

Die Subfraktionen E, F und H zeigten eine signifikante Verringerung des Menadion-induzierten ROS-Levels bei 100 µg/ml (Abbildung 48). Für E und H war hingegen keine Änderung des Transkriptlevels der GCL-C und HO1 erkennbar, wohingegen F bei 100 µg/ml eine signifikante Zunahme um etwa das Zweifache der Kontrolle beider untersuchter Enzyme erkennen ließ (Abbildung 51). Mit einem Anteil ≤ 1 % nehmen die Subfraktionen nur einen sehr geringen Teil des AT 4 ein, sodass ein wesentlicher Beitrag von E, F und H in extraktrelevanten Konzentrationen vernachlässigbar erscheint. Weiterhin konnten in diesen Subfraktionen keine bekannten Verbindungen identifiziert werden, was eine Zuordnung substanzspezifischer Effekte nicht ermöglichte.

In nachfolgenden Untersuchungen der Subfraktionen I, J, K und L wurde eine signifikante Verringerung des intrazellulären ROS Levels bei 100 µg/ml beobachtet (Abbildung 49). Während für I und J keine Zunahme der GCL-C und HO1 Transkripte beobachtet wurde, zeigten K und L eine signifikante Induktion der Enzyme um einen Faktor > 2 (Abbildung 52 und Abbildung 53). Zu den Hauptkomponenten dieser Subfraktionen zählen Phloretin, Phlorid-

zin und verschiedene Quercetinglykoside (Tabelle 4). Für alle drei genannten Inhaltsstoffe konnte jedoch ein substanzieller Beitrag zur Gesamtwirkung bereits ausgeschlossen werden. Aufgrund dessen wurden die bisher nicht identifizierten Inhaltsstoffe näher betrachtet, von denen lediglich die Molmassen ermittelt werden konnten (Tabelle 7).

Die Subfraktionen K und L enthalten beide eine Verbindung der Masse 470 g/mol. Sollte es sich hierbei um dieselbe Komponente handeln wie in Subfraktion C und D, wäre deren Beitrag zur antioxidativen Wirkung des AT 4 auszuschließen. Die Komponente mit der molaren Masse 308 g/mol, dessen UV-Spektrum eine große Ähnlichkeit mit Naringin erkennen ließ, ist in nennenswerten Konzentrationen in den Subfraktionen J, K und L enthalten [persönliche Mitteilung, Matthias Fromm]. Naringin selbst kommt jedoch nicht in Frage, da dessen Molmasse mit 580,54 g/mol zu hoch ist. Dennoch zeigten die drei Subfraktionen in Abhängigkeit von ihrem Gehalt der unbekannten Substanz mit 308 g/mol eine potente Effektivität in den untersuchten Testsystemen. Aus diesem Grund wäre es interessant in Folgeuntersuchungen diese Verbindung weiter zu charakterisieren, sowie mittels geeigneter Fraktionierungstechniken abzutrennen und isoliert in den Testsystemen einzusetzen.

Eine Korrelation zwischen der antioxidativen Wirkung und einer Induktion der untersuchten Enzyme konnte ebenfalls bei den quercetinreichen Fraktionen M und N beobachtet werden (Abbildung 50 und Abbildung 53). Beide Fraktionen verringerten signifikant den Menadion-induzierten ROS-Level bei gleichzeitiger Induktion der Transkripte für GCL-C und HO1. Im Gegensatz zur Subfraktion N konnte bei M die Bioaktivität auf dessen Hauptinhaltsstoff Quercetin zurückgeführt werden. Die Subfraktion N enthält ebenfalls Quercetin und eine Verbindung mit der Molmasse 336 g/mol, dessen MS-Fragmentierungsmuster auf ein Quercetinderivat hindeutet. Die Konzentration, in denen Quercetin in der Subfraktion vorliegt ist jedoch zu gering um die antioxidative Wirkung bzw. die detektierte Enzyminduktion zu erklären. Demnach scheinen weitere, bisher nicht identifizierte Inhaltsstoffe für die beobachtete Wirkung von N verantwortlich zu sein. Ob und wie weit das Quercetinderivat an der potenten Wirkung beteiligt ist, konnte nicht geklärt werden.

Inkubationen der Subfraktionen O, P und Q führten ebenfalls zu einer Verringerung des intrazellulären ROS-Levels, sowie zu einer Erhöhung der relativen mRNA-Level der Enzyme GCL-C und HO1 (Abbildung 50 und Abbildung 54). Vor allem P erwies sich als potent hinsichtlich einer Transkriptionserhöhung beider Enzyme, obgleich im DCF-Assay die Subfrak-

tion eine eher geringe ROS-senkende Eigenschaft aufzeigte. Dies legte den Schluss nahe, dass die Induktion der beobachteten Enzyme möglicherweise nur einen geringen Einfluss auf die ROS-senkende Eigenschaft der Extrakte besitzt. Demnach müssten weitere, bisher nicht identifizierte Enzyme für die ROS-modulierende Wirkung verantwortlich sein, oder eine direkte ROS-abfangende Eigenschaft der Inhaltsstoffe zum Tragen kommen. Obwohl keine bekannten Inhaltsstoffe in den Subfraktionen O, P und Q identifiziert wurden ist ein Beitrag zur Gesamtwirkung des Extrakts, aufgrund der potenten Induktion in den Transkriptionsanalysen, denkbar.

Die Ergebnisse der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung lassen den Rückschluss zu, dass neben Quercetin und Phloretin weitere bioaktive Inhaltsstoffe in den Extrakten enthalten sein müssen, die einen Teilbeitrag zur Gesamtwirkung leisten. Hierbei kommen einerseits Inhaltsstoffe in Frage, die natürlicherweise in Äpfel enthalten sind. Andererseits kann es während der Tresterprozessierung zu einer Neubildung und Anreicherung bioaktiver Verbindungen kommen. Für Phloridzin, Phloretin-2'-xyloglukosid und die Quercetinglykoside konnte eine Wirksamkeit in den untersuchten Testsystemen in extraktrelevanten Konzentrationen ausgeschlossen werden. In einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung von Zessner et al. [2008] wurde neben Quercetin das 3-Hydroxyphloretin und gewisse Aromakomponenten des Apfels identifiziert, die eine Erhöhung der Nrf2-vermittelten NQO1 Transkription bewirkten. Diese wurden in Folgeuntersuchungen als 3-Hydroxy- β -damascon und Di-(2-ethylhexyl)-phtalat identifiziert [Gerhäuser et al., 2009]. Hydroxyphloridzin ist zu 0,79 % in AT 4 enthalten, wobei nicht abgeschätzt werden kann ob diese Menge einen Einfluss auf Gesamtaktivität besitzt. Die Anwesenheit der flüchtigen Aromakomponenten 3-Hydroxy- β -damascon in AT 4 konnte jedoch ausgeschlossen werden, da nach der Apfelsaftherstellung der Naßtrester durch Trocknungsvorgänge hoch erhitzt wird und dadurch eine starke Abreicherung dieser Verbindungen stattfindet [persönliche Mitteilung, Matthias Fromm].

Um im weiteren Verlauf der Dissertation die erarbeiteten Struktur-Aktivitätsdaten zu verifizieren, wurde gezielt eine rekonstituierte Mischung aller bekannten Inhaltsstoffe des AT 4 (Tabelle 4) hergestellt um potentielle überadditive/synergistische oder antagonistische Wirkungen der Komponenten mitzuerfassen. Entgegen aller Erwartungen zeigte der rekonstituierte Extrakt mit steigender Konzentration bis 250 $\mu\text{g/ml}$ lediglich eine leichte Tendenz bezüglich einer ROS-senkenden Eigenschaft, die sich als nicht signifikant erwies (Abbildung

56). Auch in den Transkriptionsanalysen veränderte sich der relative Transkriptlevel der GCL-C und HO1 nach 24 h Inkubation nicht (Abbildung 57). Die Ergebnisse des rekonstituierten Extrakts bestätigten dahingehend die Untersuchungen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung, dass die beobachteten biologischen Effekte von AT 4 nur zu einem sehr geringen Teil auf eine ROS-verringende Wirkung bekannter Extraktinhaltsstoffe zurückgeführt werden kann. Inhaltsstoffe die bereits eine Erhöhung der Transkription erkennen ließen scheinen demnach, in Konzentrationen wie sie in bis zu 250 µg/ml AT 4 enthalten sind, weder isoliert noch in einer in dieser Arbeit gewählten Kombination mit anderen Extraktinhaltsstoffen eine Wirkung zu besitzen. Zur weiteren Charakterisierung der Bioaktivität des AT 4 ist demnach eine Identifizierung der bisher unbekannten Komponenten erforderlich.

Mit dem Ziel der näheren Übertragbarkeit bisher gewonnener Ergebnisse auf die *in vivo* Situation wurde der Frage nachgegangen, inwiefern Veränderungen des AT 4 während der gastrointestinalen Passage einen Einfluss auf dessen Bioaktivität besitzen. Anhand eines verdauungsmimetischen Ansatzes, der die Bereiche Mund, Magen, Dünndarm und Dickdarm den *in vivo* Bedingungen angepasst simuliert, wurden verschiedene Fermentationsüberstände (Dünndarm 6 h, Kolon 1 - 24 h) generiert (Abbildung 58). Diese wurden im Folgenden auf eine Änderung des zellulären ROS- und Transkriptionslevels der GCL-C und HO1 untersucht. Als weitere Endpunkte einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Zelle sollten darüber hinaus eine Änderung des tGSH-Status, sowie eine DNA-protektive Wirkung im Comet-Assay erfasst werden.

Nach 24 h Behandlung von HT29-Zellen wurde für alle Fermentationsüberstände eine konzentrationsabhängige Verringerung des Menadion-induzierten ROS-Levels verzeichnet, wobei im Vergleich zu unfermentiertem AT 4 die beobachteten Effekte weniger potent ausfielen (Abbildung 59). Auffällig war vor allem ein Aktivitätsverlust nach 6 h Dünndarmsimulation gegenüber AT 4, wobei die Fermentationsüberstände entsprechend 1 - 3 h Kolonfermentation einen Wiederanstieg der antioxidativen Wirkung aufzeigten. Der Verlust der biologischen Wirkung wurde auf potentielle Diffusionsprozesse während der Verweildauer im Dialyseherschlauch und auf einen möglichen Zerfall relevanter Inhaltsstoffe zurückgeführt. Die Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Zelle von Dünndarm 6 h bis Kolon 1 h könnte in einer Bildung neuer Komponenten mit erhöhtem Wirkpotential begründet sein, möglicherweise unter Beteiligung bakterieller β -Glykosidasen [Schneider et al., 1999; Aura et al., 2002; Chow

et al., 2005]. So wäre eine Freisetzung von Phloretin und Quercetin aus entsprechenden Glykosiden denkbar, die beide, den Ergebnissen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung nach zu urteilen, ein potenteres Wirkpotential besitzen als ihre Glykoside.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des antioxidativen DCF-Assays erwiesen sich alle Fermentationsüberstände als potent im Sinne einer Erhöhung der Transkripte für GCL-C (Abbildung 60). Für das Enzym HO1 wurde ebenfalls eine signifikante Induktion um den Faktor 2 beobachtet, die aber nur bei einer Konzentration der Fermentationsüberstände von 250 µg/ml relativ zur Kontrolle ersichtlich war. In der Literatur konnten keine Daten mit vergleichbaren Fermentationsüberständen zur aktuellen Fragestellung gefunden werden, jedoch wurde für die Abbauprodukte von Phloridzin, Phloretin und Quercetin eine Induktion Nrf2-regulierter Gene beschrieben, die in zukünftigen Arbeiten auf eine Induktion der GCL-C und HO1 untersucht werden sollten [Kirlin et al., 1999; Kang et al., 2006; Miene et al., 2011].

In vorangegangenen Untersuchungen konnte für AT 4 nach 24 h Inkubation eine signifikante Erhöhung des GSH-Levels beobachtet werden [Dissertation Roth, 2010]. Zur weiteren Überprüfung, ob die Erhöhung der GCL-C Transkripte durch Fermentationsüberstände mit einer gesteigerten GSH-Biosynthese einhergeht wurden sie auf eine Änderung des tGSH-Status hin untersucht. Hierbei wurde für alle untersuchten Fermentationsüberstände einer gesteigerte GSH Biosynthese verzeichnet, wobei sich analog zu den DCF-Assay Untersuchungen die Kolonsimulationen gegenüber der Dünndarmsimulation als etwas potenter darstellte (Abbildung 62). Diese Ergebnisse werden durch zahlreiche Studien bestätigt, die ebenfalls eine Beeinflussung von GSH oder Enzymen der Glutathionhomöostase mit fermentierten Apfelsaftproben und/oder deren Abbauprodukten beobachteten [Treptow-van Lishaut et al., 1999; Moridani et al., 2001; Bellion et al., 2008].

Als ein weiterer Endpunkt zur Bestimmung eines antioxidativen Potentials der Fermentationsüberstände wurde der protektive Comet-Assay herangezogen, der eine Aussage über das DNA-protektive Potential einer Testsubstanz erlaubt. In Untersuchungen innerhalb des Projekts konnte in HT29-Zellen eine DNA-protektive Wirkung durch AT 4 nach 24 h Inkubation und ROS-Induktion durch Menadion gezeigt werden [Dissertation Roth, 2010]. Nach 6 h Dünndarmsimulation des AT 4 wurde ebenfalls eine DNA-protektive Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS beobachtet, die sich in einem konzentrationsabhängigen Ver-

hältnis darstellte (Abbildung 63). Mit steigender Fermentationsdauer konnte keine Verringerung der DNA schädigenden Wirkung mehr detektiert werden (Abbildung 64). Ob der Verlust der protektiven Wirkung auf Degradationsprozesse der Inhaltsstoffe oder störende Matrixeffekte der humanen Fäzessuspension zurückzuführen ist konnte nicht eindeutig geklärt werden. Festzuhalten bleibt jedoch, dass die Tresterextrakte in einem kurzen Zeitfenster nach Erreichen des Kolons eine protektive Wirkung gegenüber DNA-schädigenden Agenzien wie ROS ausüben könnten, wie es die Ergebnisse der 6 h Dünndarmsimulation darlegten. Generell lassen die Ergebnisse der *in vitro* Fermentation den Rückschluss zu, dass nach Durchschreiten der gastrointestinalen Passage die Bioaktivität des AT 4 erhalten bleibt, obgleich sie im Vergleich zum unfermentierten Extrakt signifikant geringer ist.

Eine Relevanz bereits publizierter *in vitro* Studien im Hinblick auf eine *in vivo* Übertragbarkeit wird mehrfach kontrovers diskutiert. Häufig kommen in Zellkulturuntersuchungen hohe Dosen der Testsubstanzen zum Einsatz, die unter normalen ernährungsphysiologischen Bedingungen nie am Wirkort erzielt werden können. Obgleich Polyphenole nach oraler Aufnahme in geringem Maße im Blut nachgewiesen werden konnten, bleibt eine systemische Wirkung der Komponenten aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit fraglich, da möglicherweise die Konzentrationen am Zielort zu gering sind. Im Falle der Polyphenole wird deshalb häufig der Kolon als potentiell Zielorgan diskutiert, da aufgrund einer geringen Absorption der Komponenten im Dünndarm und der hohen Verweildauer im Kolon eine präventive Wirkung möglich wäre.

Offen bleibt jedoch die Frage, in welchem Maße Polyphenole aus der Nahrung nach der gastrointestinalen Passage in den Kolon gelangen, da das im Rahmen dieser Dissertation eingesetzte gastromimetische Modell potentielle Resorptionsvorgänge im Magen nicht, und im Dünndarm nur anhand einfacher Diffusion durch die Dialysemembran erfasste. Anhand humaner Interventionsstudien mit Ileostomapatienten untersuchten Kahle et al. [2005b; 2006] wieviel Polyphenole nach dem Verzehr von Apfelsaft unter normalen Bedingungen den Kolon erreichen. Nach dem Verzehr von 1 l naturtrübem Apfelsaft, der einen Gesamtpolyphenolgehalt von 407,0 mg/l aufwies konnten davon noch 14 % in der ilealen Flüssigkeit wiedergefunden werden [Kahle et al., 2006]. Die Polyphenolkonzentration des AT 4 beträgt 542 mg/g, so dass beispielsweise nach dem Verzehr von 1,5 g Extrakt, unter Berücksichtigung der Wiederfindung oben genannter Studie effektive Wirkkonzentrationen der Inhalts-

stoffe, wie sie in den Untersuchungen dieser Arbeit beobachtet wurden, im Kolon erreicht werden könnten.

Abschließend betrachtet konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Extrakte aus entpektinisiertem Apfeltrester *in vitro* zu einer Erhöhung der intrazellulären antioxidativen Kapazität führten. Hierbei erwiesen sich die Apfeltresterextrakte im Vergleich zu analog hergestellten Extrakten aus Apfelsaft als potenter hinsichtlich einer protektiven Wirkung gegenüber Menadion-induzierten ROS, sowie der Induktion der GCL-C Transkripte. Neben einer Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs durch Apfeltresterextrakte konnte eine Induktion der Nrf2-regulierten Gene GCL-M, HO1 und NQO1 beobachtet werden. Diese Enzyme werden in der Literatur mit einer Verringerung intrazellulärer redox-aktiver Komponenten in Verbindung gebracht [Jaiswal, 2004]. Im Zuge der Identifizierung bioaktiver Komponenten des komplexen Extrakts mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierung konnte herausgearbeitet werden, dass weder die Leitverbindungen Phloridzin, Phloretin und Quercetin noch die übrigen bekannten Inhaltsstoffe sowohl einzeln, als auch in Kombination miteinander, einen substanziellen Beitrag zur Gesamtaktivität des AT 4 leisten. Demzufolge scheinen bisher nicht identifizierte Inhaltsstoffe für den Hauptteil der Wirkung verantwortlich zu sein. Eine Identifizierung und Charakterisierung dieser Komponenten gilt es in Folgeuntersuchungen zu realisieren.

Durch den Einsatz einer Methode zur Simulation der gastrointestinalen Passage konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Tresterextrakts nach Durchschreiten von Mund, Magen und Dünndarm im Vergleich zum nicht-fermentierten Extrakt geringer ist, jedoch nicht verloren geht. Hierbei scheint insbesondere der bakteriellen β -Glukosidasen eine bedeutende Rolle zuzukommen, die eine Spaltung der Polyphenolglykoside in ihre entsprechenden Aglyka katalysieren. Diese ließen in den Untersuchungen dieser Dissertation eine erhöhte Aktivität in den Testsystemen erkennen. Offen blieb jedoch die Frage, inwieweit es zu einem Abbau der Inhaltsstoffe und einer Bildung neuer Inhaltsstoffe kommt. Neben einer Verringerung intrazellulärer ROS und der Induktion der GCL-C und HO1 konnte durch die Fermentationsüberstände ebenfalls eine Steigerung der Glutathionbiosynthese, sowie eine protektive Wirkung gegenüber Menadion-induzierten DNA-Schäden beobachtet werden. Eine Beteiligung von Abbauprodukten wurde bisher nur anhand von Literaturdaten diskutiert. Des-

halb sollten in zukünftigen Untersuchungen die Fermentationsüberstände auf Degradationsprozesse analysiert werden und gegebenenfalls entstandene Inhaltsstoffe in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Die Ergebnisse der Dissertation geben erste Hinweise auf ein protektives Potential der Apfel-tresterextrakte gegenüber oxidativem Stress. Darüber hinaus dienen die Studien als Grundlage für aufbauende Untersuchungen zur Verifizierung der Ergebnisse auf *in vivo* Ebene um das chemopräventive Potential der Substanzen besser einordnen zu können. Ferner eröffnen die Ergebnisse dieser Dissertation eine zusätzliche Wertschöpfung polyphenolreicher Extrakte aus Nebenprodukten der Apfelsaftherstellung bzw. der Pektinproduktion in angereicherten bzw. funktionellen Lebensmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln.

5 Zusammenfassung

Im Fokus des ersten Abschnitts der Dissertation stand die Beeinflussung der Promotormethylierung des Tumorsuppressors p16^{INK4a} durch einen polyphenolreichen Apfelsaftextrakt (BAE) und dessen Hauptinhaltsstoff CGA in Zellkulturexperimenten. Ferner wurde der Frage nachgegangen, ob eine Hypermethylierung von p16^{INK4a} in Typ-II Diabetes Patienten eine Rolle spielt und der Konsum von Apfelsaft zu einer Beeinflussung der Promotormethylierung führt.

Da die Zellteilungsrate einen erheblichen Einfluss auf das demethylierende Potential einer Verbindung besitzt wurden die Testsubstanzen zunächst auf eine Änderung der Proliferation untersucht. Hierbei zeigte eine 48 h und 96 h Inkubation in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 bis 100 µg/ml BAE und 100 µM CGA keine Änderung des relativen Zellwachstums im SRB-Assay. Ab 250 µg/ml BAE konnte nach 48 h Inkubation eine leichte Verringerung des Zellwachstums beobachtet werden, die nach 96 h Inkubation ihr Maximum erreichte. Um experimentelle Artefakte aufgrund einer Änderung der Zellteilungsrate zu vermeiden wurden die Testsubstanzen in nachfolgenden Assays bis 100 µg/ml BAE und 100 µM CGA eingesetzt.

Der Apfelsaftextrakt BAE ließ nach 48 h und 96 h eine Abnahme der p16^{INK4a} Promotormethylierung bei 20 µg/ml erkennen. Für CGA konnten nach 48 h bei 50 µM und nach 96 h bei 0,5 und 100 µM demethylierende Effekte beobachtet werden, wobei beachtet werden muss, dass die Ergebnisse großen Schwankungen unterliegen. Beide Substanzen ließen weder eine Konzentrationsabhängigkeit oder einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Inkubationszeiten erkennen. Die Demethylierung des Promotors hatte jedoch für keine der beiden Testsubstanzen einen Einfluss auf die Reaktivierung des Tumorsuppressors, weder auf Transkript- noch auf Proteinebene. Es wird davon ausgegangen, dass die Inkubationszeiten zu kurz gewählt wurden um entsprechende Effekte auf DNA-Ebene zu erhalten, die nachfolgend eine Änderung des mRNA- und Proteinlevels bedingen. Anhand der erhaltenen Ergebnisse von BAE und CGA erscheint eine protektive Wirkung im Hinblick auf eine Reaktivierung hypermethylierter Gene fraglich.

Im Rahmen einer Pilotstudie an Typ-II Diabetes Patienten konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung von p16^{INK4a} in abgeschilferten Kolonozyten aus Humanfäzes vermutlich eine untergeordnete Rolle einnimmt. Bei 2 von 15 Probanden wurde eine methylierte Promotorregion des Tumorsuppressors detektiert, wobei nach vierwöchiger Intervention mit Apfelsaft bei diesen Probanden ein Rückgang der Promotormethylierung verzeichnet wurde. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise, dass ein Langzeitkonsum von Apfelsaft über vier Wochen einen Einfluss auf die DNA-Methylierung besitzen kann.

Der Schwerpunkt des zweiten Abschnitts dieser Dissertation beschäftigte sich mit der Frage, inwiefern polyphenolreiche Apfelextrakte aus entpektinisiertem Trester den intrazellulären Redoxstatus von HT29-Zellen beeinflussen. In Vorarbeiten innerhalb des Projekts wurde mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (apolares Adsorberpolymer) und Extraktion mit Ethylacetat ein Tresterextrakt generiert, der *in vitro* ein potentes antioxidatives Potential aufwies [Dissertation Roth, 2010]. Im Vergleich dazu wurden in dieser Dissertation ein weiterer Apfeltresterextrakt (AT 9), der unter Verwendung eines polaren Adsorberharzes gewonnen wurde, sowie zwei Extrakte aus klarem und trübem Apfelsaft in die Untersuchungen mit einbezogen. Beide Apfelsaftextrakte zeigten nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen keine antioxidative Wirkung im Menadion-induzierten DCF-Assay und keine Änderung der relativen Transkriptmenge für GCL-C. Das Enzym GCL-C stellt ein Schlüsselenzym der Glutathionbiosynthese dar und hat sich in vorausgegangenen Untersuchungen als potenzieller Biomarker im Hinblick auf eine Erhöhung des zellulären GSH-Levels erwiesen. Der Tresterextrakt AT 9 ließ hingegen eine potente Verringerung intrazellulärer ROS nach 24 h Inkubation beobachten. Darüber hinaus konnte ab 50 µg/ml eine signifikante Induktion der GCL-C Transkripte verzeichnet werden. Gegenüber AT 4 erwies sich der Tresterextrakt AT 9 sowohl in der Verringerung intrazellulärer ROS, als auch in den Transkriptionsuntersuchungen als gleich potent. Lediglich in der höchsten Konzentration zeigte AT 4 in den untersuchten Testsystemen eine marginal höhere Wirkung. Anhand der erzielten Ergebnisse konnte eine deutliche Tendenz erkannt werden, dass unter den untersuchten Extrakten die Tresterextrakte eine potentere Bioaktivität besitzen. Infolgedessen wurde für die weitere Charakterisierung der Wirkqualität AT 4 herangezogen.

Um zu verifizieren, ob die Nrf2-ARE vermittelte antioxidative Abwehr an der Induktion der GCL-C, sowie an der Reduktion intrazellulärer ROS beteiligt ist wurde AT 4 hinsichtlich

einer Aktivierung des Signalwegs untersucht. Hierbei wurde AT 4 ($\geq 30 \mu\text{M}$, 24 h Inkubation) als potenter Aktivator von Nrf2 in transient transfizierten CHO-Zellen identifiziert. Weiterhin konnte in Transkriptionsanalysen neben einer Induktion der GCL-C eine vermehrte Transkription der Nrf2-regulierten Enzyme HO1, GCL-C und NQO1 bereits ab $100 \mu\text{g/ml}$ beobachtet werden.

Zur näheren Charakterisierung der Extraktinhaltsstoffe von AT 4 wurden dessen Leitverbindungen Phloridzin, Phloretin und Quercetin bezüglich einer Modulation des intrazellulären ROS-Levels und eine Induktion der Enzyme GCL-C und HO1 untersucht. Ein Beitrag des Hauptinhaltsstoffs Phloridzin an der Gesamtwirkung des AT 4 konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da bis $250 \mu\text{M}$ in beiden Testsystemen keine merkliche Veränderung zur Kontrolle beobachtet wurde. Quercetin und Phloretin zeigten eine Verringerung intrazellulärer ROS bei gleichzeitiger Induktion der Enzyme GCL-C und HO1. Da jedoch die Konzentrationen, in denen die beiden Substanzen in AT 4 vorliegen außerhalb deren Effektkonzentrationen liegen und selbst hohe Konzentrationen der beiden Einzelsubstanzen ($250 \mu\text{M}$) die Wirkqualität des AT 4 nicht übersteigen, müssen weitere bisher nicht identifizierte Inhaltsstoffe für die Wirkung verantwortlich sein.

Um der Frage nach weiteren bioaktiven Verbindungen nachzugehen wurde AT 4 mittels eines Sephadex LH-20 Adsorberpolymers einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung unterzogen. Die 17 erhaltenen Subfraktionen wurden in Screening-Assays auf ihre antioxidative Wirkung im DCF-Assay und einer Induktion der HO1 und GCL-C untersucht. Die Ergebnisse der Fraktionierung bestätigten die Untersuchungen der Leitverbindungen, dass neben Quercetin und Phloretin weitere, bisher nicht identifizierte Inhaltsstoffe in AT 4 enthalten sein müssen, die einen Teilbetrag zur Gesamtwirkung leisten. Ob und inwieweit es sich hierbei um natürliche Apfelinhaltsstoffe, oder neue Verbindungen handelt, die während der Tresterprozessierung gebildet werden muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Synergistische und/oder (über)additive Wirkungen der Inhaltsstoffe konnten anhand einer rekonstituierten Mischung aller identifizierten Einzelverbindungen ausgeschlossen werden.

Um eine bessere Übertragbarkeit der bisher gewonnenen Ergebnisse auf eine *in vivo* nähere Situation zu schaffen wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die gastrointestinale Passage einen Einfluss auf dessen Bioaktivität besitzt. Mit Hilfe eines verdauungsmimetischen

Ansatzes wurden von AT 4 verschiedene Fermentationsüberstände generiert. Es zeigte sich, dass die Wirkstärke des Tresterextrakts nach einer Dünndarmsimulation von 6 h im Vergleich zum nativen AT 4 geringer ist, jedoch nicht vollständig verloren geht. Neben einer Verringerung intrazellulärer ROS und einer Induktion der Transkripte für GCL-C und HO1 wurde ebenfalls eine verstärkte Bildung des zellulären Antioxidans Glutathion nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen beobachtet. Darüber hinaus ergab eine Inkubation mit Dünndarmfermentat eine protektive Wirkung gegenüber Menadion-vermittelten DNA-Schäden. Bezüglich der Bioaktivität scheint insbesondere der bakteriellen β -Glykosidase, die eine Spaltung der Polyphenolglykoside in ihre aktiveren Aglyka katalysiert, eine bedeutende Rolle zuzukommen. Mit steigender Fermentationsdauer der Kolonsimulation konnte in den untersuchten Testsystemen tendenziell eine Abnahme der Bioaktivität verzeichnet werden, was auf Degradationsprozesse rückschließen lässt.

Abschließend ist festzuhalten, dass polyphenolreiche Apfeltresterextrakte aus Nebenprodukten der Pektinproduktion in verbraucherrelevanten Konzentrationen *in vitro* ein antioxidatives Potential aufzeigen. Hierbei scheint vor allem dem Nrf2-ARE Signalweg eine wichtige Rolle zuzukommen. Fraktionierungsexperimente zeigten, dass die Hauptwirkung des AT 4 nicht den bekannten Polyphenolen zuzuschreiben ist, sondern weitere bisher unbekannte Komponenten für die Wirkung verantwortlich sein müssen.

Die Studien dieser Dissertation dienen einerseits als Grundlage für aufbauende *in vivo* Experimente, andererseits eröffnen sie eine zusätzliche Wertschöpfung der Nebenprodukte in der Nahrungsmittelindustrie.

6 Material und Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Die Zelllinie HT29 wurde 1964 von J. Fogh aus einem primären Kolonkarzinom einer 44 Jahre alten Frau kaukasischen Typs isoliert. Die adhärenenten epithelartigen Zellen wachsen sowohl als Monolayer, als auch in großen Kolonien und besitzen einen hypertriploiden Karyotyp mit 17,5 % Polyploidie. Die Verdopplungszeit beträgt zwischen 40 - 60 h [DSMZ, Braunschweig]. Die Kultivierung erfolgt in „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, ohne Natriumpyruvat) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS, 10000 Einheiten / 10000 µg/ml) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

6.1.2 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen

Um ein konstantes Zellwachstum zu gewährleisten muss das Zellkulturmedium in regelmäßigen Abständen ausgetauscht werden. Während der Kultivierung kommt es zu einer Abnahme der Nährstoffe und einer Anreicherung von Abfallprodukten und organischen Säuren. Dies macht sich durch einen Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb durch den Indikator Phenolrot bemerkbar. Das Medium wird abgesaugt und durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Je nach Kulturflaschengröße beträgt die Menge 40 ml (175 cm²) bzw. 20 ml (80 cm²). Ein Mediumwechsel wird jedoch nur dann durchgeführt, wenn sich die Zellen in einem subkonfluenten Wachstum befinden [Lindl, 2000].

6.1.3 Passagieren von Monolayerkulturen

Erreichen die Zellen während der Kultivierung ihre Maximaldichte müssen sie passagiert, d.h. unter Verdünnung weiterkultiviert werden. Ansonsten wachsen die Tumorzellen als Second- bzw. Poly-layer weiter. Als Folge kommt es zu einer Abnahme der Proliferationsrate

und im weiteren Verlauf zu einem Sterben einzelner Zellen oder der komplette Zellrasen löst sich vom Boden der Kulturflasche ab.

Durchführung

- Absaugen des verbrauchten Mediums mit steriler Pasteurpipette.
- Entfernen verbleibender Mediumreste mit 5 ml einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (1x PBS).
- Überschichten des Zellrasens mit 2,5 ml Trypsinlösung und Inkubation bei 37°C für 2-3 min (HT29-Zellen).
- Ablösen der Zellen durch leichtes Klopfen der Kulturflasche.
- Inaktivierung des Trypsins mit 10 ml serumhaltigem Medium versetzt und Resuspendieren der Zellen mithilfe einer Pipette.
- Je nach Wachstumsrate der Zellen wenige Tropfen bis 1 ml der Zellsuspension in die Kulturflasche geben und mit 40 ml Medium weiterkultivieren. Der Rest kann in Versuchen eingesetzt oder verworfen werden.

Da es vorkommen kann, dass vor allem in Randbereich der Zellkulturflasche nicht alle Zellen abgelöst werden, sollte in regelmäßigen Abständen eine neue, Zellkulturflasche verwendet werden. Mit steigender Passagenzahl können Monolayerkulturen ihre physiologischen Eigenschaften stark verändern, weshalb empfohlen wird nach einer entsprechenden Zeit neue Zellaliquote in Kultur zu nehmen und die hohe Passage zu verwerfen [Lindl, 2000].

10x PBS (Phosphate buffered saline):

1,71 M NaCl
100 mM Na₂HPO₄
34 mM KCl
18 mM KH₂PO₄

pH 7,4 einstellen, mit H₂O_(bidest) auffüllen und auf 1 x PBS verdünnen, autoklavieren und Lagerung bei 4°C

Trypsin-Lösung:

500 mg Trypsin (3,6 U/mg)
250 mg EDTA
100 ml 10 x PBS

Über Nacht auf Eis rühren lassen, pH-Wert auf 7 - 7,4 einstellen, mit H₂O_(bidest) auf 1 l auffüllen, steril filtrieren und als Aliquots von 5 ml bei -20 °C lagern

6.1.4 Einfrieren und Lagern von Zellen

Zellen können bei -80 °C im Biofreezer gelagert werden. Dabei dient Dimethylsulfoxid (DMSO) als Frostschutzreagenz, da es die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle, sowie eine partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert, indem es das Zellwasser ersetzt und bindet [Lindl, 2000].

Durchführung

- Vorlegen von je 500 µl einer Mischung aus 2,8 ml FKS und 1,2 ml DMSO in Kryoröhrchen (DMSO-Endkonzentration entspricht 10 %).
- Trypsinieren der Zellen wie in Kapitel 6.1.3 beschrieben.
- Überführen von je 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen mit FKS/DMSO und gut durchmischen.

Die Zellen werden sofort für 24 h bei -20°C eingefroren. Nach einer Zwischenlagerung von 24 h bei -80°C erfolgt die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff [Lindl, 2000].

6.1.5 Auftauen von Zellen

Der Auftauvorgang sollte relativ rasch vonstattengehen, da die hohen DMSO Konzentrationen des Frostschutzes bei Raumtemperatur zytotoxisch wirken.

Durchführung

- Auftauen der Zellen bei 37°C im Wasserbad.
- Überführen der Zellsuspension in 15 ml Tube und Überschichten mit der 10-fachen Menge an 20 % FKS-haltigem Medium.
- Zentrifugation für 4 min bei 20°C und 130 x g.
- Abdekantieren des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets mit 5 ml 20 % FKS-haltigem Medium zum Entfernen restlicher DMSO-Rückstände.
- Überführen der Zellsuspension in eine kleine Kulturflasche (25 cm²) und Zugabe von weiteren 5 ml 20 % FKS-haltigem Medium.
- Kultivierung unter zellspezifischen Bedingungen.

Sind die Zellen angewachsen werden sie passagiert und in 10 % FKS haltigem Medium weiterkultiviert. Nach etwa 10 d können die Zellen für *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden [Lindl, 2000].

6.1.6 Mykoplasmascreening

Die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryoten, die sogenannten Mykoplasmen, sind auf Grund ihrer geringen Größe in der Lage, Sterilfilter ungehindert zu passieren. Somit ist es notwendig, die Zellkulturen regelmäßig auf Mykoplasmen zu untersuchen.

Durchführung

- Trypsinieren der Zellen wie in Kapitel 6.1.3 beschrieben.
- In eine Petrischale ($\varnothing$ 10 cm²) wird ein steriler „super-frost“ Objektträger gelegt und mit 10 ml 10 % FKS haltigem Medium überschichtet.
- 3 - 4 Tropfen der Zellsuspension auf den Objektträger geben und die Zellen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank anwachsen lassen.
- Medium absaugen und Fixieren der Zellen durch eiskaltes Methanol auf dem Objektträger für mindestens 15 min bei -20°C.
- Färben der Zellkerne mit einigen Tropfen DAPI/SR 101-Färbelösung auf den Objektträger und Abdecken mit Deckglas.

Da Mykoplasmen zum größten Teil aus DNA bestehen, sind sie unter dem Fluoreszenzmikroskop (Anregungswellenlänge 450 - 490 nm) als kleine, hell leuchtende Punkte im Inter- und Intrazellularraum zu erkennen [Lindl, 2000].

DAPI/SR 101-Lösung:	200 mM	Tris
	200 mM	NaCl
	8 µM	DAPI
	50 µM	Sulforhodamin 101

In H₂O_(bidest) lösen und auf pH 7,6 einstellen und dunkel aufbewahren.

6.1.7 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung, sowie Unterscheidung lebender und toter Zellen wird der Trypanblau-Vitalitätstest in Verbindung mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die Neubauer Zählkammer ist eine etwa 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte. Die Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind, ist um einen definierten Betrag vertieft. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm, wodurch ein Volumen von 0,1 µl entsteht.

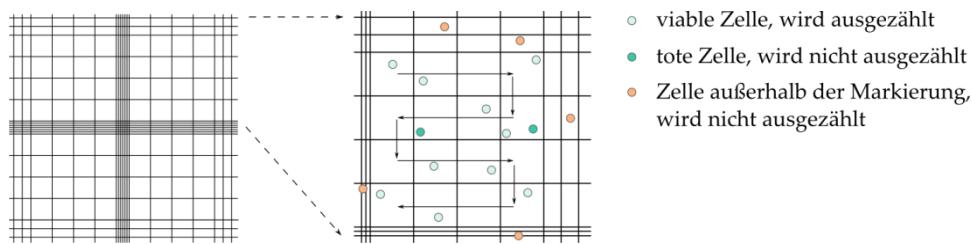


Abbildung 65: Neubauer Zählkammer (modifiziert nach Lindl [2002]). In den vier 4 x 4 Eckquadraten der Zählkammer werden die lebenden Zellen gezählt und die Zellzahl pro ml bestimmt.

Durchführung

- 20 µl gut resuspendierte Zellsuspension mit 80 µl Trypan-Blau versetzen und lichtmikroskopisch mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer auszählen.
- Bei der Auszählung werden nur die vier Eckquadrate berücksichtigt (Abbildung 65).
- Lebende und tote Zellen unterscheiden sich durch ihre Färbeeigenschaft mit Trypan-Blau. Vitale Zellen sind in der Lage den Farbstoff auszuschleiden und erscheinen im mikroskopischen Bild hell. Tote Zellen weisen eine dunkle Färbung auf, da Trypan-Blau intrazellulär verbleibt.
- Falls sich Zellen auf den äußeren Linien befinden werden bei der Auszählung 2 nebeneinander liegende Begrenzungslinien berücksichtigt.

Bei der Zellzahlbestimmung werden ausschließlich die lebenden Zellen berücksichtigt. Es wird der Mittelwert der Zellen aus den vier Eckquadraten gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor 5 sowie mit 10000 multipliziert. Daraus ergibt sich die Zellzahl pro ml [Lindl, 2000].

6.2 Sulforhodamin B-Assay

Eine Beeinflussung des Zellwachstums durch Testsubstanzen wird mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay nachgewiesen. Das Prinzip beruht auf einer Färbereaktion zwischen dem SRB-Reagenz und dem Lebendprotein der Zellen. Unter mild sauren Bedingungen bindet SRB an basische Aminosäuren der Zellproteine. Durch Anheben des pH-Wertes ins Basische (pH ~10) kann der Farbstoff wieder aus der Proteinmatrix gelöst und im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm vermessen werden [Skehan et al., 1990].

Durchführung:

- Ausstreuen von 5000 HT29-Zellen pro Well und 1 ml Zellkulturmedium in eine 24-Loch-Platte und Kultivierung für 48 h gemäß Kapitel 6.1.1.
- Zellinkubation mit der entsprechenden Testsubstanz für 48 h bzw. 72 h (die Lösungsmittelkonzentration beträgt dabei 1 % im Endansatz).
- Die Inkubation wird durch Zugabe von 100 μ l TCA (50 %) abgestoppt und mindestens für 1 h bei 4°C im Kühlschrank belassen.
- Überstand abschütten und Zellen vorsichtig 4 x mit $\text{H}_2\text{O}_{(\text{bidest})}$ waschen um Zell- und Mediumreste vollständig zu entfernen.
- Platte schräg stellen, sodass überschüssiges Wasser ablaufen kann und vollständig trocknen lassen.
- Pro Well werden die Zellen mit 250 μ l SRB-Lösung (0,4 %, w/v) für 30 min angefärbt.
- Überschüssiger Farbstoff wird durch je zweimaliges Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{(\text{bidest})}$ und verd. Essigsäure (0,1 %, v/v) ausgewaschen.
- Erneutes Trocknen der Platte im Dunkeln.
- Zum Lösen des Farbstoffs Tris-Base (pH 10) zupipettieren und photometrisch bei 570 nm vermessen.

Zur Auswertung werden die Mittelwerte der Proben und der Lösungsmittelkontrolle gebildet. Die Lösungsmittelkontrolle wird auf 100 % normiert und die Mittelwerte der Proben darauf bezogen (test over control).

Trichloressigsäure (TCA):	50 %	TCA in H ₂ O _(bidest)
Sulforhodamin B (SRB)	0,4 %	SRB in 1 % Essigsäure
Tris-Base	10 mM	Tris-Base in H ₂ O _(bidest) pH 10

6.3 Untersuchung der Expression von p16^{INK4a}

Zur Bestimmung der Modulation der Expression von p16^{INK4a} wird nach Inkubation und Lyse der Zellen der Proteingehalt nach Bradford [1976] bestimmt und im Anschluss die Proteine mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 6.3.4). Die Proteine werden danach über ein Semidry-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgt mittels spezifischer Antikörper. Als Beladungskontrolle wird der Gehalt an α -Tubulin herangezogen.

6.3.1 Zellinkubation

In einer Petrischale ($\varnothing$ 10 cm) werden $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgestreut und mit 10 ml DMEM (10 % FKS, 1 % PS) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 48 - 72 h erfolgt die Zellinkubation.

Die Testsubstanzen werden vor jedem Versuch in PBS gelöst und entsprechend verdünnt. Die PBS-Endkonzentration im Zellkulturmedium beträgt 1 %. Jedem Versuchsansatz werden 100 U/ml Katalase dem Inkubationsmedium zugesetzt, um einer möglichen H₂O₂-Akkumulation im Zellkulturmedium entgegenzuwirken (Kapitel 2.4.6). Bei jedem Versuch wird eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient 5-Aza-dC (in PBS gelöst), ein spezifischer Inhibitor der DNA-Methyltransferasen. Die Inkubationsdauer beträgt 48 h bzw. 96 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

6.3.2 Gewinnung der Zellproteine

Die folgenden Schritte der Zellaufarbeitung werden auf Eis durchgeführt:

- Medium entfernen und Zellen 2 x mit je 3 ml eiskaltem PBS (1x) waschen (beim zweiten Spülschritt die Platten schräg stellen und PBS rückstandslos entfernen).
- 200 μ l Lysepuffer zugeben und Zellen mit einem Gummischaber ablösen.

- Zellsuspension in einen gekühlten Handhomogenisator („tight Pistill“) überführen.
- Durch Scherung der Suspension mit 40 Hüben wird ein Zellhomogenat erstellt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
- 10 min bei 4°C und 20.000 x g zentrifugieren.
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen (Proteinbestimmung)

Lysepuffer (RIPA):	50 mM	Tris/HCl
	250 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Igepal
	1 mM	NaF
Direkt vor Verwendung zugeben!	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 µM	Proteaseinhibitor Mix (Roche, 25 µM)

6.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford beruht auf der Färbung von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie®-Brillantblau G250. Der Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 420 nm. Durch Komplexbindung mit Proteinen verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum zu 595 nm. Durch die hohe Extinktionsdifferenz des freien Farbstoffes im Vergleich zum Farbstoff/Protein-Komplex kann die Zunahme der Extinktion bei 595 nm gegen den freien Farbstoff photometrisch vermessen und mittels einer Standardgerade quantifiziert werden [Bradford, 1976]. Die Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1,2 mg/ml wird mithilfe einer BSA-Standardlösung (2 mg/ml, Pierce) angesetzt. Zusätzlich werden H₂O_(bidest) und der bei der Aufarbeitung verwendete Lysepuffer als Kontrollen mitgeführt.

Durchführung:

- Verdünnen der Proben, sodass sie innerhalb der BSA-Standardgeraden liegen.
- 10 µl der Standardlösungen und Kontrollen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Bradfordreagenz versetzen.

- Von jeder Lösung 3 x 200 µl in eine 96-Well Platte pipettieren und die Platte bei 595 nm photometrisch vermessen.
- Ermittlung der Proteinkonzentration nach Abzug des Leerwertes durch lineare Regression anhand der Standardreihe.
- Einstellen des Proteingehalts jeder Probe auf 240 µg/ml und mit 6 x SDS Probenpuffer versetzen.
- Denaturierung der Proteine durch Erhitzen der Proben auf 95°C für 5 min.

Die Proben können anschließend direkt zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt oder bei -20°C wenige Wochen gelagert werden.

Bradfordreagenz:	100 mg	Coomassie®-Brillantblau G250
	50 ml	Ethanol
	100 ml	Phosphorsäure (85 %)
mit H ₂ O _(bidest) auf 1 l auffüllen, 4 Wochen stehen lassen, anschließend filtrieren, im Dunkeln bei RT lagern		
6x SDS-Probenpuffer:	50 ml	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
	40 ml	Glycerol
	1,24 g	SDS
	0,16 g	Bromphenolblau
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

6.3.4 Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (disk SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine vor ihrer Trennung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) denaturiert. Dadurch werden die Nettoladungen der Proteine, die aus den Seitenkettenladungen der einzelnen Aminosäuren resultieren, durch die negative Ladung des Detergenz überdeckt. So wird erreicht, dass die Ladungsmenge nun direkt proportional zur Molekülgröße ist. Wird die Denaturierung mit SDS bei 95°C in Anwesenheit von β-Mercaptoethanol durchgeführt, so werden zusätzlich alle Disulfidbrücken der Proteine ge-

spalten. Die Wanderungsgeschwindigkeit zeigt nun eine lineare Korrelation zur Molekülgröße (bei Auftragung der dekadischen Logarithmen der Wanderungsgeschwindigkeit gegen die Molekülgröße).

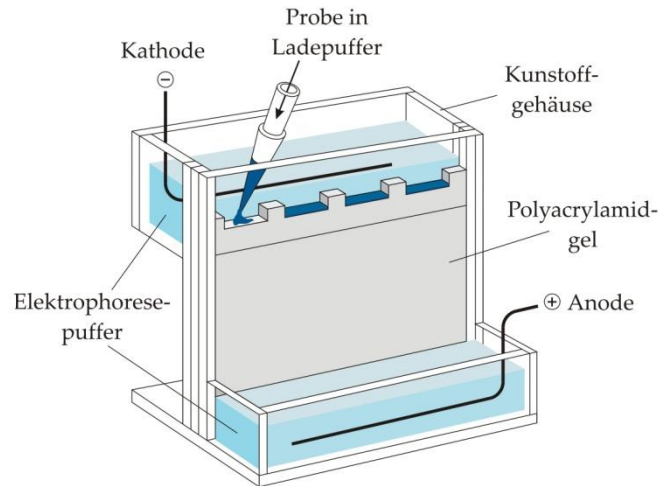


Abbildung 66: Schematische Darstellung der disk-SDS PAGE.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Vertikalsystem (Perfect Blue, Vertical Electrophoresis System). Hier befindet sich das Acrylamidgel zwischen zwei Glasplatten (Abbildung 66). Zur Trennung der zu untersuchenden Proteine können Trenngele mit unterschiedlichen Polyacrylamidanteilen verwendet werden. Für die Untersuchung des p16^{INK4a} Proteins wurde ein Trenngel mit einem Polyacrylamidgelanteil von 12 % eingesetzt (Tabelle 12). Die angegebenen Mengen reichen für ein Trenngel mit einer Breite von 8,3 cm, Höhe von 5 cm und Dicke von 0,1 cm.

Tabelle 12: Pipettierschemata der verwendeten Acrylamidgele.

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)
H ₂ O _(bidest)	1,72 ml	1,2 ml
Tris/HCl (1,5 M) pH 8,8	1,23 ml	-
Tris/HCl (0,5 M) pH 6,8	-	500 µl
Rotiphorese (37,5 : 1)-Lösung	1,97 ml	250 µl
SDS-Lösung (10 %)	49,2 µl	20 µl
APS-Lösung	24,6 µl	20 µl
TEMED	2,46 µl	2 µl

Durchführung:

- Entfetten der Glasplatten und Fixieren im Gießstand.
- Trenngel zwischen beiden Glasplatten bis auf eine Höhe von etwa 5 cm pipettieren.
- Zum Ausschluss von Luftsauerstoff mit n-Butanol überschichten.
- 30 - 45 Minuten warten, bis das Gel vollständig auspolymerisiert ist.
- n-Butanol entfernen und den Leerraum über dem Trenngel mit $\text{H}_2\text{O}_{(\text{bidest})}$ waschen.
- Wasserreste mit einem Filterpapier entfernen und Kamm zur Ausbildung der Geltaschen zwischen die Glasplatten stecken.
- Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel pipettieren.
- Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert ist Kamm vorsichtig ziehen und die Geltaschen mit einer Kanüle und Wasserstrahlpumpe von Gelresten säubern.
- Die mit SDS denaturierten Proteinproben und Proteinmolekulargewichtsstandard aufgetragen und mit SDS-Laufpuffer (1 x) überschichten.
- Restliche Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer (1 x) auffüllen und Elektrophorese bei $U = 100 \text{ V}$ starten. Nach 30 min (Übergang der Proben in das Trenngel) auf $U = 120 \text{ V}$ erhöhen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung:	10 % (w/v)	APS in $\text{H}_2\text{O}_{(\text{bidest})}$
SDS-Lösung:	10 % (w/v)	SDS in $\text{H}_2\text{O}_{(\text{bidest})}$
Tris/HCl (pH 8,8) für Trenngele:	1,5 M	Tris/HCl
Tris/HCl (pH 6,8) für Sammelgele:	0,5 M	Tris/HCl
10x SDS-Laufpuffer:	2 M	Glycin
	250 mM	Tris/HCl pH 8,3
	1 %	(w/v) SDS

6.3.5 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran und Detektion mittels spezifischer Antikörper (Western Blot)

Da die Proteine im Acrylamidgel für Antikörper nicht zugänglich sind werden sie mit Hilfe eines sogenannten Western Blots auf eine proteinbindende Membran (Nitrozellulosemembran) übertragen. Der Transfer erfolgt in diesem Fall mittels einer „semi-dry-blotting“ Methode. Nach dem Proteintransfer erfolgt die immunochemische Detektion der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper.

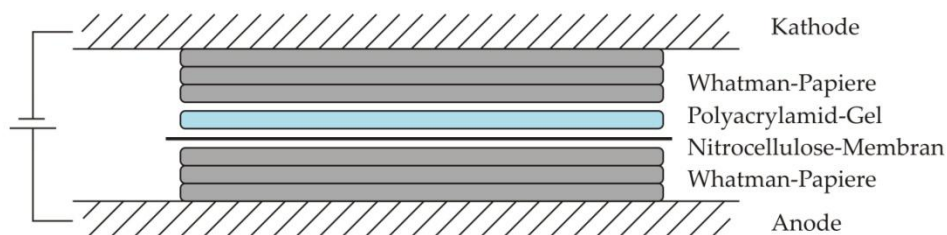


Abbildung 67: Schematische Darstellung des Gelsandwichs aus Membran, Gel und Whatman Papieren.

Durchführung:

- Whatmanpapier und Nitrozellulosemembran zuschneiden und in Blottingpuffer (1 x) equilibrieren.
- Whatmanpapiere, Membran und Gel wie in Abbildung 67 dargestellt aufschichten, wobei jeweils drei Whatman-Papiere der Anode und Kathode zugewandt sind (Wichtig ist, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bilden, da diese den Proteintransfer verhindern).
- Gelsandwich mit leichtem Druck zwischen Anode und Kathode legen.
- Proteintransfer bei konstanter Stromstärke ($I = 70 \text{ mA pro } 10 \text{ cm}^2 \text{ Gel}$) für 75 min.
- Nach dem Proteintransfer Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockingreagenz schwenken um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Inkubation mit Erstantikörperlösung: Nitrozellulosemembran mit Erstantikörper
- in 1x TBS / 0,1 % Tween 20-Lösung mit entweder 5 % (w/v) (BSA) oder 5 % (w/v) Milchpulver über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubieren
- 3 x 5 min in Waschpuffer waschen

- Inkubation mit Zweitantikörperlösung: Nitrozellulosemembran mit einem peroxidasegekoppelten Zweitantikörper (1:2000 v/v) in „Blockingreagenz“ für 60 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubieren
- 3 x 5 min in Waschpuffer waschen
- 1 min Inkubation mit LumiGlo®-Lösung

Detektion und Auswertung erfolgte mittels LAS 3000 und der Aida Image Analyser-Software Version 3.52 (Fuji/Raytest, Deutschland).

Blockingreagenz:	5 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Tween 20 in 1 x TBS
2x Blottingpuffer:	78 mM	Glycin
	96 mM	Tris/HCl
	0,074 % (w/v)	SDS
	40 % (v/v)	Methanol
LumiGlo®-Reagenz:	9 ml	H ₂ O _(bidest)
	0,5 ml	Reagenz A (Luminol)
	0,5 ml	Reagenz B (H ₂ O ₂)
20x TBS:	2,6 M	NaCl
	0,4 M	Tris/HCl pH 7,6
Waschpuffer:	0,3 %	Tween 20 in 1 x TBS

6.4 Isolierung der genomischen DNA und Gesamt-RNA

Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA und der genomischen DNA im Rahmen der Untersuchungen des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a} in dieser Dissertation wird mithilfe eines Kits (AllPrep DNA/RNA-Mini Kit, QIAGEN) durchgeführt, das speziell für tierische Gewebeproben, Zellen und Bakterien geeignet ist. Die spezielle Aufarbeitung erlaubt die parallele Isolierung von DNA und RNA aus einem Inkubationsansatz. Zur Isolierung der genomischen DNA aus Fäzesproben kam der DNeasy Mini Stool Kit (QIAGEN) zum Einsatz. Bei den Untersuchungen der Apfeltresterextrakte lag der Fokus auf den Transkriptionsuntersuchungen, sodass lediglich die RNA isoliert wurde (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). Bei beiden Extraktionsvarianten werden die Proben in einem denaturierenden guanidin- und

isothiocyanathaltigen Puffer lysiert und homogenisiert. Der Puffer dient auch zur sofortigen Inaktivierung von DNasen und RNasen um eine Isolierung intakter DNA und RNA zu gewährleisten. Es sollte darauf geachtet werden ausschließlich mit sterilen Pipettenspitzen mit Filtereinsatz zu arbeiten.

Durchführung

- Medium entfernen und Zellen 1 x mit 3 ml eiskaltem PBS (1 x) waschen.
- 300 µl (Schale Ø 5,5 cm) bzw. 600 µl (Schale Ø 10 cm) RLT-Puffer (1 % β-Mercaptoethanol, Roth) hinzupipettieren und Zellen mit sterilem Schaber ablösen.
- Zelllysat mit Pipette durchmischen und in steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
- Lysat 5 x durch eine 20G Nadel ziehen um es zu homogenisieren

a) AllPrep DNA/RNA-Mini Kit

- Lysat auf eine AllPrep DNA-Säule pipettieren.
- 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren und Säule in neues Auffanggefäß stecken (DNA befindet sich auf der Säule, RNA im Zentrifugat).
- 1 Teil 70 % Ethanol (siehe µl RLT) zum RNA-haltigen Zentrifugat pipettieren und gut durchmischen.
- 700 µl auf eine RNeasy-Säule geben und 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- Anschließend restliche RNA auf die Säule geben und ebenfalls zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule mit 700 µl RW1-Puffer waschen, 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule mit 500 µl RPE-Puffer waschen, 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule mit 500 µl RPE-Puffer waschen, 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.

- RNeasy-Säule in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß stecken, zum Eluieren der RNA 50 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettieren, 1 min bei 16.200 x g zentrifugieren.
- DNA-Säule mit 500 µl AW1-Puffer waschen, 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren.
- DNA-Säule mit 500 µl AW2-Puffer waschen, 2 min bei 16.200 x g zentrifugieren.
- DNA-Säule in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß stecken, zum Eluieren der DNA 100 µl EB-Puffer direkt auf die Membran pipettieren, nach 1 min Inkubation 1 min bei 10.000 x g zentrifugieren.

b) RNeasy Mini Kit

- 1 Teil 70 % Ethanol (siehe µl RLT) zum Lysat pipettieren und gut durchmischen.
- 700 µl auf eine RNeasy-Säule geben und 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- Anschließend restliche RNA auf die Säule geben und ebenfalls zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule mit 700 µl RW1-Puffer waschen, 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule mit 500 µl RPE-Puffer waschen, 30 s bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule mit 500 µl RPE-Puffer waschen, 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Zentrifugat verwerfen.
- RNeasy-Säule in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß stecken, zum Eluieren der RNA 50 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettieren, 1 min bei 16.200 x g zentrifugieren.

c) QIAamp DNA Stool Mini Kit

- ca. 200 mg Probe in ein 2 ml Tube einwiegen, mit 1,4 ml Puffer ASL mischen und 1 min vortexen bis Probe homogenisiert ist.
- 5 min bei 70°C inkubieren.
- Unlösliche Bestandteile abzentrifugieren und 1,2 ml in neues 2 ml Tube überführen.
- 1 InhibitEX Tablette zugeben, und ca. 1 min vortexen bis Tablette suspendiert ist.

- 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und danach 3 min bei max. Geschwindigkeit abzentrifugieren. Überstand in neues 1,5 ml Tube überführen.
- 15 µl Proteinase K in neues 1,5 ml Tube pipettieren und 200 µl des Überstands zugeben.
- 200 µl Puffer AL zugeben und 15 s vortexen. Bei 70°C für 10 min inkubieren.
- 200 µl Ethanol (96 %) zugeben und vortexen.
- Lysat auf eine QIAamp Säule pipettieren und 1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren. Säule in neues Tube stecken und Tube mit Filtrat verwerfen.
- QIAamp Säule mit 500 µl Puffer AW1 waschen. Tube mit Zentrifugat verwerfen.
- QIAamp Säule mit 500 µl Puffer AW2 waschen. 3 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren. Tube mit Zentrifugat verwerfen.
- QIAamp Säule in neues Tube stecken und erneut 1 min zentrifugieren.
- QIAamp Säule in neues Tube stecken, zum Eluieren der DNA 200 µl Puffer AE auf die Membran pipettieren. 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und 1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren.

Die DNA und RNA Konzentrationen werden anschließend am Nanodrop photometrisch bestimmt. Die Proben sind bei -80 °C etwa ein halbes Jahr lagerfähig.

6.5 Bestimmung des Methylierungsstatus und der Transkription von p16^{INK4a}

Zur Erfassung des Methylierungsstatus der Promotorregion von Genen wird die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) nach Lee und Zhu [1995] eingesetzt. Im Falle des p16^{INK4a}-Gens wird sie zur Steigerung der Produktspezifität in Form einer Nested-PCR durchgeführt. Um zwischen methylierter und nichtmethylierter Promotorregion unterscheiden zu können muss vor der MS-PCR eine Behandlung mit Natriumbisfit durchgeführt werden. Die Amplifikate der MS-PCR werden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Transkriptionsänderung von p16^{INK4a} wird nach Kapitel 6.6 durchgeführt.

6.5.1 Zellinkubation

In einer Petrischale ($\varnothing$ 10 cm) werden $0,5 \times 10^6$ Zellen (48 h Inkubation) bzw. $0,15 \times 10^6$ Zellen (96 h Inkubation) ausgestreut und mit 10 ml DMEM (10 % FKS, 1 % PS) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 72 h erfolgt die Inkubation.

Die Testsubstanzen werden vor jedem Versuch in PBS gelöst und entsprechend verdünnt. Die PBS-Konzentration im Zellkulturmedium beträgt 1 %. Bei jedem Versuch wird eine PBS-Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient der DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-dC. Die Inkubationsdauer beträgt 48 h bzw. 96 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte, wobei nach jeweils 24 h in frischem Medium nachinkubiert wurde.

6.5.2 Zellaufarbeitung

DNA und RNA werden gemäß Kapitel 6.4 isoliert. Die DNA wird nach der Bisulfitmodifikation in der MS-PCR eingesetzt (Kapitel 6.5.4). Die RNA wird mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Kapitel 6.6.2) und nachfolgend die Transkriptionsanalyse (Kapitel 6.6.3) durchgeführt.

6.5.3 Bisulfitmodifikation

Um den Methylierungsstatus der Promotorregion feststellen zu können, muss die DNA zuvor einer so genannten Bisulfitbehandlung unterzogen werden. Die Bisulfitmodifikation wird mittels EZ Methylation Gold Kit (Zymo Research Group) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die DNA bei niedrigem pH mit Natriumbisulfit versetzt. Natriumbisulfit hat die spezifische Eigenschaft nichtmethylierte Cytosine in Uracil umzuschreiben, wobei 5-Methyl-Cytosine unverändert bestehen bleiben (Abbildung 68). In wässriger Lösung wird das Cytosin-Bisulfit-Addukt unter Abspaltung der NH₂-Gruppe zum Uracilsulphonat desaminiert. Bei der anschließenden Alkali-Behandlung wird dieses Zwischenprodukt zu Uracil desulphoniert.

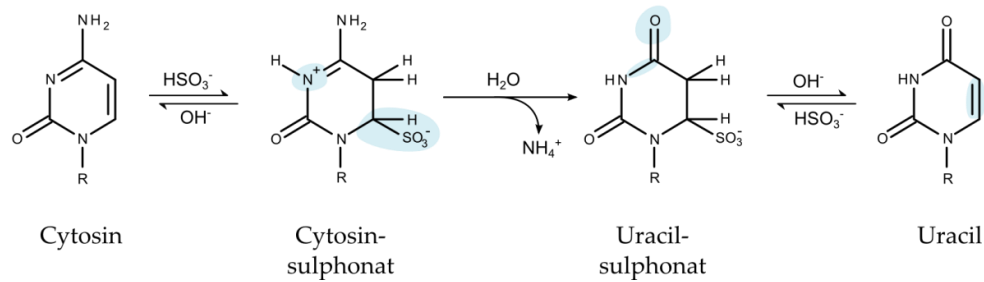


Abbildung 68: Konversion von Cytosin in Uracil während der Bisulfitbehandlung.

Durchführung:

- Herstellung des Konversionsreagenz: 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{(\text{DEPC})}$, 300 μl M-Dilution Buffer und 50 μl M-Dissolving Buffer in ein CT-Konversionsreagenzröhrchen geben und 10 min schütteln.
- 130 μl CT-Konversionsreagenz und 1 μg DNA (in 20 μl H_2O) in ein 200 μl PCR-Tube pipettieren und vorsichtig durchmischen.
- Die Probe wird nun in einen Thermocycler gegeben und unter folgenden Bedingungen Inkubiert:

Denaturierung	98°C für 10 min	
Step 1	53°C für 30 min	
Step 2	53°C für 6 min	8
Step 3	37°C für 30 min	Zyklen
Bis zur Lagerung	4°C	

- 600 μl M-Binding Buffer in eine Zymo-Spin-IC Säule pipettieren und in ein mitgeliefertes Tube stecken.
- DNA Probe auf die Säule geben, Säule verschließen und 30 s bei 18.000 x g zentrifugieren und Zentrifugat verwerfen (Achtung: Sonderabfall!).
- 200 μl M-Desulphonation Buffer auf die Säule pipettieren und bei Raumtemperatur 20 min stehen lassen, anschließend 30 s bei 18.000 x g zentrifugieren.
- 200 μl M-Wasch Buffer auf die Säule pipettieren und 30 s bei 18.000 x g zentrifugieren.
- Säule in ein neues 1,5 ml Tube (steril) stecken und 10 μl M-Elution-Puffer auf die Säulenmatrix geben und 1 min bei 18.000 x g zentrifugieren.

Die Probe kann anschließend sofort weiterverarbeitet, oder bei -20 °C gelagert werden.

6.5.4 Methylierungsspezifische PCR von p16^{INK4a}

Das besondere an dieser Form der PCR (nested MS-PCR) ist, dass sie aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen besteht mit jeweils unterschiedlichen Primerpaaren. Mit dem ersten (äußeren) Primerpaar wird zunächst ein etwas größeres Fragment der DNA amplifiziert, das die gewünschte Sequenz beinhaltet. Im folgenden Schritt wird nun mit einem zweiten Primerpaar das neu synthetisierte Amplikon einer weiteren PCR unterzogen, wobei das Primerpaar der zweiten PCR zwischen den Primern der ersten Amplifikation liegt. Auf diese Weise wird das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten minimiert [Müller, 2001].

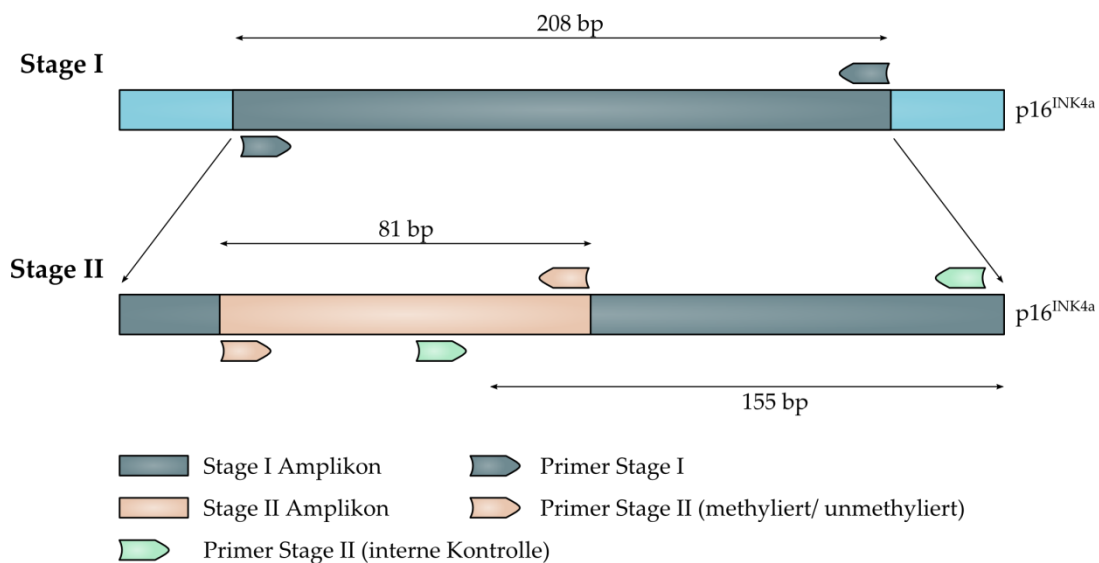


Abbildung 69: Schema der methylierungsspezifischen PCR des p16^{INK4a}-Gens [modifiziert nach Lee und Zhu, 2006]. bp, Basenpaare.

Im ersten Schritt wird durch die äußeren Primer ein 208 Basenpaar (bp) großes DNA-Fragment des p16^{INK4a}-Promoters vervielfältigt (Abbildung 69). Der Amplifikationsprozess der PCR führt in der Stage I zu einer Transformation von Uracil (vorher Cytosin) zu Thymin und von 5-Methylcytosin zu Cytosin. Auf dem komplementären Strang des PCR-Produktes wird Guanin (gegenüber Cytosin) zu Adenin transformiert (Abbildung 70).

Das erste Amplikon enthält einen gewissen Teil der CpG reichen Region im Promotorbereich. Die Primer der ersten PCR-Stufe erkennen den mit Bisulfit modifizierten Abschnitt, diskriminieren jedoch nicht zwischen methylierten und/oder unmethylierten CpG-Dinukleotiden. Zur Unterscheidung, ob dieser Promotorbereich nun methyliert oder unmethyliert vorliegt, wird das erste Amplikon einer zweiten PCR unterzogen. Diese wird nun

mit unterschiedlichen Primern durchgeführt, jeweils für den Fall einer methylierten oder unmethylierten Promotorregion. Die amplifizierte DNA-Fragmente werden anschließend mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel (2 %) getrennt und mit Ethidiumbromid detektiert [Lee und Zhu, 2006; Lottspeich, 2006].

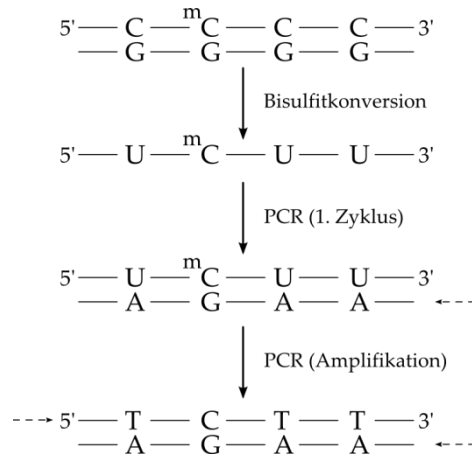


Abbildung 70: Transformation von Uracil zu Thymin.

Durchführung:

- Mastermix (Stage I) aus H₂O, PCR Puffer, dNTP Mix, Primer und Polymerase entsprechend der Probenanzahl herstellen.
- 23,5 µl Master Mix in verschließbares PCR-Tube pipettieren.
- DNA_(bisulfit) hinzupipettieren und durchmischen.
- Tubes in Thermocycler stecken und Stage I Programm starten.
- Mastermix (Stage II) für „methyliert“, „nichtmethyliert“ und „interne Kontrolle“ aus H₂O_(DEPC), PCR Puffer, dNTP Mix, Primer und Polymerase entsprechend der Probenanzahl herstellen.
- 23,5 µl Master Mix in verschließbares PCR-Tube pipettieren.
- DNA_(Stage I) hinzupipettieren und durchmischen.
- Tubes in Thermocycler stecken und je nach Primer entsprechendes Stage II Programm starten.

Material und Methoden

Stage I		pro Ansatz [µl]
H ₂ O _(DEPC)		15,375
10 x PCR Puffer		2,5
dNTP Mix 5 mM		0,5
Primer forward 5µM		2,5
Primer reverse 5µM		2,5
HotStarTaq Polymerase		0,125
DNA _(bisulfit)		1,5
Stage II		pro Ansatz [µl]
H ₂ O _(DEPC)		14,375
CoralLoad PCR Puffer		2,5
dNTP Mix 5 mM		0,5
Primer forward 5µM		2,5
Primer reverse 5µM		2,5
HotStarTaq Polymerase		0,125
DNA _(Stage I)		2,5
Aktivierung		95°C für 15 s
Denaturierung		95°C für 30 s
Annealing		
Stage I	53°C für 30 s	40 Zyklen
Stage II (meth/unmeth)	62°C für 30 s	26 Zyklen
Interne Kontrolle (IC)	53°C für 30 s	26 Zyklen
Elongation		72°C für 30 s
Inaktivierung (Stage II/ IC)		72°C für 10 min

Die erhaltenen Fragmente werden anschließend auf ein Agarosegel (2 % Agarose DNA-grade in 1 x TAE) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Spezifikationen Gellauf: 80 V, max A, ca. 2 h). Aufgrund ihrer negativen Teilladung wandert DNA im elektrischen Feld. Hierbei erfolgt eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach der Größe, da kleinere DNA-Moleküle sich schneller durch die Gelmatrix bewegen können. Die Proben der Stage II müssen dabei nicht extra mit einem Ladepuffer versetzt werden, da der PCR Mastermix bereits einen roten Farbstoff enthält, der im späteren Verlauf während der Gelelektrophorese die

Bandenfront kennzeichnet. Parallel zu den Proben wird eine DNA-Leiter mit bekannter Größe aufgetragen um die Größe der Probenfragmente kontrollieren zu können. Im Anschluss wird das Geld mit Ethidiumbromid gefärbt, das sich in die DNA einlagert und fluorimetrisch detektiert werden kann. Detektion und Auswertung erfolgt mittels LAS3000 und Aida Image Analyser-Software Version 3.52 (Fuji/Raytest, Deutschland).

H₂O_(DEPC)

1 ml DEPC

Mit Wasser auf 1 l auffüllen. Über Nacht bei Raumtemperatur rühren lassen und danach überschüssiges DEPC durch autoklavieren entfernen.

TAE-Puffer (50 x)

242 g Tris, pH 8,5

57,1 ml Eisessig

100 ml EDTA (0,5 M)

Auf 1 l mit H₂O_(bidest) auffüllen. Vor Verwendung auf 1 x TAE verdünnen.

6.6 Transkriptionsanalyse mittels quantitativer Realtime PCR

Veränderungen der Gentranskription nach 24, 48 und 96 h Inkubation von HT29-Zellen werden mittels quantitativer Realtime PCR (qPCR) untersucht. Als internes Kontrollgen wird β -Aktin herangezogen.

6.6.1 Zellinkubation

In einer Petrischale ($\varnothing$ 5,5 cm) werden $0,6 \times 10^6$ Zellen ausgestreut und mit 5 ml DMEM (10 % FKS, 1 % PS) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 72 h erfolgt die Inkubation.

Die Testsubstanzen werden vor jedem Versuch in DMSO gelöst und entsprechend verdünnt. Die DMSO Konzentration im Zellkulturmedium beträgt 1 %. Bei jedem Versuch wird eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient der Nrf2-ARE-Aktivator tBHQ. Die Inkubationsdauer beträgt 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

6.6.2 Reverse Transkription

Die zelluläre Gesamt-RNA wird wie in Kapitel 6.4 beschrieben isoliert. Die Umschreibung der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) erfolgt mittels Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN).

Durchführung:

Alle Schritte werden auf Eis pipettiert!

- Verdünnen der RNA mit RNase-freiem Wasser, sodass in 6 µl 500 ng RNA enthalten sind.
- Zugabe von 1 µl gDNA Wipeout Puffer.
- Inkubation für 2 min bei 42°C im Thermocycler Peltier Dyad Disciple (Bio-Rad).
- Zugabe von 3 µl RT-Mastermix und Inkubation für 15 min bei 42°C.
- Inaktivierung der RT bei 95°C für 3 min.

Mastermix	pro Ansatz [µl]
5 x Quantiscript RT-Puffer)	2
RT Primer Mix	0,5
Quantiscript Reverse Transcriptase	0,5

6.6.3 Quantitative Realtime PCR

Die quantitative PCR stellt eine Möglichkeit dar RNA-Transkripte zu quantifizieren. Während die klassische PCR nur eingeschränkte Möglichkeiten bietet die Amplifikationsmenge während der Reaktion zu bestimmen wird diese bei der quantitativen PCR einmal pro Zyklus gemessen.

Im Gegensatz zur Reversen Transkription muss die quantitative PCR nicht auf Eis pipettiert werden. Der SYBR Green PCR Master Mix enthält eine HotStarTaq Polymerase. Diese besitzt bei Raumtemperatur keine Enzymaktivität, wodurch die Bildung von unspezifischen Amplifikaten während der Versuchsvorbereitung minimiert wird. Zur Aktivierung ist eine Inkubation von 15 min bei 95 °C notwendig.

Neben der Taq-Polymerase werden dem Reaktionsansatz noch kurze DNA-Fragmente mit einer Länge von etwa 20 Nukleotiden (Primer) zugegeben. Diese binden spezifisch an einer

der Basensequenz komplementären Stelle der zu amplifizierenden DNA (Annealing) und werden im weiteren Verlauf von der DNA-Polymerase unter Verbrauch von dNTPs verlängert (Elongation). Um eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Zielsequenz sicherzustellen, wird der Reaktionsansatz auf ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer (50 - 60°C) abgekühlt. Die Phase der Elongation erfolgt bei 72°C, nahe des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase. Durch eine anschließende Temperaturerhöhung auf 95°C (Denaturierung) wird die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge denaturiert, sodass sich in der nächsten Annealingphase neue Primer anlagern können und die oben beschriebenen Prozesse sich wiederholen können.

Durch jeden Zyklus erfolgt eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts. Da die neu gebildeten Amplifikate wiederum als Matrize zur Verfügung stehen ergibt sich eine exponentielle Vervielfältigung des DNA-Fragments. Der Zyklus bestehend aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation wird ca. 40 Mal wiederholt.

Durchführung:

- Herstellung des Mastermixes und Lagerung auf Eis im Dunkeln.
- Vorlegen von 19,5 µl Mastermix pro Well einer MicroAmp® Fast Optical 96-Well-Platte.
- Zugabe von 0,5 µl cDNA Template aus der Reversen Transkription.
- Platte mit MicroAmp® 96-Well Optical Adhesive Film versiegeln.
- Zentrifugation der Platte für 5 min bei 400 x g.
- Amplifikation im Real-Time PCR System StepOnePlus von Applied Biosystems mit folgendem Programm:

Aktivierung	95°C für 15 s	40 Zyklen
Denaturierung	94°C für 15 s	
Annealing	55°C für 30 s	
Elongation	72°C für 30 s	
Schmelzkurve	40 - 60°C	

Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessung des Farbstoffs SYBR Green, der in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert. Die Menge an komplex-

gebundenem SYBR Green kann fluorimetrisch bestimmt werden. SYBR Green absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 521$ nm. Nach jeder Elongationsphase wird die Fluoreszenzintensität des Reaktionsansatzes gemessen. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse nach Beendigung der PCR wird überprüft, ob es zu einer Bildung unspezifischer Amplifikate kam.

Die quantitative Berechnung der Transkription erfolgt relativ durch Bezug auf ein nicht reguliertes „housekeeping Gen“ (HKG). Diese Methode wird auch „delta-delta C_T “ Berechnungsmodell genannt. C_T -Werte sind so genannte Crossing-Points. Ihr Wert legt die Anzahl von PCR-Zyklen fest, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Der relative Transkriptionsunterschied lässt sich mit folgender Formel berechnen [Pfaffl, 2004]:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Kontrollgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Testsubstanz} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{rel. Transkriptionsänderung} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

SYBR-Green Mastermix	pro Ansatz [μ l]
2 x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix	10
10 x QuantiTect® SYBR Green Primer Assay	2
RNase freies Wasser	7,5

6.7 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

Die Bestimmung des intrazellulären Redoxlevels wird mit Hilfe des DCF-Assays in Anlehnung an die Methode von Wang und Joseph [1999] durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Diffusion der apolaren, nicht fluoreszierenden Substanz 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) durch die Zellmembran in Zytosol der Zelle. Dort findet eine Deacetylierung durch intrazelluläre Esterasen zu Dichlorofluorescein statt, das ebenfalls nicht fluoresziert, jedoch aufgrund der Polarität nicht mehr aus der Zelle entweichen kann.

Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können nun das Dichlorofluorescein zu dem fluoreszierenden Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) oxidieren, das im weiteren Verlauf fluorimetrisch vermessen werden kann. Die Anregungswellenlänge liegt bei 485 nm und die

Emission bei einer mittleren Wellenlänge von 530 nm [LeBel et al., 1992]. Das DCF-Reagenz reagiert relativ unspezifisch mit verschiedenen ROS, sodass keine Rückschlüsse auf deren Identität gezogen werden kann [Frank et al., 2000].

Durchführung:

- In einer sterilen schwarzen 96-Well Platte mit klarem Boden und Deckel werden pro Well 40000 Zellen/ 100 µl ausgestreut und für 48 h unter den in Kapitel 6.1.1 angeführten Bedingungen kultiviert.
- Vorinkubation der Zellen mit der Testsubstanz für 24 h in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml). Die Lösungsmittelkonzentration im Zellkulturmedium beträgt dabei maximal 1 %.
- Das Inkubationsmedium wird mit einer sterilen Kanüle abgesaugt und jedes Well einmal mit 100 µl PBS (1 x) gewaschen.
- Pro Well 100 µl DCF-DA Reagenz (50 µM in PBS) pipettieren und für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubieren (Ab jetzt alle weiteren Schritte im Dunkeln durchführen, da der Farbstoff lichtempfindlich ist!)
- Überschüssigen Farbstoff absaugen und 2 x mit PBS (1 x) waschen.
- Pro Well 100 µl Menadion (20 µM in farblosem Medium, 1 % DMSO) zugeben.

Die Messung der Fluoreszenzintensität (FI) erfolgt zu Beginn der Menadionzugabe (t_0) und nach 60 min (t_{60}). Aus der Differenz beider Messungen (t_0 und t_{60}) wird der Fluoreszenzanstieg, verursacht durch die Oxidation des DCF-DA zu DCF ermittelt. Die Auswertung erfolgt als relative Fluoreszenzintensität in Prozent, normiert auf Zellen, die nur mit Menadion behandelt wurden.

$$rel. FI [\%] = \frac{FI_{(t_{60})} \text{ Kontrolle} - FI_{(t_0)} \text{ Kontrolle}}{FI_{(t_{60})} \text{ Probe} - FI_{(t_0)} \text{ Probe}} \times 100$$

DCF-DA

10 mM in DMSO gelöst

Das DCF-Reagenz sollte aufgrund der starken Lichtempfindlichkeit in schwarzen 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20°C gelagert werden.

6.8 Glutathionbestimmung

Die Gesamtglutathionbestimmung erfolgt in Anlehnung an die Methode von Tietze [1969]. Hierbei wird sowohl reduziertes Glutathion (GSH), als auch die oxidierte Form (GSSG) mit erfasst. Im ersten Schritt erfolgt die Reduktion von GSSG in Anwesenheit von Glutathionreduktase und NADPH/H⁺ in GSH. Mittels kinetischer Farbreaktion wird im Anschluss GSH mit 5,5'-Dinitrobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) umgesetzt, das bei 412 nm photometrisch vermessen werden kann. Die Extinktionszunahme ist hierbei proportional zum Gesamtglutathiongehalt und kann anhand einer geeigneten GSH-Standardgerade quantifiziert werden.

6.8.1 Zellinkubation

In einer Petrischale (Ø 10 cm) werden $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgestreut und in 10 ml DMEM für 48 h unter den in Kapitel 6.1.1 angeführten Bedingungen kultiviert. Nach 72 h erfolgt die Inkubation.

Die Testsubstanzen werden vor jedem Versuch frisch in DMSO oder entsprechendem Lösungsmittel gelöst und gemäß der Konzentrationsreihe verdünnt. Bei jedem Versuch wird eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient Buthioninsulfoximinlösung (1 mM). Die Inkubationsdauer beträgt 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

6.8.2 Zellaufarbeitung

- Nach der Inkubationszeit Inkubationsmedium entfernen und Zellrasen 2 x mit 5 ml PBS (eiskalt) waschen
- Zellen mit 1 ml Trypsin vom Boden lösen (2 -3 min Inkubation) und Trypsin durch 1 ml FKS-haltiges Medium inaktivieren.
- Zellen in 15 ml Tube überführen (auf Eis) und restliche Zellen der Schale mit je 2 x 1 ml Medium nachspülen.
- 20 µl der Zellsuspension für die Viabilitätsbestimmung (Kapitel 6.1.7) einsetzen

- Zellsuspension bei 4°C und 460 x g für 10 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet mit 1 ml A/B-Puffer resuspendieren und jeweils 2 x mit 200 µl A/B-Puffer nachspülen.
- Zellen bei 4°C und 400 x g für 10 min zentrifugieren und Überstand verwerfen.
- Pellett mit 370 µl A/B-Puffer versetzen und gut resuspendieren.
- 2 x 10 µl der Zellsuspension für die Proteinbestimmung abnehmen.
- Restliche 350 µl mit 350 µl SSA (10 %) versetzen und 10 min auf Eis stehen lassen um Proteine auszufällen.
- Ausgefallene Proteine bei 4°C und 20000 x g für 10 min zentrifugieren (Überstand wird für die GSH-Bestimmung eingesetzt).

6.8.3 Messung von tGSH

- GSH-Standardgerade aus 1 mM GSH-Standard herstellen (10 - 200 µM).
- 10 µl des proteinfreien Zelllysats und je 10 µl der GSH-Standardreihe in eine 96-Well Platte pipettieren
- 190 µl frisch zubereiteter tGSH-Reagenzmix mittels Mehrkanalpipette zugeben und sofort die Messung starten. Gegebenfalls Proben mit A/B-Puffer entsprechend verdünnen, falls sie außerhalb der Standardreihe liegen.

Die Standards und Proben werden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ als Doppelbestimmung vermessen. Um eine Extinktionszunahme pro Zeit zu berechnen erfolgt eine zweite Messung exakt 2 min nach der ersten. Die Extinktionswerte der Doppelbestimmungen werden gemittelt, anschließend die gemittelten ersten Extinktionswerte (E1) von den gemittelten zweiten Extinktionswerten (E2) abgezogen und durch die Minutenanzahl geteilt, wodurch als Einheit eine Extinktionszunahme pro Minute erhalten wird. Aus den Extinktionszunahmen pro Minute der Standardlösungen wird eine Standardgerade erstellt, deren Geradengleichung mittels linearer Regression bestimmt wird. Durch Einsetzen der gemessenen Extinktionen der Proben in die Gleichung kann der entsprechende tGSH-Gehalt ermittelt werden. Um Unterschiede in der Zellzahl auszugleichen wird der tGSH-Gehalt auf die Proteinmenge der Probe bezogen und in nmol GSH / mg Protein angegeben.

6.8.4 Proteinbestimmung mittels Bichinchinoninsäure (BCA)

- Erstellen einer BSA-Standardgeraden (0,1 - 2 mg/ml). Davon je 25 µl in eine 96-Well Platte pipettieren und mit 175 µl BSA Reagenz versetzen.
- Inkubation für 30 min bei 37°C.
- 10 µl der Zellsuspension der Proben mit 90 µl Puffer A/B verdünnen. Darauf 700 µl BSA-Reagenzlösung geben 30 min im Heizrüttler inkubieren. Zum Abstoppen der Reaktion Lösung auf Eis stellen!
- Von den Proben 2 x 200 µl in die 96-Well Platte pipettieren und mit den BSA-Standards bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ vermessen.
- Der Proteingehalt der Proben wird mittels linearer Regression anhand der Standardgeraden ermittelt.

Sulfosalicylsäurelösung (SSA) (5 / 10 %)	25 g	SSA in 250 / 500 ml H ₂ O
GSH-Stammlösung (1 mM)	30,73 mg	GSH in 1 ml H ₂ O _(bidest)
Davon 200 µl in 19,8 ml SSA 5 % und zu je 1 ml aliquotieren und Lagerung bei -80°C.		
GSH-Standards		
Aus 1 mM Stammlösung, werden Standardlösungen von 10 - 200 µM in SSA 5 % hergestellt. Die Standards sind jedes Mal unmittelbar vor der Messung frisch anzusetzen.		
NaHCO₃-Lösung	0,5 %	NaHCO ₃ in H ₂ O _(bidest)
Puffer A	4,25 g	KH ₂ PO ₄
	0,585 g	EDTA
In H ₂ O _(bidest) lösen und auf 250 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C.		
Puffer B	10,9 g	K ₂ HPO ₄
	1,175 g	EDTA
In H ₂ O _(bidest) lösen und auf 250 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C.		
Puffer A/B	15 ml	Puffer A
	85 ml	Puffer B
Lösung vor jedem Versuch frisch ansetzen!		
DTNB-Lösung	11,9 mg	DTNB
In 5 ml Puffer A/B lösen. Vor jeden Versuch frisch ansetzen.		
Glutathionreduktaselösung (GSR)	168 U/ml	GSR
Das Enzym wird abhängig von seiner Aktivität mit Puffer A/B auf 50 U/ml verdünnt. Vor jedem Versuch frisch ansetzen.		

Material und Methoden

tGSH-Reagenz (pro Well)	164 µl Puffer A/B 20 µl DTNB 4 µl NADPH 2 µl GSR (50 U/ml)
Vor jedem Versuch frisch ansetzen!	
BCA Reagenz A	BCA Na ₂ CO ₃ Na-Tartrat NaHCO ₃
Substanzen in 0,1 N NaOH gelöst (pH 11,25)	
BCA Reagenz B	4 % CuSO ₄ · 5 H ₂ O
BCA Reagenzlösung	50 : 1 Aus Reagenz A : B

6.9 *In vitro* Batch Fermentation

Die Methode der *in vitro* Batch Fermentation stellt ein gastromimetisches Modell dar zur Simulation der Mundhöhle, über Magen, Dünndarm bis hin zum Dickdarm, möglichst den *in vivo* Bedingungen angepasst (Abbildung 58). Die Durchführung erfolgte nach der Methode der AG Gleis (Universität Jena) in Anlehnung an Gleis et al. [2006] und Borowicki et al. [2010]. Die Simulation der gastrointestinalen Passage wurde unter Berücksichtigung des jeweiligen physiologischen pH, Puffers und unter Zugabe entsprechender Verdauungsenzyme durchgeführt. Potentielle Resorptionsvorgänge des Dünndarms wurden durch den Einsatz von Dialyseschläuchen mit einer Molmassengrenze (Molecular Weight Cut-Off, MWCO) von 100 - 500 Da mitberücksichtigt. Durch mehrmaliges Vakuumziehen und Begasen mit Fermentationsgas (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂) wurde die semianaerobe Atmosphäre des Dünndarms bzw. die anaerobe Atmosphäre des Dickdarms simuliert. Mikrobielle Degradationsprozesse innerhalb des Dickdarmabschnitts wurden durch die Zugabe einer humanen Fäzes suspension realisiert. Die Probennahme erfolgte zum einen nach 6 h Dünndarmsimulation sowie jeweils nach 1, 3, 6 und 24 h Fermentation mit humaner Fäzes suspension. Die fermentierten Proben wurden im Anschluss für den Einsatz in der Zellkultur durch Zentrifugation und Sterilfiltration weiter aufbereitet um eine mikrobielle Kontamination der Zellkultur zu verhindern.

Durchführung:

- 0,5 g Probesubstanz (100 % fermentierbar) mit 10 ml Fermentationspuffer mischen.

Mund:

- 6,25 ml 0,85 % NaCl hinzugeben
(für 10 Proben: 0,681 g in 80 ml H₂O_(bidest))
- 17,36 µl α-Amylase hinzugeben
(17,36 U, Stammlösung: 500 U / 500 µl, in 20 mM NaH₂PO₄; Puffer: 0,023 g NaH₂PO₄ in 10 ml H₂O_(bidest)).
- 5 min, 37°C, Schüttelbad.

Magen:

- 2,813 ml 150 mM HCl hinzugeben
(für 10 Proben: 2,625 ml 2 M HCl + 32,375 ml H₂O).
- 1,11 mg Pepsin in 0,9375 ml 20 mM HCl zugeben.
(für 10 Proben: 12,21 mg Pepsin 10,3125 ml 20 mM HCl; 110 µl + 10,89 ml H₂O).
- pH-Wert von 2 vorsichtig mit 2 M HCl einstellen.
- 2 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubieren.

Dünndarm:

- intestinales Extrakt herstellen.
- Dialyseschläuche für 30 min H₂O_(bidest) equilibrieren.
- nach 2 h Magensimulation pro Flasche 5 ml intestinales Extrakt zupipettieren.
- Flaschen mit 2 l Dialysepuffer bereitstellen.
- Fermentationsansatz (25 ml) auf 2 Dialyseschläuche verteilen (~25 cm Schlauchlänge); Schlauchklammern schräg ansetzen und obere Klammer mit Schnur versehen.
- Dialyseflaschen mit Gummistopfen und Lochdeckel versehen und Kanüle durch Stopfen stechen. Begasung (6-7 Zyklen) für halb-anaerobe Atmosphäre.
(Zyklus Überdruck ca. 0,8 bar, Unterdruck bis 0,6 bar).
- Im letzten Überdruckzyklus Kanülen vorsichtig aus dem Stopfen ziehen.
- Dialyseflaschen für 6 h bei 37°C im Schüttelwasserbad belassen.

Fäzesproben:

- mind. 3 Fäzesspender verwenden!
- In Plastiktüte sammeln, Tüte entlüften, verschließen und bis zur Verwendung (max. 3 h) auf Eis lagern.

Fäzessuspension (300 ml)

60 g Fäzes (30 g / Spender)
240 ml Fermentationspuffer

Fäzesproben zu gleichen Mengen auf die erforderliche Fäzesmenge poolen. Einstellungen am Stomacher Homogenisator: 250 rpm, 3 min.

- Stomacher nach Gebrauch mit Ethanol abspülen.
- Suspension in großes Becherglas durch Metall-Sieb überführen.
- in eine Duranglasflasche überführen und anaerobe Atmosphäre erzeugen und bei 37°C warmhalten, um ein Absterben der Mikroorganismen zu vermeiden (Begasung: 12-13 Zyklen).

Dickdarmsimulation:

- Dialyseflaschen mit Kanüle entgasen.
- Dialyseschläuche entnehmen und Inhalt beider Schläuche in Fermentationsflasche überführen.
- eventuell 2 x 50 ml Dialysat für spätere Analytik bei -80°C aufbewahren.
- Je Fermentationsflasche (~25 ml) selbe Menge Fäzessuspension zugeben.
- pH-Wert auf 6,5 einstellen, Begasung 12-13 Zyklen (anaerobe Atmosphäre).
- Fermentationsflaschen bei 37°C für 24 h im Schüttelwasserbad inkubieren.

Stopp der Fermentation:

- Zentrifuge auf 4°C vorkühlen.
- Entgasen, pH-Wert messen und Fermentationslösung in 50 ml Tube überführen.
- Tubes auf Eis zum Abstoppen der Fermentation.
- Zentrifugation: 30 min, 4500 rpm, 4°C.
- Überstand in neues 50 ml Tube überführen (Pellet auf Eis aufbewahren).
- Zentrifugation: 15 min, 4500 rpm, 4°C.

Sterilfiltration:

- Überstand in 2 ml Tubes aliquotieren.
- Zentrifugation: 13500 rpm, 15 min, 4°C.
- Unter der Sterilbank sterilfiltrieren (0,22 µm Filter).
- Lagerung bei -80°C.

Fermentationspuffer (10 Proben)	10,89 g	KH ₂ PO ₄
	800 ml	H ₂ O _(bidest)
	< 4 ml	NaOH (10 M)

Dialysepuffer (für 2 l Flasche)	27,22 g	KH ₂ PO ₄
	3,76 g	NaHCO ₃
	2 l	H ₂ O _(bidest)

Mit NaOH (10 M) auf pH 6,5 einstellen.

Intestinales Extrakt (1 x)	47 mg	NaHCO ₃
	3 mg	Oxgall
	26 mg	Pankreatin
	5 ml	H ₂ O _(bidest)

Mit NaOH (10 M) auf pH 6,5 einstellen.

6.10 Comet Assay

Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) ermöglicht den Nachweis der DNA-Schädigenden Wirkung von Testsubstanzen *in vitro* und *in vivo* in einzelnen Zellen (Abbildung 71). Durch den Einsatz von basischem Puffer [Singh et al., 1988] können DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche, Alkali-sensitive Stellen (z.B. apurine Stellen), DNA-DNA- und DNA-Protein-Crosslinks erfasst werden. Das Testsystem ist geeignet um selbst eine geringe DNA-Schädigung nachweisen zu können [Tice et al., 2000].

Durch eine zusätzliche Behandlung der Proben mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (Fpg) werden zusätzlich Fpg-sensitive Stellen als Hinweis auf mögliche oxidative DNA-Schäden detektiert. Fpg ist ein bakterielles Reparaturenzym aus *E. coli*, das oxidierten Basen, wie z.B. 8-oxo-Guanin, und apurine Stellen erkennt und aus dem DNA-Rückgrat herauschneidet und dadurch einen DNA-Einzelstrangbruch induziert.

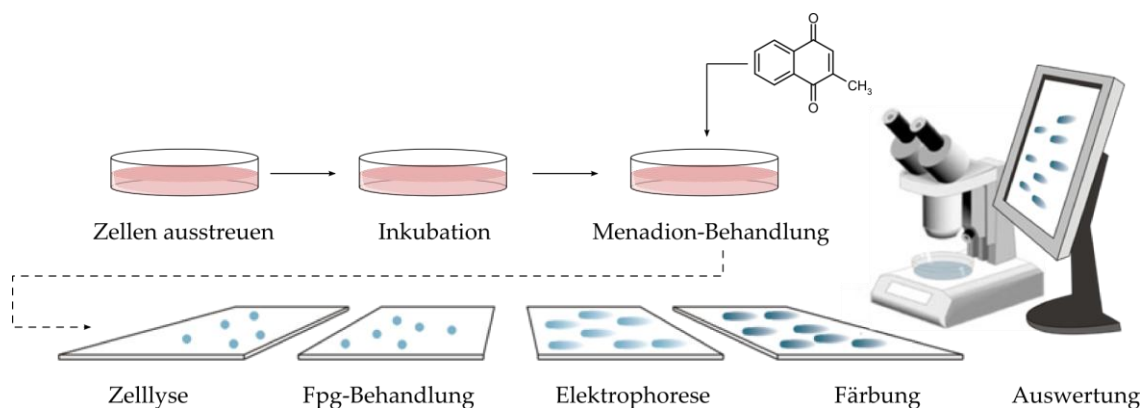


Abbildung 71: Schematischer Versuchsaufbau des Comet-Assays mit Fpg-Behandlung.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss fermentierter Apfeltresterextrakte auf die DNA-schädigende Wirkung des Redoxcyclers Menadion in HT29-Zellen untersucht. Das bedeutet im Gegensatz zum klassischen Comet Assay werden zusätzlich DNA-Schäden durch die Menadion-Behandlung induziert.

6.10.1 Zellinkubation

In einer Petrischale ($\varnothing$ 5,5 cm) werden $0,3 \times 10^6$ Zellen ausgestreut und mit 5 ml DMEM (10 % FKS, 1 % PS) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 72 h erfolgt die Inkubation.

Die Fermentationsüberstände werden vor jedem Versuch entsprechend mit Blank verdünnt. Bei jedem Versuch wird eine Blank-Kontrolle mitgeführt. Die Inkubationsdauer beträgt 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte. Im Anschluss erfolgte eine Nachinkubation mit Menadion (20 μ M) für 1 h unter oben genannten Bedingungen.

6.10.2 Vorbereiten der Objektträger

- 40 μ l NMA auf raue Seite eines gefrosteten (aufgeraut) Objektträgers pipettieren und gleichmäßig, luftblasenfrei verstreichen. Vollständig trocknen lassen und Vorgang wiederholen.
- 65 μ l NMA im Abstand von ca. 3,5 cm auf den Objektträger pipettieren und mit einem Deckglas (24 x 24 mm) versehen. Auf Eis aushärten lassen.

6.10.3 Zellaufarbeitung

- Medium entfernen und 2 x mit eiskaltem PBS (5 ml) waschen. Mediumreste entfernen.
- 0,5 ml vorgewärmtes Trypsin zugeben und für ca. 2-3 min bei 37°C inkubieren.
- Reaktion mit 0,5 ml FKS-haltigem Medium abstoppen und Zellen durch klopfen/spülen vorsichtig vom Plattenboden lösen.
- Zellsuspension in ein vorgekühltes 2 ml Tube geben und auf Eis lagern. Schale mit 0,5 ml Medium nachspülen.
- 30 µl der Zellsuspension für die Viabilitätsbestimmung einsetzen (Vgl. Kapitel 6.1.7).
- Viabilität sollte sich nicht unter 80 % bewegen.

6.10.4 Einbettung der Zellen in Agarose

- Wichtig: Zelldichte im Agarosegel darf nicht zu hoch sein, da ansonsten die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erschwert wird.
- Pro Inkubationsansatz werden 2 x 70.000 Zellen in ein neues Tube überführt und abzentrifugiert (4°C, 2000 U/min, 10 min).
- Überstand vorsichtig abpipettieren und Tube auf Eis zwischenlagern.
- Proben und Objektträger mit Kodierung versehen!
- Zellpellet in 65 µl LMA aufnehmen und direkt auf das NMA-Gelpad pipettieren (Wichtig: darf nicht zu heiß sein!). Mit neuem Deckglas versehen.
- Zum Aushärten der Agarose Zwischenlagerung für 10 min auf Eis.

6.10.5 Zelllyse

- Zur Lyse der Zelle und zum Freisetzen der DNA werden die Objektträger (ohne Deckglas) in eine geeignete Lysekammer (Coplin-Becher) gestellt und mit Lysepuffer überschichtet.
- Lysepuffer sollte auf 4°C vorgekühlt sein.
- Lyse erfolgt für min. 1 h, besser über Nacht.

6.10.6 Enzymbehandlung (optional)

- Objektträger nach entfernen des Lysepuffers dreimal für 5 min mit Enzympuffer waschen (4°C).
- Während des dritten Waschschriffs Enzym auf Eis auftauen und entsprechend verdünnen.
- Gelpads der Objektträger die mit Enzym behandelt werden sollen mit 50 µl Enzymlösung versetzen und mit Deckglas versehen. Zweite Charge Objektträger lediglich mit Enzympuffer versehen.

6.10.7 Alkalisierung und Elektrophorese

- Objektträger (ohne Deckglas) in vorgekühlte Elektrophoresekammer legen.
- Darauf achten, dass die beschriftete Seite des Objektträgers in Richtung Plus-Pol zeigt, um spätere Fehler bei der Auswertung zu vermeiden.
- Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllen (4°C), sodass die Objektträger etwa zu 5 mm bedeckt sind und 20 min equilibrieren.
- Elektrophorese für 20 min. bei 25 V und 300 mA.

6.10.8 Neutralisation, Färben und Auswertung

- Objektträger 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer waschen.
- Pro Gelpad 40 µl Ethidiumbromid-Färbelösung (20 µg/ml EtBr in H₂O) pipettieren und mit Deckglas versehen (Lagerung bei 4°C über mehrere Tage möglich).
- Auswertung erfolgt softwaregesteuert am Fluoreszenzmikroskop bei 1.000 x Vergrößerung (Comet Assay IV, Perceptive Instruments).
- Detektiert wird die Intensität des Kometenschweifs bezogen auf die Intensität des Kometenkopfes (Abbildung 72).
- Ausgezählt werden 50 Zellen pro Pad.

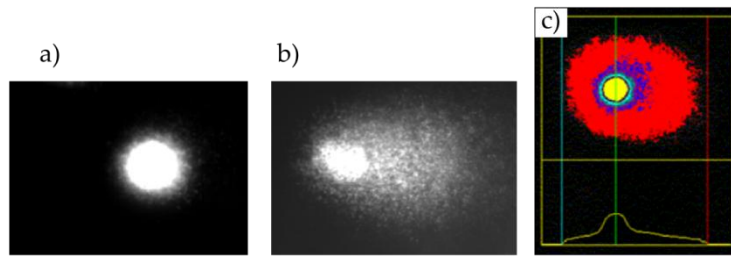


Abbildung 72: Darstellung einer intakten (a) und geschädigten (b) Zelle mit Kometenschweif und softwaregestützter Auswertung (c) mittels Comet Assay IV.

NMA (normal melting agarose)	0,5 %	in PBS (1 x)
LMA (low melting agarose)	0,8 %	in PBS (1 x)
Lysepuffer (Stammlösung)	146,1 g/l	NaCl
	37,23 g/l	EDTA
	12,11 g/l	Tris
	10 g/l	N-Laurylsarcosin
Mit halbkonz. NaOH auf pH 10,0 einstellen.		
Lysepuffer (Gebrauchslösung)	89 %	Lysepuffer (Stammlösung)
	10 %	DMSO
	1 %	Triton-X
Enzympuffer (10 x)	95,32 g/l	HEPES
	74,56 g/l	KCl
	1,862 g/l	EDTA
	2,0 g/l	BSA
Mit verd. KOH auf pH 8,0 einstellen.		
Elektrophoresepuffer (Stammlösung)	400 g/l	NaOH
	74,46 g/l	EDTA (pH 10)
Neutralisationspuffer	48,46 g/l	Tris
Mit halbkonz. HCl auf pH 7,5 einstellen.		

6.11 Materialienverzeichnis

Verbrauchsmaterialien

Costar®, 96-Loch, steril	Corning, N. Y., USA
Deckgläser	Menzel-Gläser
Eppendorfreaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5, 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Glaspipetten	VWR
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Multipettenaufsätze (1, 5, 10 ml)	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5 ml)	VWR
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischalen, Ø 5, 10 cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
13, 15, 50 ml Röhre	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Superfrost® Objektträger	Menzel-Gläser
TC-Platten, 24-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
TC-Platten, 96-Loch	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman und Schleicher & Schuell
1,5 mm Whatman Papiere	Whatman und Schleicher & Schuell
Zellschaber, 25 cm, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Chemikalien

peqGOLD Universal-Agarose	PeqLab
peqGOLD Low-Melt Agarose	PeqLab
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin-Standard	Pierce Biotechnologie, Rockford, USA
n-Butanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DAPI/SR101	Partec GmbH, Münster

Material und Methoden

2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (EtOH) p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutathionreduktase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Igepal CA-300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2HPO_4)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Luminol-Lösung 20 x (LumiGlo)	Roche Applied Science
β -Mercaptoethanol	Fluka, München
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β -Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (reduziert)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Oxgall	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Material und Methoden

Pankreatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Poly(Glu;Tyr) 4:1-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Proteaseinhibitor complete	Roche, Basel, CH
Rotiphorese 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
5-Sulfosalicylsäure (Hydrat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Serva GmbH, Heidelberg
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Testsubstanzen und Feinchemikalien

5-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
AT 4/ AT 9/ AS klar/trüb	Prof. Carle, Universität Hohenheim
Bohnapfelextrakt (BAE)	Prof. Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim
tert.-Butylhydrochinon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
n-Chlorogensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Menadion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Kits

QuantiTect® Reverse Transcription	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect® SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
HotStarTaq Plus PCR	QIAGEN GmbH, Hilden

AllPrep DNA/RNA Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
DNeasy stool Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
EZ DNA Methylation Gold Kit	Zymo Research, USA
BCA Kit for Protein Determination	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Antikörper

Anti-rabbit antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Goat anti-mouse, HRP-linked IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Mouse anti-goat, HRP-linked IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti- α -Tubulin	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p16 ^{INK4a}	Santa Cruz, Heidelberg

Primer

p16 ^{INK4a} M for	CGGGGAGTAGTATGGAGTCGGCGGC
p16 ^{INK4a} M rev	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
p16 ^{INK4a} U for	TGGGGAGTAGTATGGAGTTGGTGGT
p16 ^{INK4a} U rev	CAACCCCAAACCACAACCATAA
p16 ^{INK4a} N/IC rev	CTACAAACCCTCTACCCACCT
p16 ^{INK4a} N for	GGAGAGGGGGAGAGTAGGT
p16 ^{INK4a} IC for	GGGGAGTAGTATGGAGTTT

QuantiTect® Primer Assays

Hs_ACTB_1_SG, QT00095431	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_GPX1_1_SG, QT00203392	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_GSR_1_SG, QT00038325	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_SOD1_2_SG, QT017671551	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_CAT_1_SG, QT00079674	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTT1_2_SG, QT01751638	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GCLC_1_SG, QT00037310	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GCLM_1_SG, QT00038710	QIAGEN GmbH, Hilden

Hs_NQO1_1_SG, QT00050281	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_HMOX1_1_SG, QT00092645	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_NFE2L2_1_SG, QT00027384	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTP1_1_SG, QT00086401	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_CDKN2A_1_SG, QT00089964	QIAGEN GmbH, Hilden

Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fötales Kälberserum	Invitrogen, Carlsbad, USA
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin 10000 I. U./10000 µg/ml	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/ mg)	Serva GmbH, Heidelberg

6.12 Geräteverzeichnis

Gerät	Modell, Firma
Autoklav	Systec D-150, Systec GmbH, Weitenberg
Blotter	PerfectBlue Semi-dry Elektroblotter, PeqLab, Sandford, UK
Brutschrank	Heracell 240 i, CO2 Incubator, Thermo Fisher Scientific
Geldokumentationsgerät	LAS-3000 Fujifilm intelligent dark box, B 00001851, Software: Image Reader LAS 3000 V2.1; AIDA V3.52.046, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Gelelektrophorese	PerfectBlue™, Vertical/Horizontal Electrophoresis System, PeqLab
Glas-/Handhomogenisator	Wheaton
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr Premium und Comfort (4°C, -20°C), Liebherr

Material und Methoden

-80°C Ultratiefkühlschränke	Ultra low temperature freezer, Modell U725-86 EUBiofreezer, New Brunswick
Magnetrührer	IKA® RH basic 2, IKA®-Werke, Staufen Magnetic Stirrer HI 300N, HANNA instruments
Mikrotiterplattenleser	Vicor ³ V 1240 Multilable Counter, Perkin Elmer
Mikroskop	Inversmikroskop Axiovert 40C, Zeiss Objektive: A-Plan, 5 x/ 0,12 Ph0, CP-A Chromat 10 x/ 0,25 Ph1. Okular: PL 10 x/ 18 Durchlicht/Fluoreszenzmikroskop Axioskop, Zeiss. Objektiv: Plan-Neoflux 100 x/ 1,3, oil 440480; Okular: Pl 10 x/ 20 Filter: 365 FT 395, LP 420; UV: BP 450-490, FT 510, LP 520
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter, Elektrode: 1420-040, HANNA instruments Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120
Pipetten, Multipetten, Pipettus	Multipette Plus, Eppendorf Research P 2,5 - P 5000, Eppendorf Pipettus Akku, Hirschmann Laborgeräte
Power Station	Consort E835 Electrophorese Power Supply EV231, PeqLab
Pumpen	Vakuumsaugpumpe Laboport® (KNF Neuberger) Hitachi L-6210 Intelligent Pump (Merck)
Schüttler	Thriller, 1,5 ml, Peqlab Biotechnologies, Erlangen

Material und Methoden

Überkopfschüttler	Roto-Shake-Genie, Peqlab Biotechnologies, Erlangen
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Peqlab
Sterilbank	KR-130 BW, Kojair Tech Oy, Finnland Heraeus HS12, Heraeus instruments, Hanau
Thermocycler	MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cyclers StepOne™ Plus Real-Time PCR System Applied Biosystems
Trockenschrank	Heraeus, Memmert, Heraeus instruments, Hanau
Vortex	Vortex MS Minishaker IKA®, VWR Vortex Genie 2TM, Bender und Hobein AG
Waagen	Analysenwaage: CP124 S, Grobwaage: 1574 MP8-2, Sartorius AG, Göppingen
Wasserbad	SW-2004, VWR
Zentrifugen	Tischzentrifugen: 5415, 5415C, 5417R, 5804R, Eppendorf AG, Hamburg Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus, Thieme Labortechnik GmbH Tischzentrifuge, Mikro 220R, Rotina 420R, Hettich Tischzentrifuge, Galaxy MiniStar, VWR

7 Literaturverzeichnis

- Aherne, S. A. und N. M. O'Brien (2002). "Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism." *Nutrition* 18(1): 75-81.
- Akagawa, M., T. Shigemitsu und K. Suyama (2003). "Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions." *Biosci Biotechnol Biochem* 67(12): 2632-2640.
- Alam, J., D. Stewart, C. Touchard, S. Boinapally, A. M. Choi und J. L. Cook (1999). "Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene." *J Biol Chem* 274(37): 26071-26078.
- Antequera, F. und A. Bird (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11995-11999.
- Applegate, L. A., P. Luscher und R. M. Tyrrell (1991). "Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells." *Cancer Res* 51(3): 974-978.
- Arts, I. C. W., B. van de Putte und P. C. H. Hollman (2000a). "Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5): 1746-1751.
- Arts, I. C. W., B. van de Putte und P. C. H. Hollman (2000b). "Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5): 1752-1757.
- Aura, A. M., K. O'Leary, G. Williamson, M. Ojala, M. Bailey, R. Puupponen-Pimiä, A. Nuutila, K. M. Oksman-Caldentey und K. Poutanen (2002). "Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1725-1730.
- Balogun, E., M. Hoque, P. Gong, E. Killeen, C. J. Green, R. Foresti, J. Alam und R. Motterlini (2003). "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element." *Biochem J* 371(Pt 3): 887-895.
- Barber, D. A. und S. R. Harris (1994). "Oxygen free radicals and antioxidants: a review." *Am Pharm NS34*(9): 26-35.
- Barcelo, S., J. M. Gardiner, A. Gescher und J. K. Chipman (1996). "CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane." *Carcinogenesis* 17(2): 277-282.

- Barth, S. W., C. Faehndrich, A. Bub, B. Watzl, F. Will, H. Dietrich, G. Rechkemmer und K. Briviba (2007). "Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4): 1181-1187.
- Barth, S. W., C. Fahndrich, A. Bub, H. Dietrich, B. Watzl, F. Will, K. Briviba und G. Rechkemmer (2005). "Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats." *Carcinogenesis* 26(8): 1414-1421.
- Baylin, S. B., J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino und J. P. Issa (1998). "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia." *Adv Cancer Res* 72: 141-196.
- Bedi, A., P. J. Pasricha, A. J. Akhtar, J. P. Barber, G. C. Bedi, F. M. Giardiello, B. A. Zehnbaauer, S. R. Hamilton und R. J. Jones (1995). "Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer." *Cancer Res* 55(9): 1811-1816.
- Belinsky, S. A., K. J. Nikula, W. A. Palmisano, R. Michels, G. Saccomanno, E. Gabrielson, S. B. Baylin und J. G. Herman (1998). "Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11891-11896.
- Bellion, P., J. Digles, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2010). "Polyphenolic apple extracts: effects of raw material and production method on antioxidant effectiveness and reduction of DNA damage in Caco-2 cells." *J Agric Food Chem* 58(11): 6636-6642.
- Bellion, P., T. Hofmann, B. L. Pool-Zobel, F. Will, H. Dietrich, B. Knaup, E. Richling, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2008). "Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2." *J Agric Food Chem* 56(15): 6310-6317.
- Bellion, P., M. Olk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2009). "Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29." *Molecular nutrition & food research* 53(10): 1226-1236.
- Belshaw, N. J., G. O. Elliott, E. A. Williams, D. M. Bradburn, S. J. Mills, J. C. Mathers und I. T. Johnson (2004). "Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13(9): 1495.
- Bender, C. M., M. M. Pao und P. A. Jones (1998). "Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines." *Cancer Res* 58(1): 95-101.

- Bingham, S. A., N. E. Day, R. Luben, P. Ferrari, N. Slimani, T. Norat, F. Clavel-Chapelon, E. Kesse, A. Nieters und H. Boeing (2003). "Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study." *The Lancet* 361(9368): 1496-1501.
- Binnig, R. (2001). Die Möglichkeiten der Verwertung, Nutzung und Entsorgung von Trester aus der Fruchtsaferherstellung., Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V., Bonn (VdF).
- Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." *Nature* 321(6067): 209-213.
- Blake, D. R., R. E. Allen und J. Lunec (1987). "Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes." *Br Med Bull* 43(2): 371-385.
- Blaut, M., L. Schoefer und A. Braune (2003). "Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms." *Int J Vitam Nutr Res* 73(2): 79-87.
- Blust, V., Diplomarbeit (2008). "Einfluss von Polyphenolen auf das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}." Universität Karlsruhe (TH) - Karlsruher Institut für Technologie
- Boettler, U., K. Sommerfeld, N. Volz, G. Pahlke, N. Teller, V. Somoza, R. Lang, T. Hofmann und D. Marko (2010). "Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression." *The Journal of Nutritional Biochemistry*.
- Bokkenheuser, V. D., C. Shackleton und J. Winter (1987). "Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans." *Biochemical journal* 248(3): 953.
- Borowicki, A., K. Stein, D. Scharlau, K. Scheu, G. Brenner-Weiss, U. Obst, J. Hollmann, M. Lindhauer, N. Wachter und M. Gleis (2010). "Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells." *British Journal of Nutrition* 103(03): 360-369.
- Boyer, J., D. Brown und R. H. Liu (2004). "Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(23): 7172-7179.
- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition reviews* 56(11): 317-333.
- Bravo, L., R. Abia und F. Saura-Calixto (1994). "Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(7): 1481-1487.

- Brotherton, D. H., V. Dhanaraj, S. Wick, L. Brizuela, P. J. Domaille, E. Volyanik, X. Xu, E. Parisini, B. O. Smith, S. J. Archer, M. Serrano, S. L. Brenner, T. L. Blundell und E. D. Laue (1998). "Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d." *Nature* 395(6699): 244-250.
- Burri, N., P. Shaw, H. Bouzourene, I. Sordat, B. Sordat, M. Gillet, D. Schorderet, F. T. Bosman und P. Chaubert (2001). "Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer." *Laboratory investigation* 81(2): 217-229.
- Cadenas, E. (1995). "Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism." *Biochem Pharmacol* 49(2): 127-140.
- Caldwell, J. (1986). "Conjugation mechanisms of xenobiotic metabolism: Mammalian aspects." *Xenobiotic Conjugation Chemistry*. Washington, DC: American Chemical Society: 2-28.
- Carrasco-Pozo, C., M. Gotteland und H. Speisky (2010). "Protection by apple peel polyphenols against indometacin-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cytotoxicity in Caco-2 cells." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62(7): 943-950.
- Chan, J. Y. und M. Kwong (2000). "Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein." *Biochim Biophys Acta* 1517(1): 19-26.
- Chanas, S. A., Q. Jiang, M. McMahon, G. K. McWalter, L. I. McLellan, C. R. Elcombe, C. J. Henderson, C. R. Wolf, G. J. Moffat, K. Itoh, M. Yamamoto und J. D. Hayes (2002). "Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice." *Biochem J* 365(Pt 2): 405-416.
- Chen, L. Z., P. C. Harris, S. Apostolou, E. Baker, K. Holman, S. A. Lane, J. K. Nancarrow, S. A. Whitmore, R. L. Stallings, C. E. Hildebrand und et al. (1991). "A refined physical map of the long arm of human chromosome 16." *Genomics* 10(2): 308-312.
- Chen, W. D., Z. J. Han, J. Skoletsy, J. Olson, J. Sah, L. Myeroff, P. Platzner, S. Lu, D. Dawson, J. Willis, T. P. Pretlow, J. Lutterbaugh, L. Kasturi, J. K. Willson, J. S. Rao, A. Shuber und S. D. Markowitz (2005). "Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene." *J Natl Cancer Inst* 97(15): 1124-1132.
- Chow, J. M., S. C. Shen, S. K. Huan, H. Y. Lin und Y. C. Chen (2005). "Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages." *Biochem Pharmacol* 69(12): 1839-1851.

- Chuang, J. C., C. B. Yoo, J. M. Kwan, T. W. Li, G. Liang, A. S. Yang und P. A. Jones (2005). "Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine." *Mol Cancer Ther* 4(10): 1515-1520.
- Clifford, M. N. (1999). "Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3): 362-372.
- Comhair, S. A. und S. C. Erzurum (2005). "The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase." *Antioxid Redox Signal* 7(1-2): 72-79.
- Comhair, S. A., M. J. Lewis, P. R. Bhathena, J. P. Hammel und S. C. Erzurum (1999). "Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease." *Am J Respir Crit Care Med* 159(6): 1824-1829.
- Copple, I. M., C. E. Goldring, N. R. Kitteringham und B. K. Park (2008). "The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity." *Toxicology* 246(1): 24-33.
- Couteau, D., A. McCartney, G. Gibson, G. Williamson und C. Faulds (2001). "Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid." *Journal of applied microbiology* 90(6): 873-881.
- Coward, J. K., M. D'Urso-Scott und W. D. Sweet (1972). "Inhibition of catechol-O-methyltransferase by S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine sulfoxide, a potential transition-state analog." *Biochemical pharmacology* 21(8): 1200.
- Coward, J. K. und E. P. Slisz (1973). "Analogues of S-adenosylhomocysteine as potential inhibitors of biological transmethylation. Specificity of the S-adenosylhomocysteine binding site." *Journal of Medicinal Chemistry* 16(5): 460-463.
- Crespy, V., O. Aprikian, C. Morand, C. Besson, C. Manach, C. Demigné und C. Rémésy (2001). "Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats." *The Journal of nutrition* 131(12): 3227.
- Crozier, A., E. Michael, M. S. McDonald und C. Black (1997). "Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(3): 590-595.
- Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper und J. A. Diehl (2004). "The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase." *Mol Cell Biol* 24(19): 8477-8486.
- D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini und R. Masella (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." *Ann Ist Super Sanita* 43(4): 348-361.

- Darwanto, A., R. Kitazawa, S. Maeda und S. Kitazawa (2003). "MeCP2 and promoter methylation cooperatively regulate E-cadherin gene expression in colorectal carcinoma." *Cancer Sci* 94(5): 442-447.
- Das, P. M. und R. Singal (2004). "DNA methylation and cancer." *J Clin Oncol* 22(22): 4632-4642.
- Dashwood, W. M., G. A. Orner und R. H. Dashwood (2002). "Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations." *Biochem Biophys Res Commun* 296(3): 584-588.
- Day, A. J. (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." *FEBS letters* 468(2-3): 166-170.
- Day, A. J., M. S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M. J. C. Rhodes, M. R. A. Morgan und G. Williamson (1998). "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver [beta]-glucosidase activity." *FEBS letters* 436(1): 71-75.
- Day, J. K., A. M. Bauer, C. DesBordes, Y. Zhuang, B. E. Kim, L. G. Newton, V. Nehra, K. M. Forsee, R. S. MacDonald, C. Besch-Williford, T. H. Huang und D. B. Lubahn (2002). "Genistein alters methylation patterns in mice." *J Nutr* 132(8 Suppl): 2419S-2423S.
- Deaton, A. M. und A. Bird (2011). "CpG islands and the regulation of transcription." *Genes Dev* 25(10): 1010-1022.
- Deprez, S., I. Mila, J. F. Huneau, D. Tome und A. Scalbert (2001). "Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells." *Antioxidants and redox signaling* 3(6): 957-967.
- DeYulia, G. J., Jr. und J. M. Carcamo (2005). "EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases." *Biochem Biophys Res Commun* 334(1): 38-42.
- Diebolt, M., B. Bucher und R. Andriantsitohaina (2001). "Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression." *Hypertension* 38(2): 159.
- Diehl, J. A., F. Zindy und C. J. Sherr (1997). "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes Dev* 11(8): 957-972.
- Durante, W. (2003). "Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease." *J Cell Physiol* 195(3): 373-382.

- Eden, S., T. Hashimshony, I. Keshet, H. Cedar und A. W. Thorne (1998). "DNA methylation models histone acetylation." *Nature* 394(6696): 842.
- Elbirt, K. K. und H. L. Bonkovsky (1999). "Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role." *Proc Assoc Am Physicians* 111(5): 438-447.
- Enomoto, T., Y. Nagasako-Akazome, T. Kanda, M. Ikeda und Y. Dake (2006). "Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: a randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 16(5): 283.
- Ernster, L. (1967). "DT-diaphorase." *Methods in Enzymology* 10: 309-317.
- Escarpa, A. und M. Gonzalez (1998). "High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties." *Journal of Chromatography A* 823(1-2): 331-337.
- Esteller, M. (2007). "Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome." *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1: R50-59.
- Fahey, J. W., Y. Zhang und P. Talalay (1997). "Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10367-10372.
- Fang, M., D. Chen und C. S. Yang (2007). "Dietary polyphenols may affect DNA methylation." *The Journal of nutrition* 137(1): 223S.
- Fang, M. Z., Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh und C. S. Yang (2003). "Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines." *Cancer Res* 63(22): 7563-7570.
- Farmer, P. B., R. Singh, B. Kaur, R. J. Sram, B. Binkova, I. Kalina, T. A. Popov, S. Garte, E. Taioli und A. Gabelova (2003). "Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants:: Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544(2-3): 397-402.
- Ferlay, J., D. Parkin und E. Steliarova-Foucher (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *European Journal of Cancer* 46(4): 765-781.
- Fini, L., M. Selgrad, V. Fogliano, G. Graziani, M. Romano, E. Hotchkiss, Y. A. Daoud, E. B. De Vol, C. R. Boland und L. Ricciardiello (2007). "Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells." *J Nutr* 137(12): 2622-2628.

- Finnegan, E. J., R. K. Genger, W. J. Peacock und E. S. Dennis (1998). "DNA Methylation in Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 223-247.
- Fowke, J. H., F. L. Chung, F. Jin, D. Qi, Q. Cai, C. Conaway, J. R. Cheng, X. O. Shu, Y. T. Gao und W. Zheng (2003). "Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer." *Cancer Res* 63(14): 3980-3986.
- Frank, J., H. Biesalski, S. Dominici und A. Pompella (2000). "The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells." *Histology and histopathology* 15(1): 173.
- Fridrich, D., Dissertation (2008). "Einfluss von Polyphenolen auf Schlüsselemente wachstumsassoziiierter Signalkaskaden in humanen Kolonkarzinomzellen." Universität Karlsruhe
- Fridrich, D., M. Kern, J. Fritz, G. Pahlke, N. Kohler, P. Winterhalter und D. Marko (2007a). "The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins." *Mol Nutr Food Res* 51(2): 192-200.
- Fridrich, D., M. Kern, G. Pahlke, N. Volz, F. Will, H. Dietrich und D. Marko (2007b). "Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells." *Mol Nutr Food Res* 51(5): 594-601.
- Fukushima, S., M. A. Shibata, M. Hirose, T. Kato, M. Tatematsu und N. Ito (1991). "Organ-specific modification of tumor development by low-dose combinations of agents in a rat wide-spectrum carcinogenesis model." *Jpn J Cancer Res* 82(7): 784-792.
- Gehring, M., W. Reik und S. Henikoff (2009). "DNA demethylation by DNA repair." *Trends Genet* 25(2): 82-90.
- Gerhäuser, C. (2008). "Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components." *Planta Med* 74(13): 1608-1624.
- Gerhäuser, C., K. Klimo, W. Hümmer, J. Hölzer, A. Petermann, A. Garreta-Rufas, F. D. Böhmer und P. Schreier (2009). "Identification of 3-hydroxy- β -damascone and related carotenoid-derived aroma compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated phase 2 response with concomitant anti-inflammatory activity." *Molecular nutrition & food research* 53(10): 1237-1244.
- Gerhäuser, C., M. You, J. Liu, R. M. Moriarty, M. Hawthorne, R. G. Mehta, R. C. Moon und J. M. Pezzuto (1997). "Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes." *Cancer Res* 57(2): 272-278.
- Gharavi, N., S. Haggarty und A. O. El-Kadi (2007). "Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites." *Curr Drug Metab* 8(1): 1-7.

- Giovannucci, E. (2007). "Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review." *The American journal of clinical nutrition* 86(3): 836S.
- Giudice, A. und M. Montella (2006). "Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention." *Bioessays* 28(2): 169-181.
- Glei, M., T. Hofmann, K. Küster, J. Hollmann, M. G. Lindhauer und B. L. Pool-Zobel (2006). "Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6): 2088-2095.
- Glockner, S. C., M. Dhir, J. M. Yi, K. E. McGarvey, L. Van Neste, J. Louwagie, T. A. Chan, W. Kleeberger, A. P. de Bruine, K. M. Smits, C. A. Khalid-de Bakker, D. M. Jonkers, R. W. Stockbrugger, G. A. Meijer, F. A. Oort, C. Iacobuzio-Donahue, K. Bierau, J. G. Herman, S. B. Baylin, M. Van Engeland, K. E. Schuebel und N. Ahuja (2009). "Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer." *Cancer Res* 69(11): 4691-4699.
- Gomi, A., T. Masuzawa, T. Ishikawa und M. T. Kuo (1997). "Posttranscriptional regulation of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase expression by 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea and by cycloheximide in human glioma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 239(1): 51-56.
- Gonzalez-Zulueta, M., C. M. Bender, A. S. Yang, T. Nguyen, R. W. Beart, J. M. Van Tornout und P. A. Jones (1995). "Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing." *Cancer Res* 55(20): 4531-4535.
- Gossé, F., S. Guyot, S. Roussi, A. Lobstein, B. Fischer, N. Seiler und F. Raul (2005). "Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis." *Carcinogenesis* 26(7): 1291.
- Graff, J. R., J. G. Herman, R. G. Lapidus, H. Chopra, R. Xu, D. F. Jarrard, W. B. Isaacs, P. M. Pitha, N. E. Davidson und S. B. Baylin (1995). "E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas." *Cancer Res* 55(22): 5195-5199.
- Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 922-935.
- Griffith, O. W. und A. Meister (1979). "Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11): 5606-5610.
- Griffith, O. W. und R. T. Mulcahy (1999). "The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73: 209-267, xii.

- Gugler, R., M. Leschik und H. Dengler (1975). "Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses." *European Journal of Clinical Pharmacology* 9(2): 229-234.
- Guo, S. X., T. Taki, H. Ohnishi, H. Y. Piao, K. Tabuchi, F. Bessho, R. Hanada, M. Yanagisawa und Y. Hayashi (2000). "Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia." *Leuk Res* 24(1): 39-46.
- Guyot, S., N. Marnet und J. F. Drilleau (2001). "Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(1): 14-20.
- Guyton, K. Z. und T. W. Kensler (1993). "Oxidative mechanisms in carcinogenesis." *Br Med Bull* 49(3): 523-544.
- Halliwell, B., M. V. Clement, J. Ramalingam und L. H. Long (2000). "Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo?" *IUBMB Life* 50(4-5): 251-257.
- Halliwell, B. und J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- HARBORNE, J. (1993). "The flavonoids: advances in research since 1986."
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*, Academic Press Ltd.
- Hasegawa, R., D. Tiwawech, M. Hirose, K. Takaba, T. Hoshiya, T. Shirai und N. Ito (1992). "Suppression of diethylnitrosamine-initiated preneoplastic foci development in the rat liver by combined administration of four antioxidants at low doses." *Jpn J Cancer Res* 83(5): 431-437.
- Hayes, J., E. Ellis, G. Neal, D. Harrison und M. Manson (1999). Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress.
- Hayes, J. D. und L. I. McLellan (1999). "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress." *Free radical research* 31(4): 273-300.
- Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin und S. B. Baylin (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9821-9826.
- Herman, J. G., A. Merlo, L. Mao, R. G. Lapidus, J. P. Issa, N. E. Davidson, D. Sidransky und S. B. Baylin (1995). "Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers." *Cancer Res* 55(20): 4525-4530.

- Hermann, A., H. Gowher und A. Jeltsch (2004). "Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases." *Cell Mol Life Sci* 61(19-20): 2571-2587.
- Herrlich, P., H. Ponta und H. Rahmsdorf (1992). "DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 119: 187-223.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman und B. Van de Putte (1993). "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(8): 1242-1246.
- Hider, R. C., Z. D. Liu und H. H. Khodr (2001). "Metal chelation of polyphenols." *Methods in Enzymology* 335: 190-203.
- Hiltunen, M. O., L. Alhonen, J. Koistinaho, S. Myohanen, M. Paakkonen, S. Marin, V. M. Kosma und J. Janne (1997). "Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma." *Int J Cancer* 70(6): 644-648.
- Hirose, M., H. Yada, K. Hakoi, S. Takahashi und N. Ito (1993). "Modification of carcinogenesis by alpha-tocopherol, t-butylhydroquinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model." *Carcinogenesis* 14(11): 2359-2364.
- Hollman, P., J. De Vries, S. D. van Leeuwen, M. Mengelers und M. B. Katan (1995). "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers." *The American journal of clinical nutrition* 62(6): 1276.
- Holt, R. R., S. A. Lazarus, M. C. Sullards, Q. Y. Zhu, D. D. Schramm, J. F. Hammerstone, C. G. Fraga, H. H. Schmitz und C. L. Keen (2002). "Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4ß-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa." *The American journal of clinical nutrition* 76(4): 798.
- Holtzclaw, W. D., A. T. Dinkova-Kostova und P. Talalay (2005). *Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers*, Elsevier Science.
- Hotchkiss, R. D. (1948). "The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography." *J Biol Chem* 175(1): 315-332.
- Hou, Z., S. Sang, H. You, M. J. Lee, J. Hong, K. V. Chin und C. S. Yang (2005). "Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells." *Cancer Res* 65(17): 8049-8056.

- Huang, H. C., T. Nguyen und C. B. Pickett (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." *J Biol Chem* 277(45): 42769-42774.
- Huang, S. und D. E. Ingber (1999). "The structural and mechanical complexity of cell-growth control." *Nat Cell Biol* 1(5): E131-138.
- Hümmer, W., Dissertation (2009). "Analyse potentiell chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoffe von Apfelsaft." Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Hussain, S. P. und C. C. Harris (1998). "Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes." *Cancer Res* 58(18): 4023-4037.
- Imhoff, B. R. und J. M. Hansen (2010). "Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation." *Cell Biol Toxicol* 26(6): 541-551.
- Immenschuh, S., T. Kietzmann, V. Hinke, M. Wiederhold, N. Katz und U. Muller-Eberhard (1998). "The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures." *Mol Pharmacol* 53(3): 483-491.
- Ishii, T., K. Itoh und M. Yamamoto (2002). "Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements." *Methods Enzymol* 348: 182-190.
- Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto und Y. Nabeshima (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." *Biochem Biophys Res Commun* 236(2): 313-322.
- Itoh, K., K. Igarashi, N. Hayashi, M. Nishizawa und M. Yamamoto (1995). "Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins." *Mol Cell Biol* 15(8): 4184-4193.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel und M. Yamamoto (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* 13(1): 76-86.
- Jaenisch, R. (1997). "DNA methylation and imprinting: why bother?" *Trends Genet* 13(8): 323-329.
- Jaiswal, A. K. (1991). "Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin." *Biochemistry* 30(44): 10647-10653.
- Jaiswal, A. K. (1994). "Antioxidant response element." *Biochem Pharmacol* 48(3): 439-444.

- Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." *Free Radical Biology and Medicine* 36(10): 1199-1207.
- Janzowski, C., S. Schaefer, S. Fritzen, M. Baum, H. Dietrich und G. Eisenbrand (2004). "Preventive antioxidative effectiveness of polyphenolic apple juice compounds in human colon cells." *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 2004(1): 169.
- Jedrychowski, W. und U. Maugeri (2009). "An apple a day may hold colorectal cancer at bay: recent evidence from a case-control study." *Rev Environ Health* 24(1): 59-74.
- Jeltsch, A. (2002). "Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases." *Chembiochem* 3(4): 274-293.
- Jeong, W. S., Y. S. Keum, C. Chen, M. R. Jain, G. Shen, J. H. Kim, W. Li und A. N. Kong (2005). "Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells." *J Biochem Mol Biol* 38(2): 167-176.
- Jin, U. H., J. Y. Lee, S. K. Kang, J. K. Kim, W. H. Park, J. G. Kim, S. K. Moon und C. H. Kim (2005). "A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*." *Life sciences* 77(22): 2760-2769.
- Jin, X., D. Nguyen, W. W. Zhang, A. P. Kyritsis und J. A. Roth (1995). "Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector." *Cancer Res* 55(15): 3250-3253.
- Jones, P. A. und P. W. Laird (1999). "Cancer epigenetics comes of age." *Nat Genet* 21(2): 163-167.
- Jones, P. A. und D. Takai (2001). "The role of DNA methylation in mammalian epigenetics." *Science* 293(5532): 1068-1070.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis und A. P. Wolffe (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nat Genet* 19(2): 187-191.
- Joseph, M. A., K. B. Moysich, J. L. Freudenheim, P. G. Shields, E. D. Bowman, Y. Zhang, J. R. Marshall und C. B. Ambrosone (2004). "Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk." *Nutr Cancer* 50(2): 206-213.
- Justesen, U., P. Knuthsen und T. Leth (1997). "Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection." *Cancer letters* 114(1-2): 165-167.

- Kahle, K., W. Huemmer, M. Kempf, W. Scheppach, T. Erk und E. Richling (2007). "Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26): 10605-10614.
- Kahle, K., M. Kraus und E. Richling (2005a). "Polyphenol profiles of apple juices." *Molecular nutrition & food research* 49(8): 797-806.
- Kahle, K., M. Kraus, W. Scheppach, M. Ackermann, F. Ridder und E. Richling (2006). "Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion?" *Mol Nutr Food Res* 50(4-5): 418-423.
- Kahle, K., M. Kraus, W. Scheppach und E. Richling (2005b). "Colonic availability of apple polyphenols—a study in ileostomy subjects." *Molecular nutrition & food research* 49(12): 1143-1150.
- Kang, D. H. (2002). "Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer." *AACN Clin Issues* 13(4): 540-549.
- Kang, K. A., K. H. Lee, S. Chae, R. Zhang, M. S. Jung, Y. M. Ham, J. S. Baik, N. H. Lee und J. W. Hyun (2006). "Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation." *J Cell Biochem* 97(3): 609-620.
- Kang, K. A., R. Zhang, S. Chae, S. J. Lee, J. Kim, J. Jeong, J. Lee, T. Shin, N. H. Lee und J. W. Hyun (2010). "Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) protects against ionizing radiation-induced cell damage through inhibition of oxidative stress in vitro and in vivo." *Chem Biol Interact* 185(3): 215-226.
- Kang, M. I., A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S. G. Kim und M. Yamamoto (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2046-2051.
- Kato, H., M. Yoshikawa, Y. Fukai, K. Tajima, N. Masuda, K. Tsukada, H. Kuwano und T. Nakajima (2000). "An immunohistochemical study of p16, pRb, p21 and p53 proteins in human esophageal cancers." *Anticancer Res* 20(1A): 345-349.
- Katoh, Y., K. Itoh, E. Yoshida, M. Miyagishi, A. Fukamizu und M. Yamamoto (2001). "Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription." *Genes Cells* 6(10): 857-868.
- Kensler, T. W., J. G. Chen, P. A. Egner, J. W. Fahey, L. P. Jacobson, K. K. Stephenson, L. Ye, J. L. Coady, J. B. Wang, Y. Wu, Y. Sun, Q. N. Zhang, B. C. Zhang, Y. R. Zhu, G. S. Qian, S. G. Carmella, S. S. Hecht, L. Benning, S. J. Gange, J. D. Groopman und P. Talalay (2005). "Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(11 Pt 1): 2605-2613.

- Kensler, T. W., N. Wakabayashi und S. Biswal (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89-116.
- Kern, M., Dissertation (2006). "Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole und deren mikrobiellen Abbauprodukten in humanen Kolonkarzinomzellen." TU Kaiserslautern
- Kern, M., D. Fridrich, J. Reichert, S. Skrbek, A. Nussler, S. Hofem, S. Vatter, G. Pahlke, C. Rüfer und D. Marko (2007). "Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid." *Molecular nutrition & food research* 51(9): 1163-1172.
- Kern, M., Z. Tjaden, Y. Ngiewih, N. Puppel, F. Will, H. Dietrich, G. Pahlke und D. Marko (2005). "Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract." *Mol Nutr Food Res* 49(4): 317-328.
- Key, T. J., A. Schatzkin, W. C. Willett, N. E. Allen, E. A. Spencer und R. C. Travis (2004). "Diet, nutrition and the prevention of cancer." *Public Health Nutrition* 7(1A; SPI): 187-200.
- Keyse, S. M. und R. M. Tyrrell (1989). "Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1): 99-103.
- Kim, M. M. und S. K. Kim (2010). "Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation." *Food Chem Toxicol* 48(10): 2925-2933.
- Kim, Y. C., H. Masutani, Y. Yamaguchi, K. Itoh, M. Yamamoto und J. Yodoi (2001). "Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors." *J Biol Chem* 276(21): 18399-18406.
- Kirlin, W. G., J. Cai, M. J. DeLong, E. J. Patten und D. P. Jones (1999). "Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells." *The Journal of nutrition* 129(10): 1827.
- Kitamuro, T., K. Takahashi, K. Ogawa, R. Uono-Fujimori, K. Takeda, K. Furuyama, M. Nakayama, J. Sun, H. Fujita, W. Hida, T. Hattori, K. Shirato, K. Igarashi und S. Shibahara (2003). "Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells." *J Biol Chem* 278(11): 9125-9133.
- Klaunig, J. E. und L. M. Kamendulis (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-267.

- Kopelovich, L., J. A. Crowell und J. R. Fay (2003). "The epigenome as a target for cancer chemoprevention." *Journal of the National Cancer Institute* 95(23): 1747.
- Koushik, A., D. J. Hunter, D. Spiegelman, W. L. Beeson, P. A. van den Brandt, J. E. Buring, E. E. Calle, E. Cho, G. E. Fraser, J. L. Freudenheim, C. S. Fuchs, E. L. Giovannucci, R. A. Goldbohm, L. Harnack, D. R. Jacobs, Jr., I. Kato, V. Krogh, S. C. Larsson, M. F. Leitzmann, J. R. Marshall, M. L. McCullough, A. B. Miller, P. Pietinen, T. E. Rohan, A. Schatzkin, S. Sieri, M. J. Virtanen, A. Wolk, A. Zeleniuch-Jacquotte, S. M. Zhang und S. A. Smith-Warner (2007). "Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies." *J Natl Cancer Inst* 99(19): 1471-1483.
- Kraft, A. D., D. A. Johnson und J. A. Johnson (2004). "Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult." *J Neurosci* 24(5): 1101-1112.
- Kronborg, O., C. Fenger, J. Olsen, O. D. Jørgensen und O. Sørengaard (1996). "Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test." *The Lancet* 348(9040): 1467-1471.
- Krumböck, C., Diplomarbeit (2010). "Modulation des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalelemente durch chlorogensäurereiche Extrakte und ausgewählte Inhaltsstoffe." Universität Wien
- Krzywanski, D. M., D. A. Dickinson, K. E. Iles, A. F. Wigley, C. C. Franklin, R. M. Liu, T. J. Kavanagh und H. J. Forman (2004). "Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress." *Arch Biochem Biophys* 423(1): 116-125.
- Kühnau, J. (1976). "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Review of Nutrition and Dietetics* 24: 117.
- Kwak, M. K., P. A. Egner, P. M. Dolan, M. Ramos-Gomez, J. D. Groopman, K. Itoh, M. Yamamoto und T. W. Kensler (2001). "Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones." *Mutat Res* 480-481: 305-315.
- Lakenbrink, C., S. Lapczynski, B. Maiwald und U. H. Engelhardt (2000). "Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(7): 2848-2852.
- Lapidot, T., M. D. Walker und J. Kanner (2002). "Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media." *J Agric Food Chem* 50(11): 3156-3160.
- Lavoie, S., Y. Chen, T. P. Dalton, R. Gysin, M. Cuénod, P. Steullet und K. Q. Do (2009). "Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and

- neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit." *Journal of neurochemistry* 108(6): 1410-1422.
- Lavrovsky, Y., M. L. Schwartzman, R. D. Levere, A. Kappas und N. G. Abraham (1994). "Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 5987-5991.
- LeBel, C. P., H. Ischiropoulos und S. C. Bondy (1992). "Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." *Chemical research in toxicology* 5(2): 227-231.
- Lebherz, J., Diplomarbeit (2010). "Charakterisierung der antioxidativen Wirksamkeit von Apfeltrestereextrakten und ausgewählten Inhaltsstoffen." Universität Wien
- Lee, J. M. und J. A. Johnson (2004). "An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism." *J Biochem Mol Biol* 37(2): 139-143.
- Lee, M. J., P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F. Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr und C. S. Yang (2002). "Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 11(10): 1025.
- Lee, W. J., J. Y. Shim und B. T. Zhu (2005). "Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids." *Mol Pharmacol* 68(4): 1018-1030.
- Lee, W. J. und B. T. Zhu (2006). "Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols." *Carcinogenesis* 27(2): 269-277.
- Lei, H., S. P. Oh, M. Okano, R. Juttermann, K. A. Goss, R. Jaenisch und E. Li (1996). "De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells." *Development* 122(10): 3195-3205.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler und B. Vogelstein (1997). "DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2545-2550.
- Lenhard, K., G. T. Bommer, S. Asutay, R. Schauer, T. Brabletz, B. Goke, R. Lamerz und F. T. Kolligs (2005). "Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer." *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(2): 142-149.
- Leonhardt, H., A. W. Page, H. U. Weier und T. H. Bestor (1992). "A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei." *Cell* 71(5): 865-873.

- Leung, W. K., K. F. To, E. P. Man, M. W. Chan, A. H. Bai, A. J. Hui, F. K. Chan, J. F. Lee und J. J. Sung (2004). "Detection of epigenetic changes in fecal DNA as a molecular screening test for colorectal cancer: a feasibility study." *Clin Chem* 50(11): 2179-2182.
- Lewis, J. D., R. R. Meehan, W. J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein und A. Bird (1992). "Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA." *Cell* 69(6): 905-914.
- Li, H. Y., Y. F. Zhong, S. Y. Wu und N. Shi (2007). "NF-E2 related factor 2 activation and heme oxygenase-1 induction by tert-butylhydroquinone protect against deltamethrin-mediated oxidative stress in PC12 cells." *Chem Res Toxicol* 20(9): 1242-1251.
- Li, J., J. M. Lee und J. A. Johnson (2002). "Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells." *J Biol Chem* 277(1): 388-394.
- Li, R., M. A. Bianchet, P. Talalay und L. M. Amzel (1995). "The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19): 8846-8850.
- Li, Y. und A. K. Jaiswal (1994). "Human antioxidant-response-element-mediated regulation of type 1 NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression. Effect of sulfhydryl modifying agents." *Eur J Biochem* 226(1): 31-39.
- Li, Y. und T. O. Tollefsbol (2010). "Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components." *Current medicinal chemistry* 17(20): 2141.
- Lin, W., G. Shen, X. Yuan, M. R. Jain, S. Yu, A. Zhang, J. D. Chen und A. N. Kong (2006). "Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators." *J Biochem Mol Biol* 39(3): 304-310.
- Lind, C., E. Cadenas, P. Hochstein und L. Ernster (1990). "DT-diaphorase: purification, properties, and function." *Methods Enzymol* 186: 287-301.
- Lindl, T. (2000). "Zell und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen." Aufl. Spektrum: Akademischer Verlag Heidelberg.
- Liu, R. M., L. Gao, J. Choi und H. J. Forman (1998a). "gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal." *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): L861-869.
- Liu, R. M., M. M. Shi, C. Giulivi und H. J. Forman (1998b). "Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells." *Am J Physiol* 274(3 Pt 1): L330-336.

- Liu, Y., E. J. Oakeley, L. Sun und J. P. Jost (1998c). "Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci." *Nucleic Acids Res* 26(4): 1038-1045.
- Liu, Z. M., G. G. Chen, E. K. Ng, W. K. Leung, J. J. Sung und S. C. Chung (2004). "Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells." *Oncogene* 23(2): 503-513.
- Long, L. H., M. V. Clement und B. Halliwell (2000). "Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media." *Biochem Biophys Res Commun* 273(1): 50-53.
- Lottspeich, F. (2006). In Lottspeich, F. & Zorbas, H.(Hrsg.) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lou, H., S. Du, Q. Ji und A. Stolz (2006). "Induction of AKR1C2 by phase II inducers: identification of a distal consensus antioxidant response element regulated by NRF2." *Mol Pharmacol* 69(5): 1662-1672.
- Lu, Y. und L. Y. Foo (1997). "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace." *Food Chemistry* 59(2): 187-194.
- Lu, Y. und L. Yeap Foo (2000). "Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace." *Food Chemistry* 68(1): 81-85.
- Luczak, M. W. und P. P. Jagodzinski (2006). "The role of DNA methylation in cancer development." *Folia Histochem Cytobiol* 44(3): 143-154.
- Maheo, K., F. Morel, S. Langouet, H. Kramer, E. Le Ferrec, B. Ketterer und A. Guillouzo (1997). "Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes." *Cancer Res* 57(17): 3649-3652.
- Maines, M. D. (1988). "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications." *FASEB J* 2(10): 2557-2568.
- Maines, M. D., G. M. Trakshel und R. K. Kutty (1986). "Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible." *J Biol Chem* 261(1): 411-419.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy und L. Jiménez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *The American journal of clinical nutrition* 79(5): 727.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert und C. Rémésy (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *The American journal of clinical nutrition* 81(1): 230S.

- Mandel, J. S., J. H. Bond, T. R. Church, D. C. Snover, G. M. Bradley, L. M. Schuman und F. Ederer (1993). "Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood." *New England Journal of Medicine* 328(19): 1365-1371.
- Mandel, J. S., T. R. Church, J. H. Bond, F. Ederer, M. S. Geisser, S. J. Mongin, D. C. Snover und L. M. Schuman (2000). "The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer." *New England Journal of Medicine* 343(22): 1603-1607.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." *Carcinogenesis* 21(3): 361-370.
- Martensson, J., A. Jain und A. Meister (1990). "Glutathione is required for intestinal function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1715-1719.
- McCoubrey, W. K., Jr., T. J. Huang und M. D. Maines (1997). "Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3." *Eur J Biochem* 247(2): 725-732.
- McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto und J. D. Hayes (2003). "Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression." *J Biol Chem* 278(24): 21592-21600.
- Meister, A. (1983). "Selective modification of glutathione metabolism." *Science* 220(4596): 472-477.
- Meng, X., M. J. Lee, C. Li, S. Sheng, N. Zhu, S. Sang, C. T. Ho und C. S. Yang (2001). "Formation and identification of 4 -O-methyl(-)-epigallocatechin in humans." *Drug metabolism and disposition* 29(6): 789.
- Meng, X., S. Sang, N. Zhu, H. Lu, S. Sheng, M. J. Lee, C. T. Ho und C. S. Yang (2002). "Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats." *Chemical research in toxicology* 15(8): 1042-1050.
- Miene, C., Dissertation (2010). "CHEMOPÄVENTIVE EFFEKTE VON APFELPOLYPHENOLEN UND AUSGEWÄHLTEN METABOLITEN IN HUMANEN KOLONZELLEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GSTT2." Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Miene, C., A. Weise und M. Glei (2011). "Impact of Polyphenol Metabolites Produced by Colonic Microbiota on Expression of COX-2 and GSTT2 in Human Colon Cells (LT97)." *Nutrition and Cancer* 63(4): 653-662.
- Miller, P. E., S. M. Lesko, J. E. Muscat, P. Lazarus und T. J. Hartman (2010). "Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence." *Nutr Cancer* 62(4): 413-424.

- Mizuno, S., T. Chijiwa, T. Okamura, K. Akashi, Y. Fukumaki, Y. Niho und H. Sasaki (2001). "Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia." *Blood* 97(5): 1172-1179.
- Moi, P., K. Chan, I. Asunis, A. Cao und Y. W. Kan (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 9926-9930.
- Moller, M. B., P. W. Kania, Y. Ino, A. M. Gerdes, O. Nielsen, D. N. Louis, K. Skjodt und N. T. Pedersen (2000). "Frequent disruption of the RB1 pathway in diffuse large B cell lymphoma: prognostic significance of E2F-1 and p16INK4A." *Leukemia* 14(5): 898-904.
- Morand, C., C. Manach, V. Crespy und C. Remesy (2000). "Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma." *Free Radic Res* 33(5): 667-676.
- Moridani, M. Y., H. Scobie, A. Jamshidzadeh, P. Salehi und P. J. O'Brien (2001). "Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation." *Drug Metab Dispos* 29(11): 1432-1439.
- Moriya, M. (1993). "Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(3): 1122-1126.
- Morrissey, C., A. Martinez, M. Zatyka, A. Agathangelou, S. Honorio, D. Astuti, N. V. Morgan, H. Moch, F. M. Richards, T. Kishida, M. Yao, P. Schraml, F. Latif und E. R. Maher (2001). "Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma." *Cancer Res* 61(19): 7277-7281.
- Motohashi, H., F. Katsuoka, J. D. Engel und M. Yamamoto (2004). "Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6379-6384.
- Motohashi, H., T. O'Connor, F. Katsuoka, J. D. Engel und M. Yamamoto (2002). "Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors." *Gene* 294(1-2): 1-12.
- Moyers, S. B. und N. B. Kumar (2004). "Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials." *Nutrition reviews* 62(5): 204-211.
- Müller, H. J. (2001). "PCR-Polymerase-Kettenreaktion." Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.

- Muller, H. M., M. Oberwalder, H. Fiegl, M. Morandell, G. Goebel, M. Zitt, M. Muhlthaler, D. Ofner, R. Margreiter und M. Widschwendter (2004). "Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening?" *Lancet* 363(9417): 1283-1285.
- Na, H. K. und Y. J. Surh (2008). "Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG." *Food and Chemical Toxicology* 46(4): 1271-1278.
- Nagasaka, T., N. Tanaka, H. M. Cullings, D. S. Sun, H. Sasamoto, T. Uchida, M. Koi, N. Nishida, Y. Naomoto, C. R. Boland, N. Matsubara und A. Goel (2009). "Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia." *J Natl Cancer Inst* 101(18): 1244-1258.
- Nan, X., F. J. Campoy und A. Bird (1997). "MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin." *Cell* 88(4): 471-481.
- Nan, X., R. R. Meehan und A. Bird (1993). "Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2." *Nucleic Acids Res* 21(21): 4886-4892.
- Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman und A. Bird (1998). "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." *Nature* 393(6683): 386-389.
- Natsume, M., N. Osakabe, M. Oyama, M. Sasaki, S. Baba, Y. Nakamura, T. Osawa und J. Terao (2003). "Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat." *Free Radical Biology and Medicine* 34(7): 840-849.
- Németh, K., G. W. Plumb, J. G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H. Y. Naim, G. Williamson, D. M. Swallow und P. A. Kroon (2003). "Deglycosylation by small intestinal epithelial cell -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans." *European journal of nutrition* 42(1): 29-42.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt und C. B. Pickett (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." *Annual review of pharmacology and toxicology* 43(1): 233-260.
- Norat, T., S. Bingham, P. Ferrari, N. Slimani, M. Jenab, M. Mazuir, K. Overvad, A. Olsen, A. Tjønneland und F. Clavel (2005). "Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition." *Journal of the National Cancer Institute* 97(12): 906-916.
- Numazawa, S., M. Ishikawa, A. Yoshida, S. Tanaka und T. Yoshida (2003). "Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress." *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2): C334-342.

- Nuovo, G. J., T. W. Plaia, S. A. Belinsky, S. B. Baylin und J. G. Herman (1999). "In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12754-12759.
- Ogawa, K., J. Sun, S. Taketani, O. Nakajima, C. Nishitani, S. Sassa, N. Hayashi, M. Yamamoto, S. Shibahara, H. Fujita und K. Igarashi (2001). "Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1." *EMBO J* 20(11): 2835-2843.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber und E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* 99(3): 247-257.
- Okano, M., S. Xie und E. Li (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nat Genet* 19(3): 219-220.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman, P. L. Zock und M. B. Katan (2001a). "Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans." *Am J Clin Nutr* 73(3): 532-538.
- Olthof, M. R., P. C. H. Hollman und M. B. Katan (2001b). "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans." *The Journal of nutrition* 131(1): 66.
- Olthof, M. R., P. C. H. Hollman, T. B. Vree und M. B. Katan (2000). "Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans." *The Journal of nutrition* 130(5): 1200.
- Oppermann, U. (2007). "Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 293-322.
- Osborn, N. K. und D. A. Ahlquist (2005). "Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches." *Gastroenterology* 128(1): 192-206.
- Osburn, W. O. und T. W. Kensler (2008). "Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults." *Mutat Res* 659(1-2): 31-39.
- Otterbein, L. E., M. P. Soares, K. Yamashita und F. H. Bach (2003). "Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme." *Trends Immunol* 24(8): 449-455.
- Park, E. Y. und H. M. Rho (2002). "The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element." *Mol Cell Biochem* 240(1-2): 47-55.

- Park, S. Y., B. H. Kim, J. H. Kim, N. Y. Cho, M. Choi, E. J. Yu, S. Lee und G. H. Kang (2007). "Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers." *J Korean Med Sci* 22(2): 311-317.
- Partik, G., P. Kahl-Rainer, R. Sedivy, A. Ellinger, W. Bursch und B. Marian (1998). "Apoptosis in human colorectal tumours: ultrastructure and quantitative studies on tissue localization and association with bak expression." *Virchows Arch* 432(5): 415-426.
- Perera, F. P. (1996). "Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention." *J Natl Cancer Inst* 88(8): 496-509.
- Petermann, A., C. Miene, G. Schulz-Raffelt, K. Palige, J. Hölzer, M. Glei und F. D. Böhmer (2009). "GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage." *Molecular nutrition & food research* 53(10): 1245-1253.
- Petko, Z., M. Ghiassi, A. Shuber, J. Gorham, W. Smalley, M. K. Washington, S. Schultenover, S. Gautam, S. D. Markowitz und W. M. Grady (2005). "Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps." *Clin Cancer Res* 11(3): 1203-1209.
- Pfaffl, M. W. (2004). "Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." *BIOSpektrum* 1(04): 92-95.
- Pradhan, S., A. Bacolla, R. D. Wells und R. J. Roberts (1999). "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." *J Biol Chem* 274(46): 33002-33010.
- Pradhan, S., D. Talbot, M. Sha, J. Benner, L. Hornstra, E. Li, R. Jaenisch und R. J. Roberts (1997). "Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase." *Nucleic Acids Res* 25(22): 4666-4673.
- Prawan, A., J. K. Kundu und Y. J. Surh (2005). "Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection." *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1688-1703.
- Prester, T., W. D. Holtzclaw, Y. Zhang und P. Talalay (1993). "Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 2965-2969.
- Radtke, J., J. Linseisen und G. Wolfram (1998). "Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]." *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 37(2): 190.
- Ramsahoye, B. H., D. Biniszkievicz, F. Lyko, V. Clark, A. P. Bird und R. Jaenisch (2000). "Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5237-5242.

- Rasmussen, S. E., H. Frederiksen, K. Struntze Krogholm und L. Poulsen (2005). "Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease." *Molecular nutrition & food research* 49(2): 159-174.
- Rechner, A. R., M. A. Smith, G. Kuhnle, G. R. Gibson, E. S. Debnam, S. K. Srail, K. P. Moore und C. A. Rice-Evans (2004). "Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products." *Free Radic Biol Med* 36(2): 212-225.
- Reed, J. A., F. Loganzo, Jr., C. R. Shea, G. J. Walker, J. F. Flores, J. M. Glendening, J. K. Bogdany, M. J. Shiel, F. G. Haluska, J. W. Fountain und et al. (1995). "Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression." *Cancer Res* 55(13): 2713-2718.
- Rhee, I., K. E. Bachman, B. H. Park, K. W. Jair, R. W. Yen, K. E. Schuebel, H. Cui, A. P. Feinberg, C. Lengauer, K. W. Kinzler, S. B. Baylin und B. Vogelstein (2002). "DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells." *Nature* 416(6880): 552-556.
- Rhee, I., K. W. Jair, R. W. Yen, C. Lengauer, J. G. Herman, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. B. Baylin und K. E. Schuebel (2000). "CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1." *Nature* 404(6781): 1003-1007.
- Rios, L. Y., R. N. Bennett, S. A. Lazarus, C. Rémésy, A. Scalbert und G. Williamson (2002). "Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans." *The American journal of clinical nutrition* 76(5): 1106.
- Robertson, K. D. (2001). "DNA methylation, methyltransferases, and cancer." *Oncogene* 20(24): 3139-3155.
- Robertson, K. D., E. Uzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F. A. Gonzales und P. A. Jones (1999). "The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors." *Nucleic Acids Res* 27(11): 2291-2298.
- Robertson, K. D. und A. P. Wolffe (2000). "DNA methylation in health and disease." *Nat Rev Genet* 1(1): 11-19.
- Rocco, J. W. und D. Sidransky (2001). "p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression." *Exp Cell Res* 264(1): 42-55.
- Rodríguez-Ramiro, I., S. Ramos, L. Bravo, L. Goya und M. Á. Martín (2011). "Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress." *European journal of nutrition*: 1-12.

- Rosignoli, P., R. Fabiani, A. De Bartolomeo, F. Spinozzi, E. Agea, M. A. Pelli und G. Morozzi (2001). "Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells." *Carcinogenesis* 22(10): 1675-1680.
- Ross, D., J. K. Kepa, S. L. Winski, H. D. Beall, A. Anwar und D. Siegel (2000). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms." *Chem Biol Interact* 129(1-2): 77-97.
- Roth, M., Dissertation (2010). "Antioxidative Wirkung und Hemmung des EGFR durch Apfelinhaltsstoffe." Universitätsbibliothek Karlsruhe
- Ruas, M. und G. Peters (1998). "The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives." *Biochim Biophys Acta* 1378(2): F115-177.
- Rushmore, T. H., R. G. King, K. E. Paulson und C. B. Pickett (1990). "Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(10): 3826-3830.
- Rushmore, T. H., M. R. Morton und C. B. Pickett (1991). "The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity." *J Biol Chem* 266(18): 11632-11639.
- Russo, A. A., L. Tong, J. O. Lee, P. D. Jeffrey und N. P. Pavletich (1998). "Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a." *Nature* 395(6699): 237-243.
- Saavedra, O. M., L. Isakovic, D. B. Llewellyn, L. Zhan, N. Bernstein, S. Claridge, F. Raeppl, A. Vaisburg, N. Elowe und A. J. Petschner (2009). "SAR around (l)-S-adenosyl-l-homocysteine, an inhibitor of human DNA methyltransferase (DNMT) enzymes." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19(10): 2747-2751.
- Salinas, F. V., J. M. Neal, L. A. Sueda, D. J. Kopacz und S. S. Liu (2004). "Prospective comparison of continuous femoral nerve block with nonstimulating catheter placement versus stimulating catheter-guided perineural placement in volunteers." *Reg Anesth Pain Med* 29(3): 212-220.
- Sano, A., J. Yamakoshi, S. Tokutake, K. Tobe, Y. Kubota und M. Kikuchi (2003). "Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67(5): 1140-1143.
- Santi, D. V., A. Norment und C. E. Garrett (1984). "Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22): 6993-6997.

- Saxonov, S., P. Berg und D. L. Brutlag (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1412-1417.
- Schaefer, S., M. Baum, G. Eisenbrand, H. Dietrich, F. Will und C. Janzowski (2006). "Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines." *Mol Nutr Food Res* 50(1): 24-33.
- Schäfer, S., Dissertation (2006). "Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen." Universitätsbibliothek
- Scharf, G., S. Prustomersky, S. Knasmüller, R. Schulte-Hermann und W. W. Huber (2003). "Enhancement of glutathione and γ -glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2." *Nutr Cancer* 45(1): 74-83.
- Schieber, A., P. Hilt und P. Streker (2003). "A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace* 1." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4(1): 99-107.
- Schlager, J. J. und G. Powis (1990). "Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor)oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol." *Int J Cancer* 45(3): 403-409.
- Schneider, H., A. Schwiertz, M. D. Collins und M. Blaut (1999). "Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract." *Arch Microbiol* 171(2): 81-91.
- Schoefer, L., R. Mohan, A. Schwiertz, A. Braune und M. Blaut (2003). "Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*." *Applied and environmental microbiology* 69(10): 5849.
- Segura-Aguilar, J. und C. Lind (1989). "On the mechanism of the Mn³⁺-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase." *Chem Biol Interact* 72(3): 309-324.
- Seow, A., J. M. Yuan, C. L. Sun, D. Van Den Berg, H. P. Lee und M. C. Yu (2002). "Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study." *Carcinogenesis* 23(12): 2055-2061.
- Shahidi, F. und M. Naczk (1995). *Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications, Technomic.*

- Shao, X., N. Bai, K. He, C. T. Ho, C. S. Yang und S. Sang (2008). "Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species." *Chemical research in toxicology* 21(10): 2042-2050.
- Shapiro, T. A., J. W. Fahey, K. L. Wade, K. K. Stephenson und P. Talalay (2001). "Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 10(5): 501-508.
- Shibutani, S., M. Takeshita und A. P. Grollman (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349(6308): 431-434.
- Siegel, D. und D. Ross (2000). "Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues." *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 246-253.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." *Eur J Biochem* 215(2): 213-219.
- Singal, R. und G. D. Ginder (1999). "DNA methylation." *Blood* 93(12): 4059-4070.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice und E. L. Schneider (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Experimental cell research* 175(1): 184-191.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney und M. R. Boyd (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107-1112.
- Skrbek, S., C. E. Rüfer, D. Marko und M. Esselen (2009). "Quercetin and its microbial degradation product 3,4-dihydroxyphenylacetic acid generate hydrogen peroxide modulating their stability under in vitro conditions." *Journal of Food and Nutrition Research* 48(3): 129-140.
- Song, K., A. M. Fendrick und U. Ladabaum (2004). "Fecal DNA testing compared with conventional colorectal cancer screening methods: a decision analysis." *Gastroenterology* 126(5): 1270-1279.
- Soyalan, B., (2010). "Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Apfelsäften und polyphenolischen Inhaltsstoffen in-vitro und an Ratten." *Universitätsbibliothek*
- Soyalan, B., J. Minn, H. J. Schmitz, D. Schrenk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2011). "Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver." *European journal of nutrition*: 1-9.
- Spencer, J. P. E., F. Chaudry, A. S. Pannala, S. K. Srai, E. Debnam und C. Rice-Evans (2000). "Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu." *Biochemical and biophysical research communications* 272(1): 236-241.

- Spitz, M. R., C. M. Duphorne, M. A. Detry, P. C. Pillow, C. I. Amos, L. Lei, M. de Andrade, X. Gu, W. K. Hong und X. Wu (2000). "Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(10): 1017-1020.
- Statistik-Austria (2008). Krebsinzidenz (Neuerkrankungen pro Jahr) nach Lokalisationen und Geschlecht, Österreich seit 1983, Österreichisches Krebsregister: 2.
- Statistik-Austria. (2009/10). "Durchschnittlicher monatlicher Verbrauch zuhause konsumierter Lebensmittel und Getränke."
- Steele, W., C. Allegrucci, R. Singh, E. Lucas, H. Priddle, C. Denning, K. Sinclair und L. Young (2005). "Human embryonic stem cell methyl cycle enzyme expression: modelling epigenetic programming in assisted reproduction?" *Reprod Biomed Online* 10(6): 755-766.
- Stirzaker, C., D. S. Millar, C. L. Paul, P. M. Warnecke, J. Harrison, P. C. Vincent, M. Frommer und S. J. Clark (1997). "Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors." *Cancer Res* 57(11): 2229-2237.
- Stresemann, C., B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper und F. Lyko (2006). "Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines." *Cancer Res* 66(5): 2794-2800.
- Surh, Y. J., J. K. Kundu und H. K. Na (2008). "Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals." *Planta Med* 74(13): 1526-1539.
- Suzuki, H., D. N. Watkins, K. W. Jair, K. E. Schuebel, S. D. Markowitz, W. D. Chen, T. P. Pretlow, B. Yang, Y. Akiyama, M. Van Engeland, M. Toyota, T. Tokino, Y. Hinoda, K. Imai, J. G. Herman und S. B. Baylin (2004). "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer." *Nat Genet* 36(4): 417-422.
- Szyf, M., P. Pakneshan und S. A. Rabbani (2004). "DNA methylation and breast cancer." *Biochem Pharmacol* 68(6): 1187-1197.
- Tan, S., C. Wang, C. Lu, B. Zhao, Y. Cui, X. Shi und X. Ma (2009). "Quercetin is able to demethylate the p16INK4a gene promoter." *Chemotherapy* 55(1): 6-10.
- Tanigawa, S., M. Fujii und D. X. Hou (2007). "Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin." *Free Radic Biol Med* 42(11): 1690-1703.
- Tate, P. H. und A. P. Bird (1993). "Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression." *Curr Opin Genet Dev* 3(2): 226-231.

- Teller, N., Dissertation (2010). "Hemmprofile ausgewählter Polyphenole und polyphenolreicher Extrakte auf Kanzerogeneseassoziierte Rezeptortyrosinkinasen." Universität Wien
- Tenhunen, R., H. S. Marver und R. Schmid (1968). "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(2): 748-755.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu und Y. F. Sasaki (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environ Mol Mutagen* 35(3): 206-221.
- Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." *Anal Biochem* 27(3): 502-522.
- Tong, K. I., Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka und M. Yamamoto (2006a). "Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model." *Mol Cell Biol* 26(8): 2887-2900.
- Tong, K. I., A. Kobayashi, F. Katsuoka und M. Yamamoto (2006b). "Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism." *Biol Chem* 387(10-11): 1311-1320.
- Towler, B., P. G. Les Irwig, J. Kewenter, D. Weller und C. Silagy (1998). "A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult." *BMJ: British Medical Journal* 317(7158): 559.
- Townsend, D. M. (2007). "S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response." *Mol Interv* 7(6): 313-324.
- Toyokuni, S. (1998). "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation." *Biotherapy* 11(2-3): 147-154.
- Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin und J. P. Issa (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15): 8681-8686.
- Traverso, G., A. Shuber, B. Levin, C. Johnson, L. Olsson, D. J. Schoetz, Jr., S. R. Hamilton, K. Boynton, K. W. Kinzler und B. Vogelstein (2002). "Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors." *N Engl J Med* 346(5): 311-320.
- Treptow-van Lishaut, S., G. Rechkemmer, I. Rowland, P. Dolara und B. L. Pool-Zobel (1999). "The carbohydrate crystalline and colonic microflora modulate expression of glutathione S-transferase subunits in colon of rats." *Eur J Nutr* 38(2): 76-83.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic und M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.

- Van Amelsvoort, J., K. Van Het Hof, J. Mathot, T. Mulder, A. Wiersma und L. Tijburg (2001). "Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans." *Xenobiotica* 31(12): 891-901.
- Veeriah, S., T. Hofmann, M. Glei, H. Dietrich, F. Will, P. Schreier, B. Knaup und B. L. Pool-Zobel (2007). "Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29)." *J Agric Food Chem* 55(8): 2892-2900.
- Veeriah, S., T. Kautenburger, N. Habermann, J. Sauer, H. Dietrich, F. Will und B. L. Pool-Zobel (2006). "Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics." *Mol Carcinog* 45(3): 164-174.
- Veeriah, S., C. Miene, N. Habermann, T. Hofmann, S. Klenow, J. Sauer, F. Bohmer, S. Wolfl und B. L. Pool-Zobel (2008). "Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells." *Int J Cancer* 122(12): 2647-2655.
- Veigl, M. L., L. Kasturi, J. Olechnowicz, A. H. Ma, J. D. Lutterbaugh, S. Periyasamy, G. M. Li, J. Drummond, P. L. Modrich, W. D. Sedwick und S. D. Markowitz (1998). "Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8698-8702.
- Venugopal, R. und A. K. Jaiswal (1996). "Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14960-14965.
- Wade, P. A. (2001). "Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression." *Bioessays* 23(12): 1131-1137.
- Wakabayashi, N., A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, M. I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T. W. Kensler und P. Talalay (2004). "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2040-2045.
- Walgren, R. A., J. T. Lin, R. K. Kinne und T. Walle (2000). "Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1." *J Pharmacol Exp Ther* 294(3): 837-843.
- Wang, H. und J. A. Joseph (1999). "Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader1." *Free Radical Biology and Medicine* 27(5-6): 612-616.
- Was, H., J. Dulak und A. Jozkowicz (2010). "Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy." *Curr Drug Targets* 11(12): 1551-1570.

- Watzl, B. und G. Rechkemmer (2001). "Flavonoide." *Ernährungs-Umschau* 48(12): 498-502.
- Weitzman, S. A., P. W. Turk, D. H. Milkowski und K. Kozlowski (1994). "Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4): 1261-1264.
- Widschwendter, M. und P. A. Jones (2002). "The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. Commentary re: J. Kwong et al., Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 131-137, 2002, and H-Z. Zou et al., Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 8: 188-191, 2002." *Clin Cancer Res* 8(1): 17-21.
- Winkel-Shirley, B. (2001). "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology." *Plant physiology* 126(2): 485.
- Wong, D. J., S. A. Foster, D. A. Galloway und B. J. Reid (1999). "Progressive region-specific de novo methylation of the p16 CpG island in primary human mammary epithelial cell strains during escape from M(0) growth arrest." *Mol Cell Biol* 19(8): 5642-5651.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton und N. D. Turner (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." *J Nutr* 134(3): 489-492.
- Xie, S., Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. W. He, K. Okumura und E. Li (1999). "Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family." *Gene* 236(1): 87-95.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi und D. Beach (1993). "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." *Nature* 366(6456): 701-704.
- Yang, Y., Y. Chen, E. Johansson, S. N. Schneider, H. G. Shertzer, D. W. Nebert und T. P. Dalton (2007). "Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase." *Biochem Pharmacol* 74(2): 372-381.
- Yano, S. und D. F. Tierney (1989). "Butyrate increases catalase activity and protects rat pulmonary artery smooth muscle cells against hyperoxia." *Biochem Biophys Res Commun* 164(3): 1143-1148.
- Yao, K. S., A. K. Godwin, S. W. Johnson, R. F. Ozols, P. J. O'Dwyer und T. C. Hamilton (1995). "Evidence for altered regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression among cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines." *Cancer Res* 55(19): 4367-4374.
- Yao, P., A. Nussler, L. Liu, L. Hao, F. Song, A. Schirmeier und N. Nussler (2007). "Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways." *J Hepatol* 47(2): 253-261.

- Yoo, C. B. und P. A. Jones (2006). "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(1): 37-50.
- Yu, X. und T. Kensler (2005). "Nrf2 as a target for cancer chemoprevention." *Mutat Res* 591(1-2): 93-102.
- Zessner, H., L. Pan, F. Will, K. Klimo, J. Knauff, R. Niewohner, W. Hummer, R. Owen, E. Richling, N. Frank, P. Schreier, H. Becker und C. Gerhauser (2008). "Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential." *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1: S28-44.
- Zhao, B., Q. Guo und W. Xin (2001). "Free radical scavenging by green tea polyphenols." *Methods in Enzymology* 335: 217-231.
- Zhu, H., K. Itoh, M. Yamamoto, J. L. Zweier und Y. Li (2005). "Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury." *FEBS Lett* 579(14): 3029-3036.
- Zhu, M. und W. E. Fahl (2001). "Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element." *Biochem Biophys Res Commun* 289(1): 212-219.
- Zhu, X., W. G. Fan, D. P. Li, H. Kung und M. C. Lin (2011). "Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: a short review." *World J Gastroenterol* 17(38): 4283-4288.
- Zipper, L. M. und R. T. Mulcahy (2003). "Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells." *Toxicological Sciences* 73(1): 124.

8 Anhangsverzeichnis

8.1	Abstrakt der Dissertation (deutsch)	I
8.2	Abstract (English)	II
8.3	Publikationsliste	III
8.4	Formelverzeichnis	V
8.5	Dank	VI
8.6	Lebenslauf	VII

8.1 Abstrakt der Dissertation (deutsch)

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Beeinflussung der Promotormethylierung durch einen Bohnapfelextrakt (BAE) und dessen Hauptinhaltsstoff n-Chlorogensäure (CGA) auf das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) und im Rahmen einer Pilotstudie an Typ-II Diabetes Patienten.

Sowohl für BAE als auch für CGA konnte vereinzelt eine Abnahme der DNA-Methylierung des p16^{INK4a} Promotors nach 48 h und 96 h beobachtet werden, wobei sich keine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit darstellte. Darüber hinaus zeigte sich für keine der beiden Testsubstanzen eine Reaktivierung des Tumorsuppressors auf Transkriptions- und Proteinebene. Im Rahmen einer Pilotstudie an Typ-II Diabetikern konnte bei 2 von 15 Probanden eine Methylierung des p16^{INK4a} Promotors in abgeschilferten Kolonozyten aus Humanfäzes bestimmt werden. Nach vierwöchigem Konsum von naturtrübem Apfelsaft zeigte sich eine Verringerung der Promotormethylierung von p16^{INK4a} bei diesen Probanden.

Im Fokus des zweiten Abschnitts dieser Dissertation stand die Frage inwiefern polyphenolreiche Apfeltresterextrakte (AT) aus entpektinisiertem Trester den intrazellulären Redoxstatus von HT29-Zellen beeinflussen und wie ihre Wirkstärke im Vergleich zu analog hergestellten Extrakten aus Apfelsaft (AS) einzustufen ist. Die Untersuchungen ergaben, dass AT gegenüber AS eine signifikant höhere Bioaktivität hinsichtlich einer Verringerung intrazellulärer ROS und einer Erhöhung der Transkripte des Enzyms γ -Glutamylcysteinylase (γ -GCL) besitzt. Weiterführende Experimente mit AT ließen darüber hinaus eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs und eine verstärkte Transkription ausgewählter Enzyme des Phase-II Metabolismus erkennen.

Untersuchungen der Leitverbindungen von AT im Zuge einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung ergaben, dass Phloretin und Quercetin einen geringen Beitrag zur Gesamtaktivität des komplexen Extrakts leisten. Dennoch müssen weitere, bisher nicht identifizierte Inhaltsstoffe in AT vorhanden sein, da die Wirkstärke weder durch die Leitverbindungen, noch durch die bekannten Einzelverbindungen erklärt werden kann.

Ferner konnte anhand eines verdauungsmimetischen Ansatzes gezeigt werden, dass mit steigender Fermentationsdauer der Extrakte tendenziell eine Abnahme der Bioaktivität statt-

findet, sie jedoch nicht verloren geht, was insbesondere für aufbauende *in vivo* Untersuchungen von Bedeutung ist.

8.2 Abstract (English)

In the focus of the first part of this work was the modulation of the promoter methylation of the tumor suppressor gene p16^{INK4a} by an extract of Bohnapfel (BAE) as well as its main constituent n-chlorogenic acid (CGA) in both, human colon carcinoma cells (HT29) and during a pilot intervention trial with type-II diabetic patients.

BAE as well as CGA partially displayed a decrease in DNA methylation of the p16^{INK4a} promoter after 48 h and 96 h incubation, however not in a time- and concentration-dependent manner. In addition, none of the two test compounds showed a re-activation of the tumor suppressor on both, transcription and protein levels. In a pilot trial with type-II diabetics 2 of 15 subjects reflected a methylation of the p16^{INK4a} promoter in exfoliated colonocytes of human faeces. After four weeks of intervention with cloudy apple juice a reduction of the p16^{INK4a} promoter methylation was observed in these two subjects.

The focus of the second section of this thesis was the question whether polyphenol-rich apple pomace extracts (AT), obtained from depectinized pomace, are able to affect the intracellular redox state of HT29 cells allowing the classification of their potency compared to similarly prepared extracts of apple juice (AS).

The studies showed that AT possesses a significantly higher bioactivity than AS regarding the reduction of intracellular ROS as well as the increase of the transcription of the enzyme γ -glutamylcysteinylase (γ -GCL). Further investigations indicated an activation of the Nrf2-ARE pathway and a downstream induction of selected enzymes of the phase-II metabolism. In the course of the activity-guided fractionation phloretin and quercetin could be identified as constituents, probably contributing to the total activity of the native AT. Nonetheless, a presence of yet unidentified constituents, possessing a high bioactivity seems to be likely, since the effect of the native extract cannot be explained by the effects reflected by the so far known individual constituents.

Furthermore, using a digestive mimetic system a decrease of bioactivity with an increase in fermentation time of extracts became apparent. Nevertheless, the bioactivity is not completely lost, which is of special importance with respect to ongoing *in vivo* studies.

8.3 Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

Blust V., Pahlke G., Fridrich D., Seifert S., Bub A., Marko D. Impact of apple polyphenols on promoter methylation of the tumor suppressor p16^{INK4a}
(in Bearbeitung)

Blust V., Roth M., Maser E., Lebherz J., Fromm M., Heiss E., Dirsch VM., Kammerer D., Carle R., Marko D. Antioxidative and DNA-protective properties of pectin-free apple pomace extracts by activating Nrf2-ARE signaling and cellular defense in human colon carcinoma cells.
(in Bearbeitung)

Roth M., Teller N., Volz N., **Blust V.**, Thiele W., Sleeman J., Pahlke G., Esselen M., Marko D. Impact of apple polyphenols on receptor tyrosine kinase signalling. (in Bearbeitung)

Tagungsbeiträge

09. 2008 **Blust V.**, Pahlke G., Marko D. „Einfluss von polyphenolreichen Apfelextrakten und 5-O-Kaffeoylchinasäure auf das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}“. **Posterbeitrag**, Deutscher Lebensmittelchemikertag 2008 (Kaiserslautern)

11. 2008 **Vortrag** beim Netzwerktreffen des BMBF-Verbundprojekts „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmerkrankungen und Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung“ in Kaiserslautern - Zelluläre Wirkmechanismen der Chemoprotektion durch Lebensmittelinhaltsstoffe im Kolon.

02. 2010 **Blust V.**, Pahlke G., Marko D. „Einfluss eines polyphenolreichen Apfelextraktes und Chlorogensäure auf die Reexpression des Tumorsuppressorgens p16^{INK4a}“. **Posterbeitrag**, Austrian Society of Toxicology (ASTOX)

03. 2010 **Vortrag** beim AiF/FEI-Verbundprojekt „Bioaktive Inhaltsstoffe mit gesundheitsförderndem Potential aus Nebenprodukten der Apfelsaftherstellung und der Apfelpektinengewinnung: *In vitro*-Charakterisierung des Wirkprofils und Anreicherung wertgebender Komponenten“ in Stuttgart-Hohenheim.
05. 2010 **Blust V.**, Roth M., Maser E., Fromm M., Kammerer D., Carle R., Marko D. „Antioxidative Wirkungen von Apfelpolyphenolen in-vitro“. **Posterbeitrag**, Österreichische Lebensmittelchemiker-Tage 2010 der Gesellschaft Österreichischer Chemiker (GÖCH), 19. – 21. Mai 2010
09. 2010 **Blust V.**, Roth M., Fromm M., Kammerer D., Carle R., Marko D. „In vitro Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung polyphenolreicher Apfeltrestereextrakte“. **Posterbeitrag**, Deutscher Lebensmittelchemikertag 2010 (Stuttgart-Hohenheim)
05. 2011 **Vortrag** im Rahmen des Start-up meetings BioProMotion (Initiativkolleg der Universität Wien) „Biological activities of apple pomace extracts“ in Wien.

8.4 Formelverzeichnis

Lineare Regression

$$y = m \cdot x + b$$

y-Achsenabschnitt (A):

$$A = \frac{\left(\sum_i y_i \right) \left(\sum_i x_i^2 \right) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i (x_i \cdot y_i) \right)}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n \sum_i (x_i \cdot y_i) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i y_i \right)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i \right)^2$$

Fehler der Steigung (m_B):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnittes (m_A):

$$m_A = \sqrt{\frac{S \sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

Arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$)

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung (σ_{n-1})

$$\sigma_{n-1} = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ausreißertest nach Nalimov (r)

$$r = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\sigma_{n-1}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}} \quad x^* : \text{Testwert}$$

Ausreißerkriterium: x^* = Ausreißer, wenn $r >$

1,409	bei n = 3
1,645	bei n = 4
1,757	bei n = 5
1,814	bei n = 6
1,848	bei n = 7
1,870	bei n = 8

8.5 Dank

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Doris für die Überlassung des interessanten Themas, die vielen Anregungen und das in mich gesetzte Vertrauen.
- Gudrun für ihre Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Tipps im Zuge der MS-PCR und den Transkriptionsuntersuchungen.
- Allen Projektpartnern des BMBF-Netzwerks „Ernährung und Darmgesundheit“ und den Kollegen des AiF-Projekts 15617N für die freundliche Zusammenarbeit.
- Prof. Dietrich und Prof. Carle, sowie Dr. Stefanie Seifert für die Bereitstellung der Testsubstanzen und Proben der Humanstudie.
- Elke Heiss für die Durchführung des Nrf2-Luciferase Assays.
- Meinen Korrekturleserinnen Nadine, Nicole und Gudrun für die konstruktive Kritik.
- Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des AK Marko: Christopher, Ute, Helge, Christoph, Swantje, Simone, Anika, Gudrun, Gergely, Christine, Liz, Nicole, Nadine, Joanna, Melanie, Markus, Matthias, Diana. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die entspannte Arbeitsatmosphäre.
- Meiner Diplomandin Julia Leberherz für ihr Engagement und die nette Zusammenarbeit während ihrer „Piefke-Zeit“ in Wien.
- Helge für die lustigen Jahre während des Studiums und der Dissertation, den unzähligen Diskussionen über meist belanglose Themen bei „schlechtem Kaffee“, die stete Hilfsbereitschaft und vor allem, dass der Freundschaft die räumliche Bürotrennung in keinster Weise geschadet hat!
- Nadine und Nicole danke ich für die lustige Zeit im Labor und den Unternehmungen abseits des Laboralltags. Vor allem jedoch für die Hilfe in den letzten Monaten.
- Meinen Eltern, die mich nicht nur in beruflicher Hinsicht immer unterstützen!
- Maik, danke für alles!

8.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Volker Blust
Akademischer Grad: Diplom Lebensmittelchemiker (Dipl.-LMChem.)
Geburtsdatum: 07. Juli 1982
Geburtsort: VS-Schwenningen (Deutschland)
Wohnort: Brunnengasse 42/2/226
1160 Wien, Österreich
eMail: volker.blust@googlemail.com

Schulausbildung

09. 1988 – 06. 1992 Grundschule, Aubertschule, Deißlingen

09. 1992 – 07. 1998 Realschule, Rottweil

09. 1998 – 06. 2001 Albert-Schweitzer-Schule, Berufliches Gymnasium ernäh-
rungswissenschaftliche Richtung, VS-Villingen
Abschluss: Abitur

Wehrersatzdienst

09.2001 – 03. 2002 Durchführung des Wehrersatzdienstes bei der Lebenshilfe eV
in Villingen-Schwenningen

Studienverlauf

10. 2002 – 09. 2004 Studium der Chemie an der Universität Karlsruhe (TH)

10. 2004 – 02. 2008 Fachrichtungswechsel, Studium der Lebensmittelchemie an der
Universität Karlsruhe (TH)

Anhang

02. 2005	Erster Abschnitt (Vorprüfung) der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
06. 2007	Zweiter Prüfungsabschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
07. 2007 – 02. 2008	Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe am Institut für Angewandte Biowissenschaften Abteilung: Lebensmitteltoxikologie Titel der Diplomarbeit: „Einfluss von Polyphenolen auf das Tumorsuppressorgen p16 ^{INK4a} “
02. 2008	Abschluss des Studiengangs Diplom Lebensmittelchemie
03. 2008 – 04. 2009	Dissertationsstudium im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. D. Marko an der Universität Karlsruhe, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie Titel der Dissertation: „Apfelextrakte als Modulatoren der DNA-Methylierung und Induktoren der Nrf2-ARE assoziierten antioxidativen Abwehr“
seit 04. 2009	Fortsetzung des Dissertationsstudiums an der Universität Wien, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. D. Marko

Berufliche Fortbildung

seit 02. 2010	Weiterbildung zum Fachtoxikologen der DGPT: Molekulare Zelltoxikologie Fremdstoffmetabolismus/ Toxikokinetik Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie Organtoxikologie und -pathologie II
---------------	--

Anhang

Hiermit bestätige ich, Volker Blust die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Wien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Wien, den 08.02.2012
