Modulation oxidativer Zellschäden durch phenolische Apfelsaftinhaltsstoffe und deren intestinale Abbauprodukte in humanen Kolonzellen

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
eingereichte Dissertation

vorgelegt von:

Diplom-Chemiker
Phillip Bellion

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.12.2009
(D386)

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2006 bis Juni 2009 im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.12.2009

Prüfungskommission

Vorsitzender:	Prof. Dr. G. Niedner-Schatteburg
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Prof. G. Eisenbrand und Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und die Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

Abkürzungsverzeichnis 4

1. Einleitung 8

2. Problemstellung 10

3. Theoretische Grundlagen 13

3.1. Der Darm 13
3.1.1. Das Verdauungssystem 13
3.1.2. Anatomie und Physiologie des Darms 13
3.1.3. Das Darmepithel 14
3.1.4. Die intestinale Mikroflora 16
3.1.5. Pathophysiologie des Darms 17
3.1.5.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen 17
3.1.5.2. Darmkrebs 18
3.2. Reaktive Sauerstoffspezies und Oxidativer Stress 23
3.2.1. Reaktive Sauerstoffspezies 23
3.2.2. Oxidativer Stress 27
3.2.2.1. DNA-Schädigung 27
3.2.2.2. oxidative Proteinmodifikationen 31
3.2.2.3. Lipidperoxidation 32
3.3. Antioxidative Abwehrmechanismen 33
3.3.1. Primäre endogene Abwehr 33
3.3.1.1. Endogene Antioxidanzien 33
3.3.1.2. Exogene Antioxidanzien 35
3.3.1.3. Antioxidativ wirksame Proteine 36
3.3.1.4. Das antioxidant responsive element (ARE) 38
3.3.2. Sekundäre endogene Abwehr / Reparatur oxidativer Zellschäden 38
3.3.2.1. DNA 38
3.3.2.2. Proteine 39
3.3.2.3. Lipide 40
3.4. Flavonoide und Polyphenole 40
3.4.1. Struktur und Vorkommen 40
3.4.1.1. Phenolsäuren 41
3.4.1.2. Flavonoide 42
3.4.1.3. Dihydrochalcone 45
3.4.2. Pharmakokinetik der Polyphenole 45
3.4.2.1. Absorption 45
3.4.2.2. Verteilung 46
3.4.2.3. Metabolismus 47
3.4.2.4. Ausscheidung 49
3.4.2.5. Bakterieller Metabolismus im Kolon 50
3.4.3. Antioxidative Wirksamkeit der Polyphenole 54
3.4.3.1. Reduktion 55
3.4.3.2. Komplexierung von Metallionen 59
3.4.4. Biologische Wirkungen von Polyphenolen 61
3.4.4.1. Modulation des Fremdstoff-Metabolismus 61
3.4.4.2. Einfluss auf die DNA-Reparatur 62
3.4.4.3. Proliferationshemmende Effekte 62
3.4.4.4. Einfluss auf Entzündungsreaktionen 63
3.4.5. Adverse Effekte 64
3.4.5.1. Mutagenität und Genotoxizität 64
3.4.5.2. Prooxidative Eigenschaften 64

3.5. Apfelsaft und seine Inhaltsstoffe 67
Herstellung von Apfelsaft 68
3.5.1. Polyphenolprofil von Apfelsaft 68
3.5.2. Apfelsaft-Trub 71
3.6. Polyphenolische Extrakte aus Äpfeln, fermentierte Extrakte und fermentierter Trub 71
3.6.1. Herstellung der Apfelsaftextrakte 71
3.6.2. Zusammensetzung der Apfelsaftextrakte 72
3.6.3. Herstellung / Zusammensetzung der Apfelschalenextrakte 75
3.6.4. Herstellung der untersuchten *in vitro*-Fermentate aus Apfelsaftextrakt 76
3.6.5. Herstellung der untersuchten *in vitro*-Fermentate aus Apfelsaft-Trub 76
3.7. Testmethoden 77
3.7.1. Verwendete Zelllinien 77
3.7.2. Bestimmung der Viabilität (Trypanblau-Ausschlusstest) 78
3.7.3. Induktion von (moderatem) oxidativem Stress 78
3.7.3.1. Menadion 79
3.7.3.2. tert-Butylhydroperoxid 80
3.7.3.3. AAPH 81
3.7.4. Proteinquantifizierung 82
3.7.4.1. BCA-Assay 82
3.7.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford 83
3.7.5. Bestimmung des Glutathiongehaltes 84
3.7.6. Detektion (oxidativer) DNA-Schäden (Comet Assay) 85
3.7.7. Zellulärer Redox-Status (DCF-Assay) 87
3.7.8. Untersuchung der Proteinexpression (Western Blot) 89
3.7.9. Quantifizierung von Wasserstoffperoxid (FOX1-Assay) 92
3.7.10. zellfreie Prüfung auf antioxidative Wirksamkeit 93
3.7.10.1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) 94
3.7.10.2. Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) 95
3.7.11. Analytik der fermentierten Apfelsaftextrakte 97

4. Ergebnisse und erste Diskussion 99

4.1. Antioxidative Wirksamkeit phenolischer Extrakte aus Äpfeln 99
4.1.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC / ORAC) 99
4.1.2. Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels 102
4.1.3. Modulation des Glutathion-Spiegels 104
4.1.4. Modulation ROS-induzierter DNA-Schäden 107
4.1.5. Modulation der SOD1-Expression 110
4.1.6. Antioxidative Wirksamkeit ausgesuchter Apfelsaft-Polyphenole 111
4.1.6.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (ORAC) 111
4.1.6.2. Modulation der SOD1-Expression 113
4.1.7. Zusammenfassung zur Wirksamkeit phenolischer Apfel-Extrakte und ausgewählter Polyphenole 114
4.2. Charakterisierung und antioxidative Wirksamkeit intestinaler Polyphenol-Abbauprodukte in fermentierten AEs 115
4.2.1. Charakterisierung phenolischer Abbauprodukte 117
4.2.2. Antioxidative Wirksamkeit phenolischer Abbauprodukte 120
4.2.2.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC) 120
4.2.2.2. Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels 122
4.2.3. Zusammenfassung der Charakterisierung und antioxidativen Wirksamkeit phenolischer Abbauprodukte 124
4.3. Antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaft-Trub 125
4.3.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC / ORAC) 126
4.3.2. Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels 126
4.3.3. Modulation des Glutathion-Spiegels 127
4.3.4. Modulation ROS-induzierter DNA-Schäden 128
4.3.5. Zusammenfassung der Wirksamkeit des fermentierten Trubs 129
4.4. Prooxidative Effekte von Polyphenolen und AEs 130

4.4.1. Einfluss des Zellkultur-Mediums 130
4.4.2. Prooxidative Effekte der AEs 136
4.4.3. Prooxidative Effekte ausgewählter Apfelsaft-Polyphenole 139
4.4.4. Zusatz antioxidativer Enzyme 142
4.4.5. Einfluss von extrazellulärem H_2O_2 auf zelluläre Marker 144
4.4.5.1. H_2O_2-Konzentration im Medium 144
4.4.5.2. Glutathion 145
4.4.5.3. Zellulärer ROS-Level 146
4.4.6. Zusammenfassung der prooxidativen Wirkung von Polyphenolen 147

5. Diskussion und Ausblick 149

6. Zusammenfassung 161

7. Material und Methoden 163

7.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien 163
7.2. Zellkultur 165
7.2.1. Kultivierung und Subkultivierung 165
7.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen 166
7.2.3. Testung auf Mykoplasmen 167
7.2.4. Aussäen der Zellen 168
7.2.5. Inkubation 168
7.2.6. Ernte der Zellen 168
7.3. Bestimmung von Zellzahl und Viabilität (Trypanblau Ausschlusstest) 169
7.4. Bestimmung des Proteingehaltes 169
7.4.1. BCA-Assay 169
7.4.2. Bradford-Assay 170
7.5. Glutathionbestimmung 171
7.6. (Oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay) 173
7.7. zellulärer Redox-Status (DCF-Assay) 175
7.8. Proteinexpression (Western Blot) 177
7.9. Quantifizierung von H_2O_2 (FOX-Assay) 181
7.10. Bestimmung der antioxidativen Wirksamkeit 182
7.10.1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 182
7.10.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 184
7.11. Analytik der fermentierten Apfelsaftextrakte 187
7.12. Statistik 189

8. Literaturverzeichnis 191

9. Anhang I

9.1. Nicht dargestellte Abbildungen und Tabellen I
9.2. Lebenslauf V
9.3. Publikationen und Tagungsbeiträge VII

Vielen Dank… X

Abkürzungsverzeichnis

Liste der untersuchten Extrakte und Substanzen

AE0*x*	Apfelsaftextrakt aus Saft der Ernte 200*x*
AE0*x*B	Tresterextrakt aus Äpfeln der Ernte 200*x*
GS	Apfelschalenextrakt aus Schalen der Sorte Granny Smith
PE	Apfelschalenextrakt aus Schalen verschiedener Sorten
CaA	*caffeic acid;* Kaffeesäure
ChA	*chlorogenic acid*; Chlorogensäure
CuA	*p-coumaric acid*; p-Cumarsäure
DHBA	3,4-Dihydroxyphenylbenzoesäure
DHCaA	3-(-3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure, Dihydrokaffeesäure
DHPAA	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)essigsäure
Epi	(-)-Epicatechin
3HPPA	3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure
4HPPA	3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure
4MC	4-Methylcatechol
Pt	Phloretin
Pxg	Phloretin-2'-O-xyloglucosid
Pz	Phloretin-2'-O-glucosid, Phloridzin
QiA	*(-)-quinic acid*; (-)-Chinasäure
Que	Quercetin
Rut	Quecetin-3-O-glucorhamnosid, Rutin

Abkürzungen

AAPH	2,2′-Azobis(2-methylpropionamidin)-dihydrochlorid
ABTS	2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure
ACF	abberante crypt foci
aFAP	attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis
APC	*adenomatous polyposis coli*; ein Tumorsuppressorgen
APS	Ammoniumpersulfat
AP-Stelle	apyrimidine / apurine Stelle (in der DNA)
ARE	*antioxidant responsive element*
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	*area under curve*
BCA	Bichinchinonsäure

BDE	Bindungs-Dissoziations-Energie
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BLU	Boehringer Light Units; Einheit zur Quantifizierung der Lumineszenz
BSA	*bovine serum albumine*; Rinderserumalbumin
cfu	*colony forming units*; Koloniebildende Einheiten
CAT	Katalase
CBG	cytosolische β-Glucosidase
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CU	Colitis ulcerosa
CYP	Cytochrom P450-abhängige Oxidoreduktase
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array Detektor, ein HPLC-Detektor
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DCC	*deleted in colorectal cancer*; an der Krebsentstehung beteiligtes Gen
DCFH/DCF	2'7'-Dichlorofluorescein, reduzierte / oxidierte Form
DCFH-DA	2'7'-Dichlorofluorescin-diacetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium; ein Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure (auch DNS)
DSB	Doppelstrangbruch der DNA
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$E^{0'}$	Standard-Redoxpotential
EGCG	Epigallocatechingallat
ERK	*Extracellular-signal Regulated Kinase*
ESI	Elektrospray-Ionisation
ET	Elektronen-Transfer
F12	Ham's Nutrition Mix F12; ein Zellkulturmedium
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FaPy	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FI	*fluorescence increase*; Fluoreszenzanstieg (Maßeinheit des DCF-Assay)
FKS	fötales Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FOX	*ferrous oxidation in xylenol orange*; zur Quantifizierung von H_2O_2
FW	*fresh weight*; Frischgewicht
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

γGCL	γ-Glutamylcystein-Ligase
GSH/GSSG	Glutathion, reduzierte / oxidierte Form
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSR	Glutathion-Reduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	*hydrogen atom transfer*; Wasserstoff-Atom-Transfer
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
HNPCC	hereditäres nicht-polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HPAEC	*high performance anion exchange chromatography*
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HRP	*horseraddish peroxidase*; Meerrettich-Peroxidase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Keap1	*kelch-like ECH-associated protein 1*
KRAS	*kirsten rat sarcoma*, an der Krebsentstehung beteiligtes Gen
LMA	*low melting agarose*; Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt
LPH	Laktase-Phloridzin-Hydrolase
LPO	Lipidperoxidation
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MC	Morbus Crohn
Md	Menadion
MDA	Malondialdehyd
MMR	*mismatch repair*; für die DNA-Reparatur wichtige Gruppe von Genen
MS	Massenspektrometrie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Mittelwert
MYH	auch MUTYH, *mutY homolog*; DNA-Reparaturgen
n	Anzahl unabhängiger Versuche
$NADH/NAD^+$	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte / oxidierte Form
$NADPH/NADP^+$	NAD-Phosphat, reduzierte / oxidierte Form
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NF-κB	*nuclear factor κB*; ein Transkriptionsfaktor
NMA	*normal melting agarose*; Agarose mit normalem Schmelzpunkt
NQO1	NADPH-abhängige Chinon-Oxidoreduktase 1
Nrf2	*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, ein Transkriptionsfaktor
ORAC	*oxygen radical absorbance capacity*
8-OH-dG	8-Hydroxy-Deoxyguanosin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	*phosphate buffered saline*; phosphatgepufferte Salzlösung
PCET	Protonen-gekoppelter Elektronen-Transfer
R	Korrelationskoeffizient
R^2	Bestimmtheitsmaß
ROS	*reactive oxygen species*; reaktive Sauerstoff-Spezies
SCFA	*short chain fatty acid*; kurzkettige Fettsäure
SD	*standard deviation;* Standardabweichung
SDS	*sodium dodecyl sulfate;* Natriumdodecylsulfat
SGLT1	*sodium dependent glucose transporter 1*; Na^+/Glucose-Symporter
SOD	Superoxid-Dismutase
SPLET	Sequentieller Protonen-Verlust Elektronen-Transfer
SSA	*sulfosalicylic acid*; 5-Sulfosalicylsäure
SSB	*single strand break*, Einzelstrangbruch der DNA
SULT	Sulfotransferase
TBH	*tert*-Butylhydroperoxid
TBS	*tris buffered saline*; Tris-gepufferte Salzlösung
TEA	Triethanolamin
TEAC	*Trolox equivalent antioxidant capacity*
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamin
TFIIH	*transcription factor IIH*
TP53	*tumor protein 53*; Tumorsuppressorgen
tGSH	Gesamt-Glutathion (GSH + GSSG)
TI	*tail intensity*; Schweifintensität (Maßeinheit des Comet Assay)
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoesäure
UGT	UDP-Glucuronosyltransferse

1. Einleitung

Darmkrebs gehört neben kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes zu den häufigsten Zivilisationserkrankungen und stellt hinter Lungen- bzw. Brustkrebs die zweithäufigste Krebsart überhaupt dar [Boyer und Liu, 2004; Donaldson, 2004]. Obwohl eine genetische Prädisposition bei einem Teil der beobachteten Krebsfälle eine Rolle spielt, hat die Ernährung eine wichtige Rolle auf die Genese von Darmkrebs. Risikofaktoren sind eine übermäßige Aufnahme von rotem Fleisch, Alkohol, übermäßige Kalorienzufuhr, mangelnde Bewegung und daraus resultierende Fettleibigkeit, Diabetes und Rauchen [Donaldson, 2004; Herraiz und Munoz-Navas, 2009; Huxley et al., 2009; WCRF und AICR, 2007].

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung von Krebs und anderen Erkrankungen (kardiovaskuläre Erkrankungen, Entzündungen, Diabetes, Rheuma, u.a.) [Boyer und Liu, 2004]. Zu den ROS gehören freie Radikale (z.B. das Hydroxy- und das Superoxidanionradikal) als auch Nichtradikale (z.B. Singulettsauerstoff und Wasserstoffperoxid). Diese reaktiven Moleküle sind in der Lage, für die Zelle lebenswichtige Strukturen wie Lipide, Proteine und DNA zu schädigen [Aherne und O'Brien, 2000; Kelly et al., 1998] und haben daher zumeist adverse Effekte für den Organismus. Neben physiologischen Quellen haben auch Xenobiotika (wie Nahrungsmittelbestandteile, Medikamente) und redox-aktive Metallionen (z.B. Eisen aus rotem Fleisch) einen entscheidenden Einfluss auf die übermäßige Generierung von ROS, dem damit verbundenen oxidativen Stress und der Entstehung von Krebs [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Auch chronische Darmentzündungen (z.B. Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn) werden mit einer vermehrten Produktion von Oxidanzien im Darm in Verbindung gebracht, die durch infilitrierende Makrophagen und Neutrophile ausgeschüttet werden [Hoffmann et al., 2004].

Antioxidanzien sind Substanzen, die ROS direkt durch Abfangen von Radikalen oder indirekt durch Inaktivierung redoxaktiver Übergangsmetalle oder Modulation der Zellantwort beseitigen. Zu den exogenen Antioxidanzien zählen neben den Vitaminen C und E auch sekundäre Pflanzenstoffe, die eine Vielzahl meist polyphenolischer Verbindungen, z.B. Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate umfassen [Belitz et al., 2001; Gerhäuser et al., 2003; Halliwell und Gutteridge, 1999]. Äpfel und Apfelsaft gehören mit 18,4 kg bzw. 12,8 L pro Person zu den in Deutschland am häufigsten verzehrten Früchten bzw. Fruchtsäften und stellen in Europa und Nordamerika eine der Hauptquellen für antioxidativ wirksame Polyphenole dar [Gerhäuser, 2008; Manach et al., 2004]. Die protektive Wirkung von Äpfeln auf die Genese von Darmkrebs ist durch mehrere epidemiologische Studien belegt [Zessner et al., 2008].

Da als Grundlage kommerziell produzierter Apfelsäfte, deren Gesamtgehalt an Antioxidanzien bei ca. 100 – 200 mg/L liegt, zumeist Tafeläpfel verwendet werden, können durch den Einsatz hochwertigerer Mostpapfelsorten, die einen wesentlich höheren Anteil an Polyphenolen enthalten, deren Konzentrationen im Apfelsaft um den Faktor 6 – 9 gesteigert werden [Kahle et al., 2005a]. Hier bietet sich ein Ansatz für die Optimierung durch geeignete Sortenauswahl; auch durch Modulation der verwendeten Technologie (z.B. Tresterverflüssigung, Extraktion von Apfelschalen) lassen sich die Gehalte an Antioxidanzien (und damit wahrscheinlich auch deren günstige Wirkung) um ein Vielfaches steigern. Außer den im Saft gelösten Polyphenolen könnten, vor allem im naturtrüben Apfelsaft, die in der Trubfraktion enthaltenen hochpolymeren Procyanidine ebenfalls zur protektiven Wirkung beitragen. Dies deuten neuere Studien an, die sich speziell mit der Wirksamkeit des Trubs beschäftigt haben [Barth et al., 2007; Barth et al., 2005; Oszmianski et al., 2007].

Wie alle Nahrungsbestandteile werden auch die polyphenolischen Antioxidantien des Apfelsaftes durch verschiedene Prozesse des Gastrointestinaltraktes verändert. Nach der sauren Umgebung des Magens erreicht der Apfelsaft den Dünndarm, in welchem ein Teil der Polyphenole absorbiert und verstoffwechselt wird [Thews, 1999]. Die verbleibenden Substanzen werden zum großen Teil von der intestinalen Mikroflora des Darms abgebaut. Dabei können eine Vielzahl neuer Substanzen entstehen, die wie ihre Ausgangsverbindungen, ebenfalls eine antioxidative Wirksamkeit aufweisen könnten [Rechner et al., 2004]. Bei *in vitro*-Versuchen ist es daher notwendig, auch die Beteiligung des intestinalen Metabolismus auf das antioxidative Potential von Polyphenolen in die Untersuchungen einzubeziehen.

Polyphenolen wird oft – und zu Recht – eine starke antioxidative Wirksamkeit attestiert. Neben dieser zeigen einige Polyphenole auch prooxidative Effekte; d.h. sie sind in der Lage aktiv ROS zu generieren, was bisher vor allen Dingen unter den Bedingungen der Zellkultur beschrieben wurde [Halliwell, 2008]. Um die Relevanz dieser prooxidativen Wirksamkeit für die *in vivo*-Situation besser abschätzen zu können, müssen zunächst die für die ROS-Generierung relavanten Parameter identifiziert werden. Danach ist zu prüfen, ob diese Polyphenol-generierten ROS eine Wirkung auf Darmzellen *in vitro* ausüben um dann eine gute Übertragung der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation zu erreichen.

Die Konjunktion all dieser Untersuchungen soll Hinweise geben, ob Apfelsaftinhaltsstoffe den Darm vor ROS und ROS-bedingten Krankheiten schützen; die zu Grunde liegenden Mechanismen und die Bedeutung von pro- und antioxidativer Wirksamkeit der Polyphenole müssen dazu näher erforscht werden.

2. Problemstellung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des BMBF-geförderten Netzwerkprojektes „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten ihrer Prävention durch Ernährung“. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines Apfel-Produktes mit hohem gesundheitlichem Wert.

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in Obst und Gemüse in großen Mengen enthalten sind. Im Apfel sind dies vor allem Quercetin- und Phloretinglykoside, Hydroxyzimtsäurederivate sowie monomere und oligomere Flavanole (Katechine, Procyanidine). Sie zeigen zum Teil ausgeprägte antioxidative Eigenschaften, können die antioxidative Abwehr von Zellen induzieren (indirekte antioxidative Wirksamkeit) und besitzen daher ein Potenzial, oxidativem Stress und damit assoziierten Krankheiten entgegen zu wirken. Die Erfassung der biologischen Wirksamkeit von Flavonoiden/Polyphenolen ist gegenwärtig das Forschungsziel vieler *in vitro*- und *in vivo*-Studien. Dabei lassen sich mechanistische Aspekte der antioxidativen Wirksamkeit *in vitro* besser untersuchen; allerdings ist es erforderlich, die Beteiligung des intestinalen Metabolismus zu berücksichtigen. Auch das Wissen über die Wirksamkeit dabei entstehender Abbauprodukte muss vertieft werden.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, das antioxidative Potential von Apfelsaftinhaltsstoffen - unter Einbeziehung des intestinalen Metabolismus - zu charakterisieren. Im Einzelnen sollten folgende Aspekte Beachtung finden:

Zur Charakterisierung der zellfreien antioxidativen Wirksamkeit der Polyphenole wurde der ORAC-Assay (oxygen radical scavenging antioxidant capacity) etabliert, welcher zusammen mit dem TEAC-Assay (Trolox equivalent antioxidant capacity) die wichtigsten Mechanismen antioxidativer Wirksamkeit erfasst. Dies erlaubt eine umfassendere Beurteilung der antioxidativen Eigenschaften und ermöglicht einen Vergleich der Polyphenole hinsichtlich Wirkstärke und Mechanismus.

Um die Modulation der antioxidativen Abwehr von Zellen durch Polyphenole zu untersuchen, wurden biologische Marker ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit oxidativer Zellschädigung stehen und Möglichkeiten einer Prävention durch die Apfelsaftinhaltsstoffe offenbaren. Dies umfasste die Modulation (oxidativer) DNA-Schädigung mittels Comet Assay sowie des zellulären ROS-Levels mittels DCF-(Dichlorofluorescein) Assay. Da eine Modulation des ohnehin geringen Basisschadens der Zelle nur schlecht quantifizierbar ist, folgte der Inkubation mit Testsubstanzen noch eine moderate Oxidansbehandlung zur Erhöhung des Schädigungsausmaßes; dieser oxidative Stress war von einer Stärke, wie sie auch in pathologischen Situationen *in vivo* gefunden werden kann. Zur Untersuchung der zellulären antioxidativen Abwehr wurden

weiterhin zwei Marker herangezogen, die eine wesentliche Rolle im Redox-System der Zelle spielen: die Quantifizierung des Glutathion (GSH)-Spiegels als wichtigstem intrazellulären Antioxidans sowie die Modulation des antioxidativ wirksamen Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD). Um dem Zielorgan Darm möglichst nahe zu kommen wurden die zellulären Assays an der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 durchgeführt, die ein etabliertes Modell des Kolon-Epithels darstellt.

Zur Charakterisierung des protektiven Potenzials von Apfelsäften *in vitro* wurden in der Forschungsanstalt Geisenheim verschiedene Apfelsaftextrakte hergestellt. Die Auswahl der verwendeten Äpfel richtete sich nach einem möglichst hohen Gehalt von phenolischen Verbindungen im Saft, was durch Verwendung von „alten“ Mostapfelsorten mit hohem Polyphenolgehalt gewährleistet wurde. Neben der Sortenauswahl wurden auch technologische Aspekte der Extraktherstellung variiert, um die Ausbeute an Polyphenolen noch zu steigern. Deshalb wurden ebenfalls Extrakte aus Tresterextraktionssaft und Apfelschalen untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die verschiedenen Extrakte vergleichend auf ihr protektives Potenzial zu prüfen.

Bei der Untersuchung der antioxidativen Wirksamkeit der Polyphenole *in vivo* dürfen die Auswirkungen des intestinalen Metabolismus nicht vernachlässigt werden. In einer dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit [Bellion, 2006] wurde die antioxidative Wirksamkeit zweier mit anaeroben Darmbakterien fermentierten Apfelsaftextrakten *in vitro* geprüft. Die Ergebnisse zeigten deutliche protektive Effekte, die sich mit dem starken Abbau der Extrakt-Polyphenole während der Inkubation nicht erklären ließen. Daher sollen die Fermentationsüberstände mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS auf das Vorhandensein bekannter Polyphenol-Abbauprodukte untersucht werden. Identifizierten Abbauprodukte sollen anschließend auf ihre antioxidative Wirksamkeit im zellfreien (TEAC) und zellulären System (zellulärer ROS-Level) untersucht werden, was Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der Polyphenole *in vivo* erlauben soll.

Studien deuten eine antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaft-Trub an, welcher einen großen Anteil polymerer Procyanidine enthält, deren antioxidatives Potential bislang kaum erforscht ist. Da Procyanidine auf Grund ihrer Größe kein Substrat für Darmzellen darstellen, wurde der Trub an der Universität Jena, in Anlehnung an die *in vivo*-Situation, mit einem Modell des intestinalen Metabolismus fermentiert. Der wässrige Fermentationsüberstand soll dann mit den etablierten Markern oxidativer Zellschädigung und Zellantwort getestet werden.

Es ist bekannt, dass Polyphenole unter Zellkultur-Bedingungen in der Lage sind, ROS zu generieren, was bei *in vivo*-Studien bislang nicht beobachtet wurde. Für die korrekte Beurteilung der protektiven Wirksamkeit von Apfel-Produkten ist es daher notwendig, dieses prooxidative Potential zu charakterisieren und die Auswirkungen auf zelluläre

Systeme zu untersuchten. Mit den erhaltenen Daten können dann Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit der Zellkulturexperimente auf die *in vivo*-Situation gezogen werden. Um die polyphenol-bedingte ROS-Generierung zu verfolgen, musste zunächst ein Assay zur Quantifizierung von H_2O_2 in wässrigen Lösungen etabliert werden (FOX1-Assay).

Es sollen verschiedenen Extrakte auf ihre prooxidative Wirksamkeit in Zellkulturmedium überprüft werden. Danach werden mittels linearer Regression Inhaltsstoffe identifiziert, die einen besonderen Einfluss auf die H_2O_2-Bildung haben könnten. Um die Beteiligung dieser Inhaltsstoffe an der H_2O_2-Generierung der Extrakte zu verifizieren, werden auch Leitstrukturen der einzelnen Gruppen (Flavonoide, Hydroxyzimtsäuren, Dihydrochalcone) auf ihr prooxidatives Potential untersucht. An Hand einer Struktur-Wirkungs-Beziehung sollen funktionelle Gruppen mit besonderem prooxidativen Charakter identifiziert werden.

Die H_2O_2-Bildung potenter ROS-Bildner soll in verschiedenen Zellkulturmedien verfolgt werden, um Lösungsmittel-Effekte zu identifizieren. Dazu werden verschiedene Parameter in die Untersuchungen mit einbezogen, welche die H_2O_2-Bildung im Medium beeinflussen könnten (Zusammensetzung, Inkubationsdauer, pH-Wert, Stabilität von H_2O_2).

Neben diesen zellfreien Tests ist es notwendig, die Auswirkungen polyphenol-generierter ROS auf Darmzellen zu untersuchen. Dazu sollen Zellen mit ROS-generierenden Polyphenolen inkubiert und die Modulation des Glutathionspiegels und des zellulären ROS-Levels gemessen werden. Zur Differenzierung von polyphenol- und ROS-bedingten Effekten soll eine Methode etabliert werden, um die artifiziell gebildeten ROS effizient zu eliminieren. Dies soll durch Supplementierung des Inkubationsmediums mit antioxidativen Enzymen erreicht werden.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Der Darm

3.1.1. Das Verdauungssystem

Der Begriff Verdauungssystem bezeichnet das Gesamtsystem der mit Aufnahme und Verdauung der Nahrung beschäftigten Organe des Menschen. Das Verdauungssystem lässt sich funktionell in einen Kopf- und einen Rumpfteil gliedern. Der Kopfteil des Verdauungssystems umfasst die Mundhöhle mit ihren Speicheldrüsen sowie den mittleren und unteren Teil des Rachens. Ihnen obliegt die Aufnahme der Nahrung, ihre mechanische Zerkleinerung und Umwandlung in einen halbflüssigen Speisebrei. Durch das Sekret der Speicheldrüsen wird die Nahrung gleitfähig gemacht, außerdem wird durch Speichelenzyme (z.B. Amylase) im Mund bereits die Verdauung eingeleitet [Faller, 1999].
Zum Rumpfteil des Verdauungssystems, das auch als Gastrointestinaltrakt (von griech. *gaster* Magen und lat. *intestinum* Darm) oder Magen-Darm-Trakt bezeichnet wird, gehören Magen, Dünn- und Dickdarm sowie die angeschlossenen Drüsen Leber/Gallenblase und Bauchspeicheldrüse. Bevor der Speisebrei in den Darm gelangt wird er zunächst im Magen vorverdaut und desinfiziert.

3.1.2. Anatomie und Physiologie des Darms

Der Darm des Menschen gliedert sich in zwei große Abschnitte mit unterschiedlichen Aufgaben. Der Dünndarm liegt im Unterbauch, erstreckt sich vom Pylorus des Magens bis zur Einmündung in den Dickdarm in Höhe der rechten Darmbeinschaufel und weist eine Länge von 3,5 – 4 m (im tonisierten Zustand) auf. Er gliedert sich in die drei Bereiche Zwölffingerdarm (*Duodenum*), Leerdarm (*Jejunum*) und Krummdarm (*Ileum*). Die physiologische Funktion des Dünndarms besteht in der Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen und der Resorption von Nährstoffen, weshalb seine Oberfläche durch Keckring-Falten, Zotten und Mikrovilli auf etwa 200 m^2 vergrößert ist [Thews, 1999]. Zur besseren Durchmischung des Nahrungsbreis (*Chymus*) mit Verdauungssekreten, dem Weitertransport des Darminhalts und der Förderung der Resorption führen sowohl der Dünndarm im Ganzen als auch die Darmzotten verschiedene Bewegungen aus (Dünndarmmotilität). In den Dünndarm werden täglich rund 2,5 – 3 L Darmsaft sezerniert. Dieser besteht neben isotoner NaCl- und alkalischer HCO_3^--Lösung aus Muzinen, die das Epithel als „unstirred layer“ überziehen und es damit vor Proteasen und dem sauren Mageninhalt schützen; außerdem ermöglicht es ein weitgehend reibungsfreies Gleiten des Darminhalts. Der Darmsaft selbst enthält praktisch keine Verdauungsenzyme.

Lediglich durch Abschilferung von Mukosazellen können sekundär Enzyme, die im Bürstensaum dieser Zellen lokalisiert sind, ins Darmlumen gelangen [Schmidt und Thews, 1995].

Auf den Dünndarm folgt dann der Dickdarm. Er besteht aus Blinddarm (*Caecum*), Grimmdarm (*Kolon*) und Mast- oder Enddarm (*Rektum*). In den einzelnen Abschnitten wird durch Rückresorption von Wasser und Nährstoffen der Darminhalt eingedickt und der Kot (*Fäzes*) gebildet. Das Kolon hat eine Länge von ca. 1 m und eine lichte Weite von 6 – 8 cm. Er gliedert sich in vier Abschnitte: einen aufsteigenden, einen querverlaufenden, einen absteigenden und einen S-förmingen Teil (*Colon ascendens, transversum, descendens, sigmoideum*). Der Hauptteil der Kolonbewegung ist nichtpropulsiv, so dass sich durchschnittliche Passagezeiten des Chymus von 20 – 30 h ergeben. Dadurch wird eine ausreichende Resorption von Wasser, Elektrolyten und kurzkettigen Fettsäuren sowie ein bakterieller Aufschluss nicht resorbierbarer oder nicht resorbierter Nahrungsbestandteile gewährleistet [Thews, 1999].

3.1.3. Das Darmepithel

Der histologische Aufbau des Darms gliedert sich in vier Schichten:

- Mukosa (Schleimhaut): innere Wandschicht des GI-Traktes mit Epithelzellen und Drüsen
- Submukosa: schmale Bindegewebsschicht zwischen Mukosa und Muskularis
- Muskularis: glatte Muskulatur, sowohl längs als auch ringförmig angeordnet; verantwortlich für die Peristaltik des Darms
- Serosa: äußere Gewebsschicht des GI-Traktes. Sie sondert Flüssigkeiten ab und ermöglicht das Übereinandergleiten mit anderen Organen.

Die Epithelzellen in der Mukosa besitzen eine typische polare Struktur und sind miteinander in spezialisierter Weise durch Abschlussleisten (tight junctions) verbunden. Die apikale Zellmembran ist definitionsgemäß der Außenseite (hier: Darmlumen) zugewandt und bildet fingerartige Ausstülpungen (Mikrovilli, Bürstensaummembran). Die basolaterale Membran ist den Blutkapillaren zugewandt, dient als Wachstumsschiene und vermittelt den basalen Zusammenhalt, stellt jedoch für den transepithelialen Transport keine wesentliche Barriere dar. Hauptaufgaben des epithelialen Gewebes sind die Resorption von Nährstoffen einerseits und die Barrierefunktion vor schädlichen Substanzen aus dem Darmlumen andererseits [Schmidt und Thews, 1995].

Die Dünndarmschleimhaut ist zur besseren Resorption stark vergrößert und besteht vorwiegend aus sog. Saumzellen (Enterozyten), daneben schleimproduzierenden Becherzellen und verschiedenen endokrinen Zellen (Lymphfollikel, M-Zellen). Mit einer Erneuerungszeit von 3 – 5 Tagen gehört das Darmepithel zu den Geweben mit den

höchsten Teilungs- und Umsatzraten im menschlichen Körper. Die noch undifferenzierten Zylinderzellen wandern von den Stammzellen am Boden jeder Krypte in 24 – 36 h zur Zottenspitze Sie reifen auf diesem Wege, entwickeln dabei die für Verdauung und Resorption spezifischen Enzyme und Transportsysteme und werden so zu den terminal differenzierten, resorbierenden Enterozyten des Darms. Daher findet auch die Resorption von Nahrungsbestandteilen vorwiegend an der Zottenspitze statt, während die sekretorischen Aktivitäten in den Krypten lokalisiert sind [Schmidt und Thews, 1995].

Die Darmschleimhaut des Dickdarms weist eine wesentlich geringere Oberflächenvergrößerung als die des Dünndarms auf. Es fehlen Zotten, und die Oberfläche wird ausschließlich durch dicht nebeneinander stehende, tiefe Krypten vergrößert. Das Epithel von Krypten und Oberfläche besteht vorwiegend aus Becherzellen. Ein Teil der oberflächlichen Zellen ist mit einem Bürstensaum versehen und dient der Resorption [Faller, 1999; Thews, 1999].

Aufnahme von Nährstoffen

Die Resorption von Wasser und Nahrungsinhaltsstoffen kann im Darm auf zwei Wegen erfolgen: entweder durch die Enterozyten oder zwischen ihnen hindurch (parazellulär, durch Kanäle zwischen den tight junctions). Dieser zweite Weg kann bis zu 90 % des Stofftransports ausmachen und wird als passive Permeabilität bezeichnet. Vor allem im Dünndarm, der durch einen großen Abstand benachbarter tight junctions (ca. 0,8 nm) eine hohe Durchlässigkeit aufweist, werden Elektrolyte (Na^+, Cl^-, K^+) vor allem durch parazelluläre Diffusion aufgenommen. Im Kolon, mit seinen dichteren Schlussleisten (ca. 0,2 – 0,25 nm), geschieht die Aufnahme eher durch transzelluläre Transportmechanismen. Diese können entweder aktiv (über luminale Transporter, z.B. Na^+/HPO_4^{2-}-Cotransporter) oder passiv (Diffusionsgleichgewicht bedingt durch basolaterale Transporter z.B. Na^+/K^+-ATPase) erfolgen. Die Resorption von Wasser erfolgt ausschließlich mit dem Transport löslicher Substanzen. Wie für Elektrolyte ist dabei die Durchlässigkeit im oberen Dünndarm relativ hoch, so dass hier schon ca. 85 % der Chymus-Flüssigkeit resorbiert werden. Nährstoffe wie Proteine und Kohlenhydrate werden nach hydrolytischer Spaltung durch spezialisierte Enzyme der Bürstensaummembran (Oligosaccharidasen, Oligopeptidasen) als Monosaccharide bzw. Mono-, Di- und Tripeptide zumeist mittels Na^+-Cotransport in die Enterozyten aufgenommen und durch erleichterte Diffusion über die basolaterale Membran ins Interstitium abgegeben. Die Aufnahme von Fetten erfolgt nach deren Abbau durch Pankreaslipase und Darmbakterien zu Monoacylglyceriden und kurz- und mittelkettigen Fettsäuren durch einfache Diffusion [Schmidt und Thews, 1995].

3.1.4. Die intestinale Mikroflora

Während der Magen und der obere Dünndarm eher keimarm sind, nimmt die Bakterienzahl nach distal stark zu. Sie steigt von 10^3 koloniebildenden Einheiten (cfu)/mL Chymus in Magen und Duodenum über 10^4 – 10^8 cfu/mL in Jejunum und Ileum auf 10^9 – 10^{12} cfu/mL im Kolon stark an. Die Anzahl verschiedener Bakterienstämme ist in Kindern noch relativ gering, nimmt mit steigendem Lebensalter jedoch zu und erreicht bei Erwachsenen einen sehr hohen Grad der Komplexität. Auch das Auftreten einzelner Stämme unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Menschen, was vor allen Dingen durch die Ernährung determiniert ist, da die aufgenommene Nahrung nicht nur dem Menschen sondern auch den besiedelnden Bakterien als Energiequelle dient [Blaut und Clavel, 2007]. Die genaue Anzahl verschiedener Bakterien-Arten ist bislang noch nicht bekannt, jedoch konnten in den letzten Jahren im Rahmen eines EU-geförderten Projektes durch die Analyse der prokaryotischen 16S rRNA viele neue Arten identifiziert werden [Blaut et al., 2002]. Die Mehrzahl der Kolonbakterien sind obligate Anaerobier, in erster Linie Bacteroides. Aerobe Stämme wie Escherichia coli, Enterokokken und Laktobakterien machen nur 1 % der Darmbakterien aus [Thews, 1999]. Aufgabe der intestinalen Mikroflora ist der Abbau noch nicht verdauter Nahrungsbestandteile. Dazu zählen hauptsächlich im Dünndarm nicht verdaute Kohlenhydrate (vor allem Ballaststoffe wie Zellulose, Pektin, Inulin) aber auch Proteine, Mukus und abgeschilferte Epithelien. Während des Abbaus findet zunächst eine Depolymerisierung zu mono- und oligomeren Zuckern, Peptiden und Aminosäuren statt die dann, wie oben beschrieben vom Körper resorbiert werden können. Ein Teil dieser Substanzen wird weiter abgebaut, es entstehen als finale Produkte des Kohlenhydrat-Abbaus sowohl kurzkettige Fettsäuren (SCFA; v.a. Acetat, Propionat, Butyrat) als auch CO_2 und H_2 [Blaut und Clavel, 2007].

Kurzkettige Fettsäuren

Die Bildung der SCFA ist für den Körper von entscheidender Bedeutung, da bis zu 70 % des Energiebedarfs des Kolon-Epithels durch die Oxidation von Butyrat gedeckt werden [Blaut und Clavel, 2007]. Auch bei der Prävention von Krankheiten scheinen SCFA eine wichtige Rolle zu spielen. Mehrere Studien zeigen einen positiven Effekt von Ballaststoffen bei der Prävention von Darmkrebs, vor allem bedingt durch zwei Faktoren: neben einer Reduktion der Exposition von Darmzellen mit Risikofaktoren (durch Induktion protektiver Enzyme wie z.B. Glutathion-S-Transferasen) verringern SCFAs die Überlebensrate der Tumorzellen und -vorstufen (durch Wachstumshemmung und Apoptose-Induktion) [Pool-Zobel, 2005]. Neben ihrer krebspräventiven Wirkung zeigen SCFAs auch anti-inflammatorische Eigenschaften. Bei Patienten mit Morbus Crohn

reduzierte Butyrat die Expression pro-inflammatorischer Zytokine durch Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF-κB [Segain et al., 2000].

Durch den Abbau von Proteinen und Aminosäuren entstehen eine ganze Reihe verschiedener, teilweise toxischer Verbindungen wie Amine, die mit Nitrit zu N-Nitrosoverbindungen reagieren können, Ammoniak oder H_2S [Blaut und Clavel, 2007]. Auch Xenobiotika wie Medikamente und bioaktive Lebensmittel-Inhaltsstoffe können von Darmbakterien metabolisiert werden. Bislang sind über 30 verschiedene Wirkstoffe bekannt, die als Substrat für einen bakteriellen Abbau dienen können. Dabei ist die Wirksamkeit der entstehenden Abbauprodukte teilweise nicht bekannt [Sousa et al., 2008].

Auch bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe werden, wenn sie den Darm erreichen, durch die intestinale Mikroflora metabolisiert. Als prominenteste Substanzen sind hier polyphenolische Verbindungen zu nennen, auf deren Abbau in Abschnitt 3.4.2.5 eingegangen wird.

3.1.5. Pathophysiologie des Darms

Die Erkrankungen des Darms gehen einher mit Störungen seiner physiologischen Funktion, v.a. der Wasser- und Elektrolytresorption und der Motilität. Diarrhö (Durchfall), Obstipation (Verstopfung), Meteorismus (vermehrter Gasgehalt) und Flatulenz sind die hauptsächlichen Symptome [Siegenthaler und Blum, 2006].

3.1.5.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zählen zwei schubweise verlaufende, das intestinale, Mukosa-assoziierte Immunsystem betreffende und mit einer gestörten Zytokinregulation einhergehende Erkrankungen der Darmwand:

- Colitis ulcerosa und
- Morbus Crohn (Enteritis regionalis).

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine kontinuierliche Entzündung der kolorektalen Schleimhaut, die zumeist das Rektum einbezieht und eine variable Ausdehnung nach proximal aufweist. Im Gegensatz dazu manifestiert sich Morbus Crohn als chronisch-ulzerierende, diskontinuierliche Entzündung, die prinzipiell in allen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts (von der Mundhöhle bis zum Anus) auftreten kann und alle Schichten des Darms mit einschließt. Die Inzidenzen der beiden Krankheiten betragen 4 – $7/10^5$ für Morbus Crohn bzw. 9 – $12/10^5$ für Colitis ulcerosa. Im Laufe beider Krankheiten können verschiedene krankheitsbedingte Komplikationen auftreten: Fisteln/Abszesse, Strikturen/Stenosen, Fissuren, Perforation, toxisches Megakolon und, häufiger bei der Colitis ulcerosa beobachtet, Neoplasien und kolorektale Karzinome [Hoffmann et al., 2004; Thews, 1999]. Beide Erkrankungen sind zum Teil vererbbar und somit

genetisch bedingt. In den letzten Jahren konnten verschiedene Mutationen identifiziert werden, die mit der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen in Verbindung stehen. So bestätigten im Jahr 2001 drei parallel erschienene Publikationen die Wichtigkeit von NOD 2/CARD 15 für die Entstehung von Colitis ulcerosa. Das Protein NOD 2/CARD 15 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Transkriptionsfaktors NF-κB, welcher einen starken Einfluss auf die Entstehung von Entzündungen hat [Russell et al., 2004].

3.1.5.2. Darmkrebs

Darmkrebs ist eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Trotz des ähnlichen Aufbaus von Dick- und Dünndarm kommt Dünndarmkrebs nur äußerst selten vor, so dass die häufigsten Fälle von Darmkrebs Tumoren von Kolon und Rektum betreffen [Marquardt und Schäfer, 2004]. Bei der Inzidenz lag Kolorektalkrebs im Jahr 2002 weltweit auf Rang 3. Die Prävalenz rangiert sogar an zweiter Stelle bei den Krebserkrankungen [Parkin et al., 2005]. Den höchsten Zuwachs an Neuerkrankungen weisen Nordamerika, Japan, Australien/ Neuseeland und Westeuropa auf, während die Inzidenz in Afrika und Asien eher gering ist [Parkin et al., 2005].

Genetische Prädisposition

Zwischen 15 – 30 % der auftretenden kolorektalen Tumoren stehen im Zusammenhang mit einer erblich bedingten Prädisposition, davon lassen sich 5 – 10 % einem definierten genetisch bedingten Syndrom zuordnen. Zu diesen definierten Syndromen zählen familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis (aFAP), MUTYH- oder MYH-assoziierte Polyposis (MAP) sowie das Lynch-Syndrom, auch bekannt als hereditäres nicht-polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom (HNPCC) [Herraiz und Munoz-Navas, 2009; Möslein, 2008]. Die betroffenen Gene sind dabei das Tumorsuppressorgen *APC* (adenomatous polyposis coli), welches bei FAP und aFAP mutiert ist sowie das Reparaturgen *MUTYH*. Das HNPCC wird durch eine Keimbahnmutation in einem der DNA-Reparaturgene (*MMR,* „mismatch repair“, siehe auch Abschnitt 3.3.2.1) verursacht. Bislang wurden krankheitsverursachende genetische Alterationen in 4 verschiedenen MMR-Genen identifiziert (*hMSH2, hMLH1, hPMS2* und *hPMS6*) [Möslein, 2008]. Auch entzündliche Darmerkrankungen, vor allem Colitis ulcerosa, können in ihrem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf ebenfalls zu kolorektalen Tumoren führen [Hoffmann et al., 2004].

Molekularbiologische Mechanismen der Kolonkanzerogenese

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich über lange Zeiträume hinweg normale Körperzellen zu Krebszellen verändern. Diese Zeitspanne der

Tumorentstehung wird in Initiation, Promotion und Progression unterteilt und beinhaltet verschiedene Schritte auf molekularer und Gewebeebene, die sich an die erste initiierende Mutation anschließen (Abbildung 3.1). Bei der **Initiation** erfährt die Zelle eine irreversible Veränderung des genetischen Materials, die an die Tochterzellen weitergegeben wird. In der **Promotion**sphase kommt es zur Stimulierung des Zellwachstums mit einer bevorzugten Proliferation der initiierten Zellen. Die **Progression** führt im Weitern zu einer Zunahme der Wachstumsautonomie und Malignität des Mikrotumors. Zunehmende Progression des Tumorgewebes äußert sich dann in der Ausbildung von Metastasen [Eisenbrand et al., 2005].

Die Pathognese von Darmkrebs folgt diesem Schema meist sehr gut. Als erstes sichtbares Ereignis erfolgt die Ausbildung gutartiger Läsionen oder Präneoplasien, wie z.B. aberrante crypt foci (ACF). Dabei handelt es sich um einzelne oder multiple Krypten, die veränderte luminale Öffnungen besitzen, ein verdicktes Epithel zeigen und größer als benachbarte Krypten sind. Aus diesen prämalignen Läsionen entstehen in der Progressionsphase Adenome, die sehr langsam wachsen und aus denen meist Karzinome entstehen [Marquardt und Schäfer, 2004].

Die erste Verbindung von histologischen und morphologischen Veränderungen mit den gefundenen genetischen Veränderungen wurde durch Fearon und Vogelstein hergestellt [Fearon und Vogelstein, 1990]. Die genetischen Veränderungen ereignen sich dabei in solchen Genen, die für Zellwachstum, Zelldifferenzierung, DNA-Reparatur und Interaktionen zwischen zellulärer und extrazellulärer Matrix zuständig sind, wobei laut Fearon und Vogelstein Mutationen in vier bis fünf Genen zur Ausbildung eines malignen Tumors genügen. Diese sind das *APC*-Gen, das *KRAS*-Gen (kirsten rat sarcoma), das *TP53*-Gen (tumor protein 53) und das *DCC*-Gen (deleted in colorectal cancer). Hinzu kommen Veränderungen im *SMAD2/SMAD4*- bzw. *MCC*-Gen (mutated in colon cancer) [Berlau et al., 2004; Fearon und Vogelstein, 1990; Takayama et al., 2006].

Die zeitliche Reihenfolge, in der diese Mutationen aufeinander folgen, variiert, wobei zumeist eine somatische frameshift- oder nonsense-Mutation im *APC*-Gen das initiierende Ereignis darstellt [Fearnhead et al., 2001]. So werden *APC*-Mutationen bereits in aberranten Krypten und kleinen Polypen gefunden [Takayama et al., 2006]. Ohne funktionierendes *APC*-Protein wird β-Catenin nicht mehr abgebaut; es transloziert in den Nukleus und dient als Transkriptionsfaktor für verschiedene, für die Proliferation und Apoptosehemmung zuständige Onkogene wie *c-myc* oder *Cyclin-D1* [Wong und Pignatelli, 2002].

Die nachfolgende Schädigung trifft mit *KRAS* ein Onkogen, das für die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung wichtig ist. Mutiertes *KRAS* führt zu einem konstitutiven Zellwachstum und ist wahrscheinlich mit dem Übergang von kleinen Adenomen zu größeren mit einer höheren Malignität verbunden, da diese Mutation nur mit

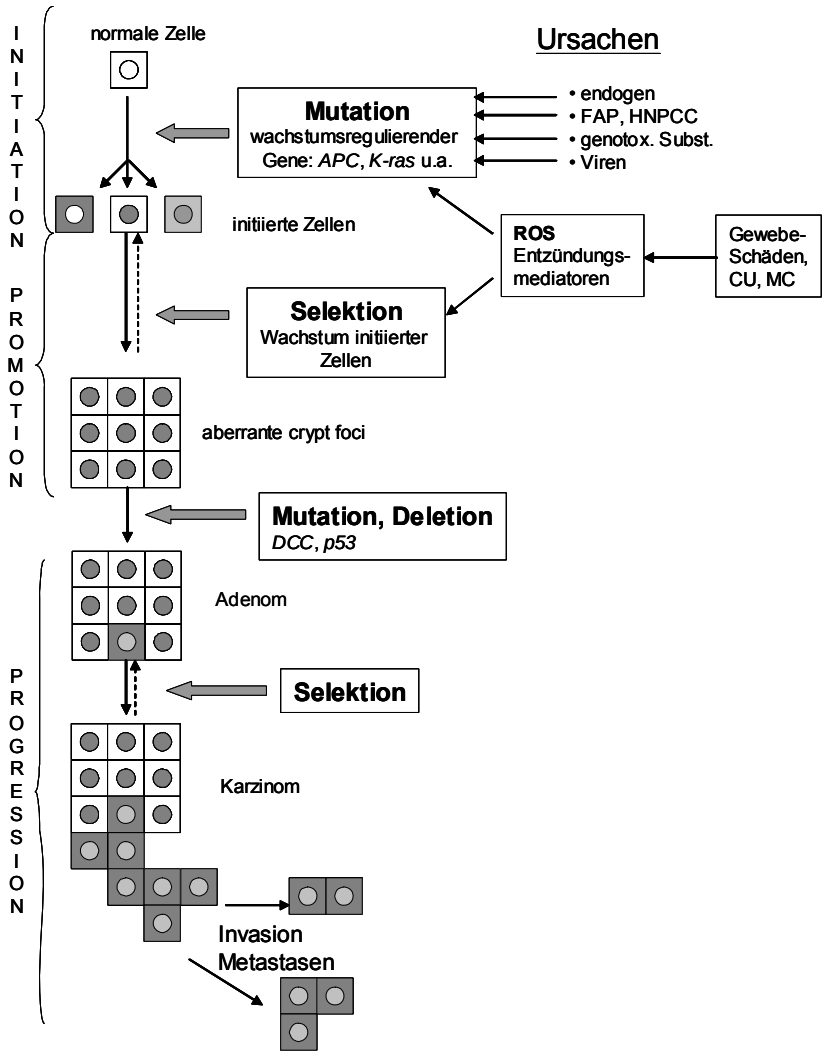


Abbildung 3.1: Mehrstufenprozess der Entstehung von Kolonkrebs, modifiziert nach [Marquardt und Schäfer, 2004]; Abkürzungen siehe Text.

einer Häufigkeit von etwa 10 % in Adenomen mit einem Durchmesser <0,5 cm vorkommen, sich aber in etwa 50 % der größeren Adenome (>1 cm) und Karzinome nachweisen lassen [Fearon und Vogelstein, 1990].

Das nächste genetische Ereignis der Adenom-Karzinom-Sequenz ist der Verlust des *DCC*-Gens, das selten in frühen Adenomstadien, aber in etwa 50 % der späten Adenome und in 70 % der kolorektalen Karzinome gefunden wird. Dieser Verlust führt wahrscheinlich zu Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Extrazellulär-Matrix-Interaktionen in der Kolonmukosa [Fearon und Vogelstein, 1990]. Ein weiteres Tumorsuppressorgen das, wie *DCC*, ebenfalls auf Allel 18q liegt, ist *SMAD4*, dessen Inaktivierung vermutlich mit der Progression von Tumoren einhergeht [Takayama et al., 2006].

Veränderungen im *TP53*-Gen stellen ein spätes Ereignis der Kanzerogenese dar und markieren gemeinhin den malignen Übergang vom Adenom zum Karzinom. *TP53*-Mutationen können in 40 – 50 % der kolorektalen Tumore gefunden werden und gehen einher mit einer deutlich schlechteren Prognose bzw. Überlebenszeit für die Patienten [Takayama et al., 2006]. Als Tumorsuppressor reguliert p53 nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Durch die Inaktivierung von p53 ist weder ein Anhalten des Zellzyklus zur DNA-Reparatur, noch die Einleitung der Apoptose möglich. Die Zellen beginnen sich auch mit Schäden in der DNA unkontrolliert zu teilen, es kommt zur Tumorbildung.

Neben diesem Modell der chromosomalen Instabilität (Adenom-Karzinom-Sequenz) gibt es nach Potter et al. [Potter, 1999] noch drei weitere Wege, die bei der Entstehung von Darmkrebs eine Rolle spielen. Diese sind jedoch nicht diskret, d.h. in Tumoren können auch mehrere dieser Sequenzen zu finden sein:

Der HNPCC-Weg beruht auf einer Störung der DNA-Reparatur (mismatch repair) und führt zur Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Dieses Phänomen ist gekennzeichnet durch Längenveränderungen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten, z.B. …CACACA…), die durch DNA-Reparaturenzyme nicht behoben werden. Die dadurch entstehenden frameshift-Mutationen führen zur Inaktivierung der entsprechenden Genprodukte und werden bei MSI^{+}-Tumoren häufig bei Proteinen der Signaltransduktion, Apoptose und DNA-Reparatur beobachtet. Dieser Verlauf kann vor allem bei HNPCC, aber auch in ca. 20 % der Patienten mit sporadischem Darmkrebs beobachtet werden [Jacob und Praz, 2002].

Die Dysplasie-Karzinom-Sequenz ist vor allem in Patienten mit Colitis ulcerosa verbreitet. Im Gegensatz zur Adenom-Karzinom-Sequenz lassen sich hier kaum Mutationen von *APC*, *DCC*, und *KRAS* beobachten. Eine Mutation von *TP53* zeigt sich hier auch in 70 – 80 % aller Fälle, findet aber viel früher - nämlich schon im Stadium der Dysplasie – statt. Die Entstehung von Darmkrebs ist hier eher auf eine verminderte Expression der Tumorsuppressorgene $p21^{waf1}$, $p27^{kip1}$ und eine Hypermethylierung des $p16^{ink4a}$-Genpromotors zurückzuführen. Die drei Genprodukte sind alle Hemmer des Cyclin D1/CDK4-Komplexes, der für den korrekten Ablauf der Zellteilung verantwortlich ist [Wong und Harrison, 2001].

Der vierte Beitrag zur Kolon-Kanzerogenese ist das epigenetische Silencing verschiedener Gene, welches in vielen Darmkrebs-Fällen beobachtet wird. Inzwischen ist bekannt, dass die Hypermethylierung nicht auf Krebszellen beschränkt ist, da mit zunehmendem Alter auch in normalen Epithelien immer mehr CpG-Inseln methyliert werden, obwohl die Hypermethylierung in neoplastischen Zellen ausgeprägter ist. Zu den in Darmkrebs häufig methylierten Genpromotoren gehören u.a. auch Reparaturenzyme wie z.B. *hMLH1* oder *MGMT* oder Proliferationshemmer wie *MyoD1*, *RARb1* und *RASSF1* [Kondo und Issa, 2004].

Der Locus, an dem die ersten präneoplastischen Veränderungen auftreten, ist jedoch noch nicht geklärt. Zur Zeit existieren zwei unterschiedliche Theorien, die sich vereinfacht als top-down- und bottom-up-Modell bezeichnen lassen [Preston et al., 2003; Wright und Poulsom, 2002]: Die Arbeitsgruppe von Wright geht davon aus, dass das erste Mutationsereignis in einer Stammzelle der Kolonkrypten oder einer sehr frühen teilungsaktiven Tochterzelle stattfinden muss. Durch Teilung der mutierten Stammzelle wandern dann, der normalen Proliferationsrichtung folgend, die initiierten Zellen zur Spitze

der Krypte (bottom-up). Diese These wird untermauert durch die Beobachtung, dass die erste beobachtbare Läsion, ein monokryptisches Adenom, einen erweiterten Proliferationsbereich innerhalb der gesamten Krypte und eine scharfen Abgrenzung zu benachbarten Krypten aufweist (Abbildung 3.2B).

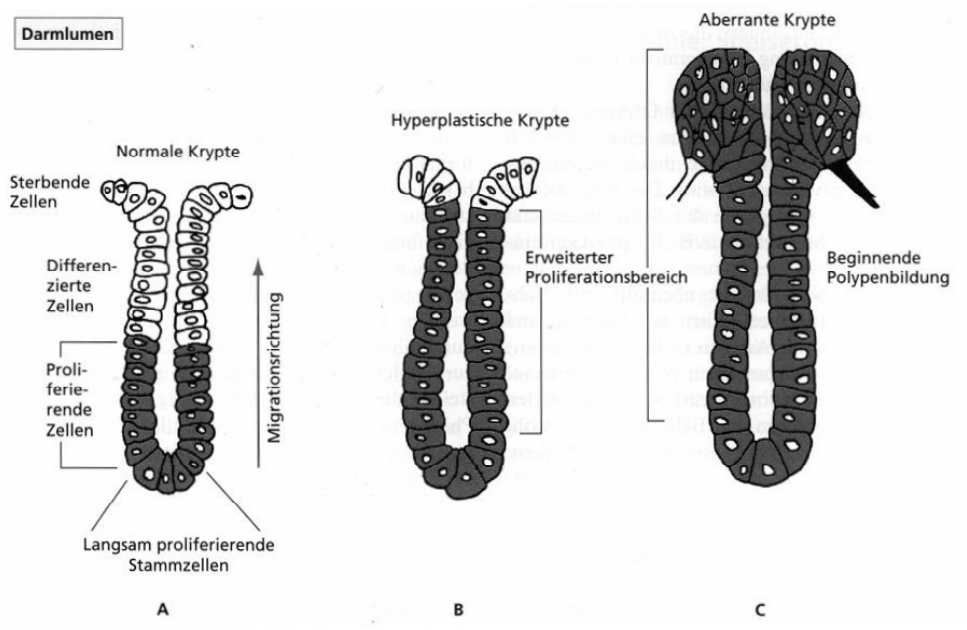


Abbildung 3.2: Pathophysiologie der Entstehung abberanter Krypten nach dem bottom-up-Modell. Normale (A), pränepolastische (B) und aberrante Krypten (C). [Marquardt und Schäfer, 2004]

Bei diesem Modell müssten die teilungsaktiven Zellen aber erst als aberrante Krypten, Mikroadenome oder adenomatöse Polypen in das Kolonlumen hineinwachsen, bevor die Fäzesinhaltsstoffe eine Rolle bei der Kolonkarzinogenese spielen können. Die Gruppe von Vogelstein hingegen geht von einem top-down-Modell aus, bei dem eine luminal gelegene Kolonzelle geschädigt wird und sich unter Verdrängung der normalen Zellen zur Kryptbasis hin ausbreitet, da sich in frühen Tumorformen dysplastische Zellen in vielen Fällen im luminalen Teil der Krypte finden lassen, während die Zellen am Boden der Krypte morphologisch normal aussehen [Shih et al., 2001; Wright und Poulsom, 2002]. Bei diesem Modell könnte auch das erste, initiierende Mutationsereignis über mutagene Inhaltsstoffe des Darmlumens vermittelt sein.

Einfluss der Ernährung auf die Entstehung von Darmkrebs

Gerade bei Kolonkrebs spielt die Ernährung eine wichtige Rolle, sowohl bei der Genese als auch bei der Prävention dieser Erkrankung. So könnten durch eine gesunde Ernährung in den westlichen Industrieländern 30 – 40 % aller Krebserkrankungen verhindert werden [Donaldson, 2004; WCRF und AICR, 2007].

In den letzten Jahren wurden durch zahlreiche epidemiologische Studien verschiedene Lebensstile identifiziert, die einen Einfluss auf die Entstehung von Darmkrebs haben. Es ist ziemlich sicher, dass regelmäßige Bewegung sowie regelmäßiger Verzehr von Obst und Gemüse, ballaststoffreichen Lebensmitteln, Milch, Fisch und Lebensmitteln die Folat, Selen, Calcium oder Vitamin D enthalten, das Darmkrebsrisiko senkt. Risikofaktoren dagegen sind die übermäßige Aufnahme von rotem und verarbeitetem Fleisch, Alkohol, eine übermäßige Kalorienzufuhr, mangelnde Bewegung und daraus resultierende Fettleibigkeit, Diabetes sowie Rauchen [Donaldson, 2004; Huxley et al., 2009; WCRF und AICR, 2007].

Nach einer fettreichen Mahlzeit kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von primären Gallensäuren in den Dünndarm. Diese werden zum großen Teil im terminalen Ileum durch Natrium-Cotransport rückresorbiert und gelangen wieder in die Leber (enterohepatischer Kreislauf). Ein gewisser Anteil jedoch gelangt in das Kolon [Thews, 1999]. Dort wirken sie direkt oder nach Metabolisierung zu sekundären Gallensäuren als Tumorpromotor, vermutlich indem sie durch die Produktion von ROS die DNA schädigen [Bernstein et al., 2005; Valko et al., 2001].

Bei hohem Proteinverzehr kommt es zu einem vermehrten Auftreten von Proteinen, Peptiden und Harnstoff im Kolon. Durch den bakteriellen Metabolismus entsteht u.a. das Ammoniumkation (NH_4^+) welches im Tierversuch zytotoxisch wirkt und möglicherweise eine Rolle in der Kanzerogenese spielen kann [Biesalski und Fürst, 1999].

3.2. Reaktive Sauerstoffspezies und Oxidativer Stress

3.2.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Der Ausdruck Reaktive Sauerstoffspezies, kurz ROS (reactive oxygen species) ist ein Sammelbegriff für mehrere Sauerstoff-enthaltende Moleküle, die sowohl in der Physiologie als auch der Pathophysiologie von lebenden Organismen von Bedeutung sind. Die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Radikalische und nichtradikalische ROS nach [Halliwell und Gutteridge, 1999]

Radikale	nichtradikalische ROS
Superoxidradikal-Anion, $O_2^{\bullet-}$	Wasserstoffperoxid, H_2O_2
Hydroxylradikal, $HO^{\bullet}$	Ozon, O_3
Peroxylradikal, $ROO^{\bullet}$	Singulettsauerstoff, $^1O_2$
Alkoxylradikal, $RO^{\bullet}$	Organische Peroxide (ROOH)
Hydroperoxylradikal, $HOO^{\bullet}$	

Die zelluläre Atmungskette

Alle aerob lebenden Organismen benötigen Sauerstoff (O_2). Dieser wird im Verlauf der Zellatmung über vier Ein-Elektronen-Schritte zu Wasser reduziert. Diese Reduktion von läuft als Teil der Atmungskette in den Mitochondrien der Zellen, katalysiert durch den Komplex IV (Cytochrom C Oxidase) der mitochondrialen Elektronentransportkette, ab. Durch Reduktion von O_2 mit einem Elektron entsteht das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$); Reduktion mit zwei Elektronen führt zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses bildet durch Reduktion ein Hydroxylradikal ($HO^{\bullet}$) und Wasser. Das Hydroxylradikal wird dann durch den vierten Reduktionsschritt (und Protonierung) zu Wasser:

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$$
$$O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO^{\bullet} + H_2O$$
$$HO^{\bullet} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$$

Während dieser Schritte kann es zur Freisetzung von 1 – 5 % der einzelnen Spezies kommen [Halliwell und Gutteridge, 1999; Kelly et al., 1998].

Das **Hydroxylradikal** $HO^{\bullet}$ wirkt als reaktivste Sauerstoffspezies mit einem Standardreduktionspotenzial von 2,31 V stark oxidierend. Es kann in vielen biologisch relevanten Systemen entstehen, z.B. durch die Schwermetallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion aus $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2:

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + O_2$$

Die Eisenionen-katalysierte Teilreaktion wird auch als Fenton-Reaktion bezeichnet [Eisenbrand et al., 2005]:

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$$

Durch UV-Licht induzierte homolytische Spaltung von H_2O_2 (z.B. in der Haut bei Sonneneinstrahlung) oder durch die Zersetzung von Wasser durch ionisierende Strahlung kann ebenfalls $HO^{\bullet}$ entstehen. Einmal gebildet reagiert es sehr schnell mit fast allen Molekülen in seiner unmittelbaren Nachbarschaft, was sich in seiner außerordentlich

kurzen Halbwertszeit widerspiegelt (siehe Tabelle 3.2). $HO^{\bullet}$ bevorzugen dabei drei Reaktionstypen, die u.a. bei der Autoxidation von Fetten eine Rolle spielen: Wasserstoffabstraktion, Addition und Elektronentransfer [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Tabelle 3.2: Geschätzte Lebensdauer einiger ROS, nach [Römpp, 2009; Sies, 1991; Termini, 2000]

Reaktive (Sauerstoff)-Spezies	Halbwertszeit
Hydroxylradikal, $HO^{\bullet}$	10^{-9} s
Superoxidradikal-Anion, $O_2^{\bullet-}$	variabel, spontane und enzymatische Dismutation
Alkylradikal, $R^{\bullet}$	10^{-8} s
Alkoxylradikal, $RO^{\bullet}$	10^{-6} s
Peroxylradikal, $ROO^{\bullet}$	0,5 – 7 s
Singulett-Sauerstoff, $^1\Delta g\ O_2$	10^{-6} s
Wasserstoffperoxid, H_2O_2	stabil

Das **Superoxidradikalanion** $O_2^{\bullet-}$ ist im Vergleich zu $HO^{\bullet}$ weniger aggressiv. Seine Reaktivität ist abhängig vom Lösungsmittel, da sich in protischen Lösungsmitteln ein Gleichgewicht zur protonierten Form einstellt:

$$H^+ + O_2^{\bullet-} \rightleftharpoons HO_2^{\bullet}$$

Der pK_a-Wert dieser Reaktion beträgt ca. 4,8 so dass in menschliche Geweben das Verhältnis $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$ zwischen 100/1 und 1000/1 beträgt. Dennoch ist das durch Protonierung entstehende Hydroperoxyl-Radikal ($E^{0'}$ = -0,46 V) ein wesentlich stärkeres Reduktionsmittel als $O_2^{\bullet-}$ ($E^{0'}$ = -0,33 V) und kann, bedingt durch den Verlust seiner Ladung, Membranen durchdringen [Halliwell und Gutteridge, 1999]. $O_2^{\bullet-}$ wird im Organismus durch einige Enzyme gebildet, die O_2 zu $O_2^{\bullet-}$ reduzieren. Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin. Dabei werden Elektronen zu geringen Anteilen auf O_2 anstatt auf NAD^+ übertragen. Hämproteine, die nach O_2-Bindung und Elektronentransport von Fe^{2+} auf den Sauerstoff $O_2^{\bullet-}$ freisetzen, und Elektronentransportketten, wie in Cytochrom-P450-Enzymen oder in den Mitochondrien, gelten als wichtigste $O_2^{\bullet-}$-Quellen. Hier kommt es durch „Leckage“ zur direkten Elektronenübertragung auf den Sauerstoff und zur ständigen Bildung von ca. 2 – 3 nmol $O_2^{\bullet-}$ pro min und mg Protein [Kelly et al., 1998; Valko et al., 2006]. Des Weiteren wird $O_2^{\bullet-}$ durch Autoxidationsreaktionen einiger Moleküle wie Flavin-haltige Reduktionsäquivalente, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gebildet. Xenobiotika können durch so genanntes „Redox-Cycling“ ebenfalls $O_2^{\bullet-}$ generieren. Hierbei nimmt ein Chinon von einer Reduktase ein Elektron auf, das dann auf O_2 übertragen wird (z.B. Menadion, Abschnitt 3.7.3.1;

Abbildung 3.27). Dieser Prozess ist für die Toxizität vieler Stoffe mitverantwortlich [Eisenbrand et al., 2005].

Peroxylradikale ($RO_2^{\bullet}$) und **Alkoxylradikale** ($RO^{\bullet}$) sind sehr gute Oxidantien. Als einfachstes Peroxylradikal kann $HO_2^{\bullet}$, die protonierte Form des Superoxidradikal-Anions, betrachtet werden. Peroxylradikale entstehen vor allem durch Angriff von $HO^{\bullet}$ auf organische Verbindungen und direkter Weiterreaktion mit O_2:

$$HO^{\bullet} + R\text{-}H \rightarrow H_2O + R^{\bullet}$$

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$$

Auch durch den Abbau organischer Peroxide (ROOH) können $RO_2^{\bullet}$ und $RO^{\bullet}$ gebildet werden. Diese Reaktion wird durch UV-Licht oder durch Übergangsmetall-Ionen katalysiert:

$$ROOH + Fe(III) \rightarrow ROO^{\bullet} + Fe(II) + H^{+}$$

$$ROOH + Fe(II) \rightarrow RO^{\bullet} + OH^{-} + Fe(III)$$

$RO_2^{\bullet}$ und $RO^{\bullet}$ können Wasserstoff-Atome von anderen Molekülen abstrahieren, und tragen damit sehr stark zur Initiation der Lipidperoxidation bei [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Zu den wichtigsten nicht-radikalischen ROS zählt **Wasserstoffperoxid** (H_2O_2). Es entsteht durch alle Mechanismen die $O_2^{\bullet-}$ generieren, da es als Produkt der Superoxid-Dismutation gebildet wird. Außerdem gibt es viele Enzyme, die *in vivo* H_2O_2 produzieren, wie Xanthin, Urat- und D-Aminosäure-Oxidasen. H_2O_2 wirkt nur schwach oxidierend und reduzierend und reagiert kaum mit DNA, Lipiden oder Proteinen. Trotzdem wirkt H_2O_2 in Konzentrationen von ca. 10 – 100 µmol/L zytotoxisch. Dies beruht zum Teil auf der direkten Inaktivierung von Proteinen durch H_2O_2. So kann es eine labile Thiolgruppe (Cys149) im aktiven Zentrum von GAPDH zur Sulfensäure oxidieren und dadurch das Enzym inaktivieren [Ishii et al., 1999]. Durch Inkubation von Zellen mit Wasserstoffperoxid wurden auch Modifikationen an DNA, Lipiden und Proteinen gefunden, die nicht auf der direkten Wirkung des H_2O_2 beruhen können. Vielmehr wird es nach seinem Eindringen in die Zelle, wahrscheinlich metallkatalysiert, zum hochreaktiven $HO^{\bullet}$ reduziert (Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion) und bewirkt so einen großen Teil der nach H_2O_2-Inkubation beobachteten oxidativen Zellschäden [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Singulettsauerstoff $^1O_2$ zeichnet sich dadurch aus, dass die beiden entarteten π^*-Molekülorbitale Elektronen mit entgegengesetztem Spin aufweisen. Dabei existieren zwei Formen, die sich in ihrer Elektronenkonfiguration und Reaktivität unterscheiden (Abbildung 3.3). Bei dem Zustand $^1\Delta g$ handelt es sich zwar nicht um ein Radikal, da keine ungepaarten Elektronen vorliegen, er ist aber dennoch deutlich reaktiver als der Grundzustand. $^1\Sigma g^+$ ist wie der Grundzustand ein Diradikal (mit entgegen gesetztem Elektronenspin) und noch reaktiver als $^1\Delta g$. Singulettsauerstoff entsteht durch

Lichtanregung und ist hinsichtlich Reaktionen mit Molekülen im Singulettzustand (z.B. Fettsäuren) wesentlich reaktiver als Triplett-Sauerstoff ($^3O_2$). $^1O_2$ interagiert mit anderen Substanzen auf zwei Arten: er kann direkt mit ihnen reagieren oder er kann seine Anregungsenergie auf andere Moleküle übertragen, und selbst in den Grundzustand zurückzufallen. Dieses „quenching“ stellt eine Inaktivierung dar und wird u.a. bei Reaktion mit Tocopherolen und Carotenoiden beobachtet. $^1O_2$ reagiert mit ungesättigten Molekülen (z.B. ungesättigten Fettsäuren) entweder zu Endoperoxiden (konjugierte Doppelbindungen) oder Hydroperoxiden (einfache Doppelbindung; En-Reaktion) [Belitz et al., 2001; Halliwell und Gutteridge, 1999; Römpp, 2009].

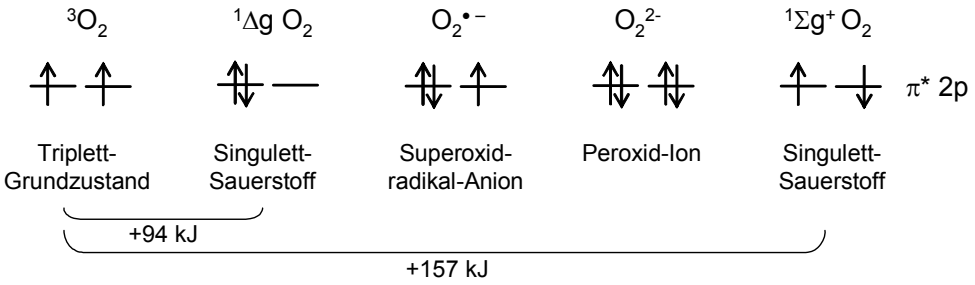


Abbildung 3.3: Besetzung der π*-Molekülorbitale in Sauerstoff und seinen Derivaten; nach [Halliwell und Gutteridge, 1999], modifiziert

ROS sind nicht immer nur schädigende Nebenprodukte einer Enzymreaktion, sondern werden z.B. aktiv von Leukozyten gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen (Bildung von HOCl durch Myeloperoxidase). Des Weiteren werden ROS bei der Synthese der Entzündungsmediatoren Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane aus Arachidonsäure benötigt [Halliwell und Gutteridge, 1999].

3.2.2. Oxidativer Stress

Die Entstehung von ROS steht im Gleichgewicht zu ihrer Beseitigung durch antioxidative Abwehrmechanismen (siehe Abschnitt 3.3). Ist dieses Gleichgewicht gestört, entweder durch eine gesteigerte Produktion von ROS oder durch deren verminderte Zerstörung steigt der Anteil an ROS in der Zelle an. Dieses vermehrte Auftreten von ROS wird „oxidativer Stress“ genannt und ist für viele Schäden verantwortlich, die an den verschiedenen Zellstrukturen entstehen.

3.2.2.1. DNA-Schädigung

Es wird geschätzt dass jede menschliche Zelle pro Tag ca. $1{,}5 \cdot 10^5$ Angriffen durch ROS ausgesetzt ist. Das Hydroxylradikal ist dabei die reaktivste ROS und reagiert schnell mit allen Komponenten der DNA, während andere ROS wie Peroxylradikale, Superoxid und H_2O_2 dagegen nicht in der Lage sind, die DNA anzugreifen. Da $HO^\bullet$ auf Grund seiner

hohen Reaktivität sofort nach Bildung weiterreagiert, ist zu vermuten dass es direkt an der DNA aus H_2O_2 entsteht. Katalysiert wird diese Reaktion wahrscheinlich durch Metall-Kationen (z.B. Fe), die auf Grund der hohen negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates an der DNA lokalisiert sind [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Der Angriff von $HO^{\bullet}$ an die Basen führt zu drei verschiedenen Schäden: Hydroxylierungen, Ringöffnungen und Fragmentierungen. Daraus entsteht eine Vielzahl von Sekundärprodukten. Außerdem wird auch direkt das Zucker-Phosphat-Rückgrat geschädigt, was zu DNA-Strangbrüchen führen kann [Kelly et al., 1998].

Das Hydroxylradikal kann Purin- und Pyrimidinbasen gleichermaßen angreifen; bislang wurden über 100 verschiedene Reaktionsprodukte identifiziert. So kann $HO^{\bullet}$ an Guanin an den Positionen C5, C6 oder C8 addieren oder an C4, C5, C8 von Adenin. An Pyrimidinbasen wie Thymin und Cytosin kommt es zur $H^{\bullet}$-Abstraktion aus dem Ring oder der Methylgruppe. Die entstehenden Radikale reagieren weiter zu Peroxiden, die dann zu Thymidin- oder Cytosin-Glykolen und anderen Folgeprodukten gespalten werden [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Neben den in Abbildung 3.4 dargestellten Reaktionsprodukten einer Base gibt es auch Reaktionen zwischen Basen, die zur Ausbildung von Inter- und Intrastrang-cross-links führen können, die jedoch um den Faktor 100 – 1000 weniger auftreten. So entstehen z.B. kovalente Bindungen zwischen C8 von Guanin und C5 von Cytosin oder der Methylgruppe von Thymin [Wang, 2008].

Eine der am besten untersuchten oxidativen DNA-Schädigungen ist die Reaktion von $HO^{\bullet}$ am C8 des Desoxyguanosins. Dies rührt daher, dass es mit einem Redox-Potential von 1,29 V am leichtesten oxidiert werden kann (zum Vergleich: Desoxyadenosin 1,42 V; Desoxycytosin 1,60 V; Thymidin 1,70 V) [Singh et al., 2009]. Der Angriff von $HO^{\bullet}$ an C8 führt zur Bildung der prominenten Reaktionsprodukte 8-Hydroxy-Deoxyguanosin (8-OH-dG) und Formamidopyrimidin (FaPy, 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin) durch Reduktion bzw. Oxidation des Guanosyl-Radikals (Abbildung 3.5) [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Neben dem Hydroxylradikal gibt es auch noch andere Quellen der DNA-Schädigung, z.B. UV-Licht oder Singulett-Sauerstoff. Dieser attackiert DNA-Basen wesentlich spezifischer als $HO^{\bullet}$ und bildet fast ausschließlich 8-OH-dG und FaPy. Eine DNA-Schädigung die vor allem durch UV-Strahlung induziert wird, ist die Bildung von Pyrimidin-Basen-Dimeren.

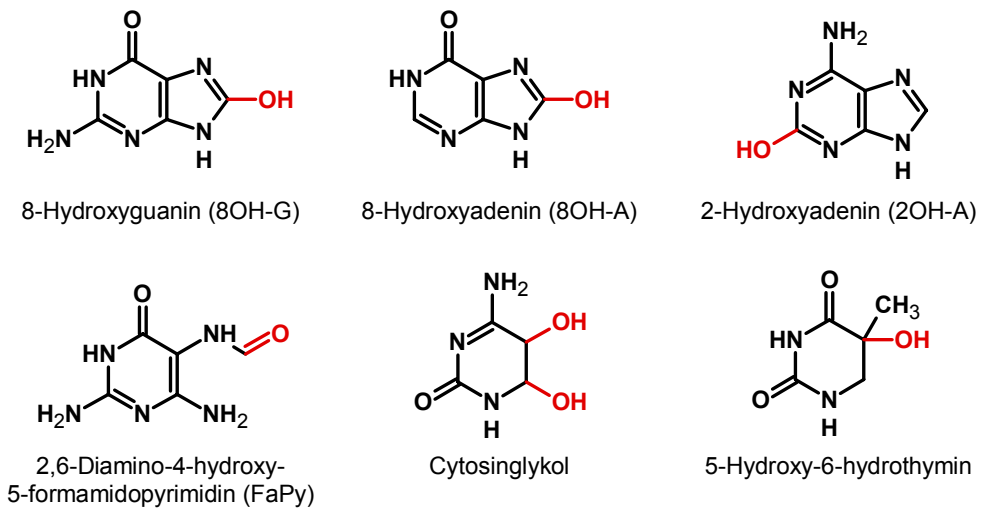


Abbildung 3.4: Beispiele für oxidierte DNA-Basen. Alle diese Schädigungen können durch den Angriff von HO• herrühren; nach [Halliwell und Gutteridge, 1999]

Absorption von UV-B-Strahlung (λ = 200 – 300 nm) durch Thymidin oder Cytosin führt zur Bildung angeregter Moleküle, die mit benachbarten Pyrimidinbasen dimerisieren können (Bildung von T-T-, T-C- oder C-C-Dimeren). Die gebildeten Dimere sind chemisch stabil und können nur zum Teil im Zuge der DNA-Reparatur wieder entfernt werden (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Eine weitere UV-induzierte DNA-Schädigung ist die Bildung von Cytosin-Hydrat durch Addition von Wasser. Dieses Hydrat ist nicht stabil und kann zu Uracil deaminiert werden.

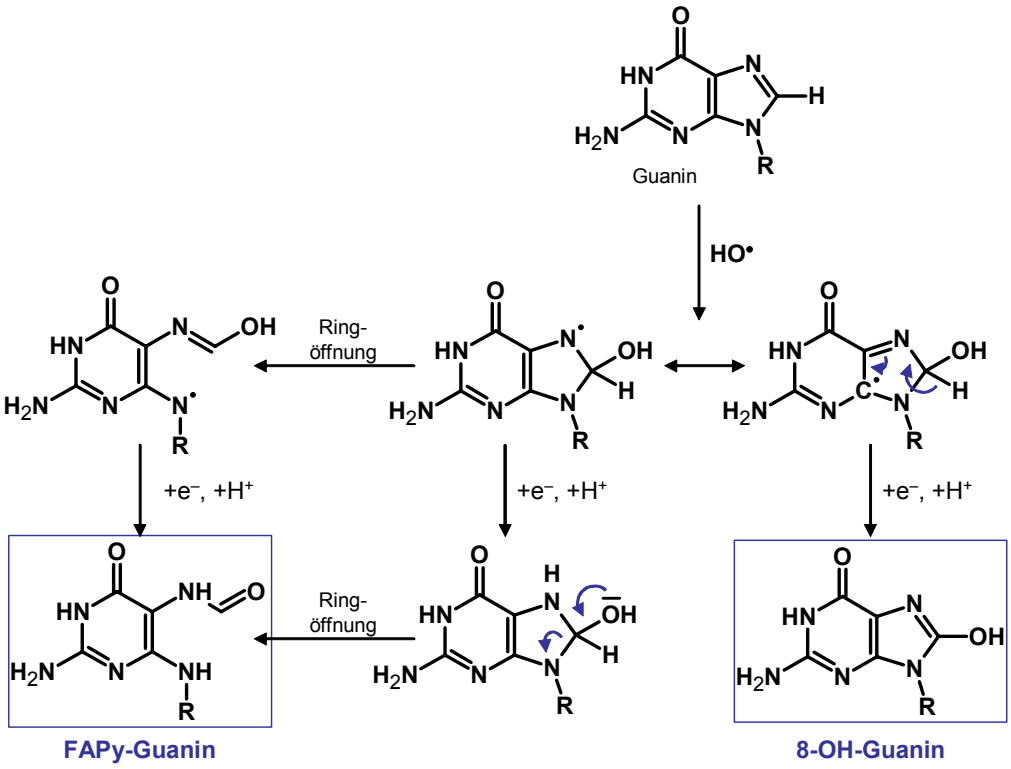


Abbildung 3.5: Oxidation von Guanin durch Hydroxylradikale; nach [Halliwell und Gutteridge, 1999]

Diese Schäden stehen vermutlich in Zusammenhang mit der Entstehung von Hautkrebs und anderen Krankheiten wie *Xeroderma pigmentosum* (Mondscheinkrankheit; Unvermögen, UV-induzierte DNA-Schäden zu reparieren) [Halliwell und Gutteridge, 1999].
DNA-Schäden führen, falls sie nicht rechtzeitig erkannt und repariert werden, zu Mutationen. So kann 8-OH-dG neben Desoxycytosin auch (mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit) mit Desoxyadenosin paaren. Dies führt zum Auftreten von Substitutions-Mutationen, d.h. ein Basenpaar wird durch ein anderes ersetzt (substituiert), wie in Abbildung 3.6 dargestellt:

G -- C → 8-OH-G -- C → 8-OH-G -- C → G -- A
8-OH-G -- **A** → **T** -- A

Abbildung 3.6: Einfluss der C8-Hydoxylierung an Guanin auf das Auftreten von Substitutions-Mutationen; nach [Halliwell und Gutteridge, 1999], modifiziert

Von den ROS-bedingten Mutationen sind ca. 85 % Substitutions-Mutationen, davon ca. 37 % G:C → T:A –Austausch und ca. 40 % G:C → C:G –Austausch [Termini, 2000]. Neben der Mutation durch Basenpaar-Substitution kann ein weiterer Mutationstyp erzeugt werden, die sog. frameshift- oder Leseraster-Mutation. Sie entsteht, wenn eines oder mehrere Nukleotidpaare in der normalen Sequenz eines Gens hinzugefügt werden oder wegfallen. Da für das korrekte Ablesen der genetischen Information das richtige Leseraster essentiell ist, wird schon durch Verlust eines einzigen Basenpaares das Gen fehlerhaft gelesen. Diese Mutation wurde für ROS-assoziierte Läsionen bislang nur durch Adduktbildung mit Malondialdehyd (MDA) beobachtet (Abbildung 3.7) [Eisenbrand et al., 2005; VanderVeen et al., 2003].

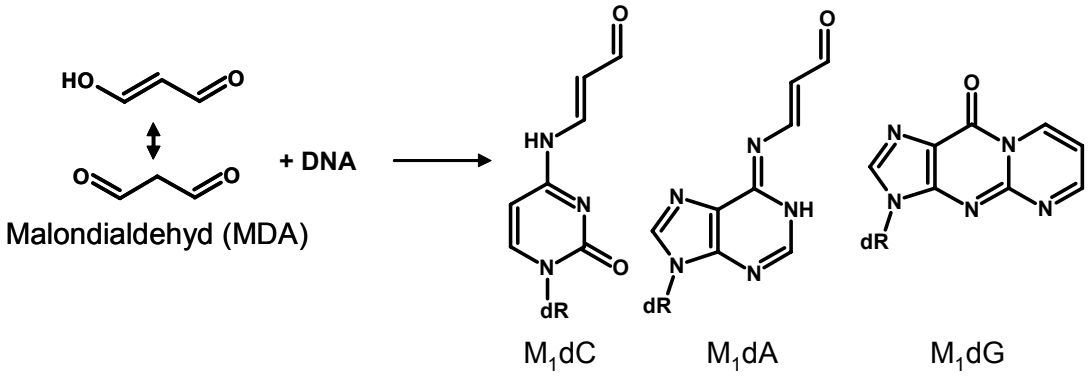


Abbildung 3.7: Beispiele für MDA-DNA-Basen-Addukte; nach [Valko et al., 2006]. dR: Desoxyribose

Vom Lipidperoxidationsprodukt MDA ist bekannt, das es in der Lage ist, DNA-Addukte zu bilden: es reagiert mit den DNA-Basen dC, dA und dG u.a. unter Adduktbildung zu M_1dC, M_1dA und M_1dG (Abbildung 3.7) [Valko et al., 2004]. M_1dG wird zwar durch NER repariert, ist aber unbedingt als mutagene Läsion anzusehen [Marnett, 2002]. Dies ist auf seine

Struktur als α,β-ungesättigte Carbonylverbindung zurückzuführen. Auch andere Substanzen mit diesem Strukturelement wirken als Elektrophile und können DNA-Schäden verursachen, was in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte [Gölzer et al., 1996; Janzowski et al., 2003; Janzowski et al., 2000].

Neben Schäden an den DNA-Basen können ROS (und vor allem HO•) auch das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA schädigen. Das Hydroxylradikal kann Wasserstoff-Atome von allen fünf C-Atomen der (Desoxy-)Ribose abstrahieren, was zur Ausbildung von C-Radikalen führt. Diese werden in Anwesenheit von O_2 zu Peroxylradikalen oxidiert, die sich unter Ausbildung verschiedenster Strukturen umlagern. Diese Umlagerung kann zur Ausbildung modifizierter Zucker, abasischer Stellen, Strangbrüchen und DNA-Protein-cross-links führen [Valko et al., 2004]. Manche dieser Läsionen (sog. alkali-labile Stellen) entwickeln sich auch erst nach Behandlung mit basischen Agenzien zu DNA-Strangbrüchen [Halliwell und Gutteridge, 1999].

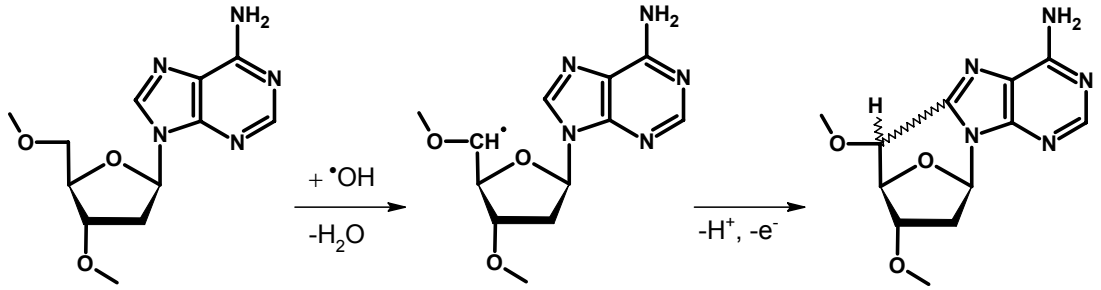


Abbildung 3.8: Bildung der Purin-Cyclonukleoside am Beispiel des Desoxyadenosins [Wang, 2008]

Eine weitere Möglichkeit ist die Cyclisierung von Desoxyribose mit einer Base, die über H-Atom-Abstraktion an C5' des Zuckers und nachfolgendem Angriff an C8 von Adenin oder Guanin verläuft (Abbildung 3.8) [Wang, 2008].

3.2.2.2. oxidative Proteinmodifikationen

Obwohl theoretisch alle Aminosäuren durch Hydroxylradikale oxidiert werden können, weisen ROS eine besondere Reaktivität gegenüber Molekülen auf, die einen nukleophilen Charakter besitzen. Dies umfasst ungesättigte und schwefelhaltige Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Methionin und Cystein, an die freie Radikale kovalent binden können. Dieser Angriff kann Proteine so modifizieren, dass sie nicht mehr in der Lage sind, ihre physiologische Funktion wahrzunehmen [Marquardt und Schäfer, 2004].

ROS können Aminosäuren aber auch oxidieren und so zerstören. Oxidation des Proteinrückgrates durch Wasserstoffatom-Abstraktion am α-C-Atom, Anlagerung von O_2 und weitere Radikal-Reaktionen können eine Spaltung der Peptidbindung, vor allem an

Glutamat und Prolin, die Einführung von Carbonylgruppen sowie intra- und intermolekulare Quervernetzungen zur Folge haben [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Die Oxidation von Aminosäure-Seitenketten führt zu einer Vielzahl möglicher Produkte. Die gegenüber Oxidation empfindlichsten Seitenketten sind die beiden Schwefel enthaltenen Aminosäuren Cystein und Methionin. Deren Oxidation führt im Fall von Cystein zumeist zur Ausbildung einer Disulfid-Brücke mit anderen Cystein-Resten und im Fall von Methionin zur Bildung des Sulfoxids. Beide Produkte können jedoch durch die entsprechenden redox-aktiven Thiole (Glutathion, Thioredoxin) wieder regeneriert werden [Stadtman, 2001]. Aufgrund dieser Reversibilität als auch der Suszeptibilität von Methionin, das durch fast alle ROS oxidiert werden kann, wird vermutet dass es sich bei dieser Reaktion um eine antioxidative Abwehr handelt, um andere Aminosäuren vor einer – möglicherweise irreversiblen – Oxidation zu bewahren [Stadtman, 2001; Valko et al., 2006].

3.2.2.3. Lipidperoxidation

Lipide können ebenfalls mit freien Radikalen reagieren, wobei zum einen reaktive lipophile Radikale gebunden werden, andererseits aber eine oxidative Kettenreaktion in Gang gesetzt wird, die Lipidperoxidation (LPO) genannt wird und zur oxidativen Zerstörung dieser Lipide führt. Im Falle der Membranphospholipide für die peroxidative Schädigung zur Beeinträchtigung der Funktion von Organell- und/oder Zellmembranen, was den Zelltod zur Folge haben kann [Marquardt und Schäfer, 2004].

Die Reaktion beginnt durch Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms durch eine radikale Spezies (Initiation). Dies kann $HO^{\bullet}$ sein, aber auch $HO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ oder $RO_2^{\bullet}$ können H-Atome abstrahieren [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Auf Grund ihrer niedrigen Bindungsdissoziationsenergie sind die bis-allylischen C-Atome der mehrfach ungesättigten Fettsäuren besonders gute Substrate der LPO [Kelly et al., 1998]. Durch Anlagerung von O_2 kommt es zur Bildung von Peroxyl-Radikalen, die dann ihrerseits H-Atome von Lipiden abstrahieren (Propagation). Die Reaktion der Alkoxyl- und Peroxyl-Radikale untereinander führt zur Bildung nicht-radikalischer Endprodukte und damit zur Beendigung der Reaktion (Termination).

Durch die Lipidperoxidation, der damit verbundenen Cyclisierung der Fettsäuren (zu Endoperoxiden) und anschießender Fragmentierung können verschiedenste Moleküle entstehen [Belitz et al., 2001]. Neben Eigenschaften als Aromakomponenten können diese auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen besitzen. Vor allem die toxischen Wirkungen von MDA und 4-Hydroxy-2-nonenal sind gut untersucht. Beide besitzen zwei Carbonylgruppen bzw. als Enol eine α,β-ungesättigte Carbonylfunktion, sind deshalb hochreaktiv und können an viele Zellbestandteile wie DNA (siehe Abschnitt 3.2.2.1) oder Proteine binden [Janzowski et al., 2003; Janzowski et al., 2000; Marnett, 1999].

3.3. Antioxidative Abwehrmechanismen

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, ist der menschliche Körper jeden Tag einer Vielzahl oxidativer Angriffe ausgesetzt, so dass wir ohne antioxidative Abwehrmechanismen kaum überlebensfähig wären. Dabei lässt sich die antioxidative Abwehr in zwei „Verteidigungslinien“ einteilen: während die primäre endogene Abwehr verhindert, dass Schäden durch ROS entstehen, ist die sekundäre Abwehr für die Reparatur schon entstandener Schäden zuständig.

3.3.1. Primäre endogene Abwehr

Die primäre endogene Abwehr umfasst alle Maßnahmen, um oxidative Schäden durch ROS zu verhindern. Neben antioxidativ wirksamen Enzymen sind auch niedermolekulare Substanzen, entweder körpereigene oder durch die Nahrung aufgenommene, für die Erhaltung des Redox-Status notwendig.

3.3.1.1. Endogene Antioxidanzien

Eines der wichtigsten zellulären Antioxidanzien ist das **Glutathion** (GSH, L-γ-Glutamyl-L-cysteinylglycin), welches in Konzentrationen bis zu 10 mmol/L in jeder Zelle vorkommt. Die Synthese erfolgt über zwei konsekutive Schritte bei der zunächst die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit Cystein ligiert wird (katalysiert durch γ-Glutamyl-cysteinligase, γGCL). Danach erfolgt die Bindung von Glycin durch das Enzym GSH Synthetase.

Die Aufgaben von Glutathion in der Zelle betreffen vor allem die Bereiche antioxidative Abwehr und Entgiftung [Halliwell und Gutteridge, 1999; Meister und Anderson, 1983]:

Durch Oxidation von 2 GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG) werden 2 Redox-Äquivalente frei, die ROS reduzieren können. Durch das niedrige Redox-Potential im Bereich -0,17 – -0,27 V [Millis et al., 1993] gilt dies für fast alle ROS (vgl. Tabelle 3.3). Die Oxidation geschieht zum größten Teil nicht-enzymatisch,

$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2\ H_2O$$

kann aber auch durch Enzyme wie Glutathion-Peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9; Abschnitt 3.3.1.3) katalysiert werden, wobei die GPx überwiegend organische Peroxide (z.B. Fettsäure-, Cumol- und *tert*-Butylhydroperoxid) und nicht H_2O_2 reduziert.

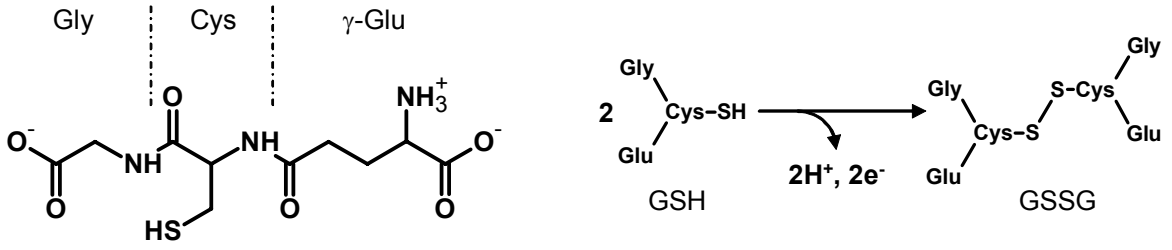


Abbildung 3.9: Strukturformel von Glutathion (links) und die Oxidation von Glutathion zum Disulfid GSSG (rechts); nach [Halliwell und Gutteridge, 1999]

Der Anteil von GSH zu GSSG liegt in den meisten Geweben bei > 90 % (GSH-Status), wobei eine Senkung dieses GSH-Status oder eine GSH-Depletion durch starken oxidativen Stress verursacht wird oder diesen zur Folge haben kann, da durch die GSH-Depletion die antioxidative Kapazität der Zelle gesenkt wird [Kelly et al., 1998]. Die Oxidation von GSH zu GSSG ist reversibel und stellt so ein Puffersystem für den Redoxzustand der Zelle dar. Sie wird durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GSR) reguliert, welches das oxidierte GSSG mit NADPH als Cofaktor wieder zu GSH reduziert (Abbildung 3.10).

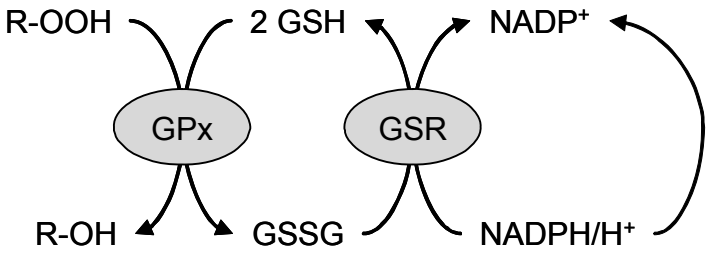


Abbildung 3.10: Reduktion organischer Peroxide durch GSH und dessen Regeneration; GPx: Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase

GSH entgiftet aber nicht nur ROS, es kann auch Protein-Thiole vor der Oxidation zu Disulfid-Brücken schützen bzw. oxidierte Thiole wieder reduzieren (vgl. Abschnitt 3.2.2.2) [Stadtman, 2001].

GSH dient auch als Cosubstrat für die detoxifizierenden Enzyme der Glutathion-S-Transferase Familie (GST, EC 2.5.1.18), die im Phase II-Metabolismus die Konjugation von GSH mit Xenobiotika katalysieren. Dies ist z.B. für α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen beschrieben, die in der Lage sind über 80% des zellulären GSH zu binden [Janzowski et al., 2000]. Diese GSH-Addukte werden dann in Mercaptursäuren umgewandelt und so ausgeschieden [Eisenbrand et al., 2005].

Thioredoxin ist ein Polypeptid mit einer Masse um 12 kDa und in eukaryotischen Zellen weit verbreitet. Es kann, von seiner Funktion her, als Analoges des GSH bezeichnet werden, da es, ähnlich wie im System GSH/GSSG, zwei nahe beieinander liegende Thiol-Gruppen mit einem Redox-Potential um -0,27 V aufweist. Die Hauptaufgabe von

Thioredoxin ist wahrscheinlich der Schutz von Proteinen vor Oxidation bzw. die Reduktion oxidierter Protein-Thiole. Dazu bindet Thioredoxin an die Zielproteine und reduziert, über die Ausbildung eines gemischten Disulfides, deren Disulfid-Brücken zu freien Thiolen. Auch Methionin-Sulfoxid, die oxidierte Form der Aminosäure Methionin, wird durch Thioredoxin wieder reduziert. Die Regeneration von oxidiertem Thioredoxin wird durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase katalysiert, ähnlich der Reaktion von GSR [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Ubichinon (Coenzym Q10) spielt als Elektronentransporter eine entscheidende Rolle bei der zellulären Atmungskette, wirkt aber auch als potentes Antioxidans. Es wird daher vor allem in den Mitochondrien aber auch in Zellmembranen und anderen Lipiden gefunden. Seine Hauptaufgabe ist die Regeneration von oxidiertem Tocopherol (Vitamin E); es kann aber auch direkt Peroxylradikale abfangen [Borek, 2004].

Bilirubin ist das Endprodukt des Häm-Abbaus und ist intensiv gelb gefärbt. Es liegt im Plasma hauptsächlich Albumin-gebunden in Konzentrationen von 3 – 21 µmol/L vor. *In vitro* wurde gezeigt, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und $^1O_2$ abfangen kann. Die Bedeutung *in vivo* ist allerdings noch unklar [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Aus Hypoxanthin werden durch die Xanthin-Oxidase Xanthin und daraus **Harnsäure** (Purinabbau) gebildet. In vielen Spezies wird Harnsäure über Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat abgebaut, nicht aber in Hominiden, die die gebildete Harnsäure über den Urin ausscheiden müssen. Im Menschen liegt Harnsäure normalerweise in Plasmakonzentrationen von 120 – 360 µmol/L vor und trägt damit den größten Anteil der antioxidativen Kapazität in Blutplasma. Harnsäure bildet nach Abfangen von Radikalen oder Oxidation durch ROS ein Resonanz-stabilisiertes Urat-Radikalanion, das nicht mehr zu einer Wasserstoffabstraktion fähig ist [Halliwell und Gutteridge, 1999].

3.3.1.2. Exogene Antioxidanzien

Die populärsten mit der Nahrung aufgenommenen Antioxidanzien sind wohl die Vitamine C und E (Ascorbat und Tocopherole). Die wasserlösliche Ascorbinsäure (Vitamin C) wird mit der Nahrung hauptsächlich über Obst und Gemüse aufgenommen und findet sich in jeder tierischen und pflanzlichen Zelle, teilweise in millimolarer Konzentration [Belitz et al., 2001]. Sie ist als Cofaktor für verschiedene Enzyme u.a. an der Synthese von Kollagen und Noradrenalin beteiligt und dient als Antioxidans gegen eine ganze Reihe oxidativer Spezies. Nachgewiesen ist die Schutzfunktion von Ascorbat gegen oxidative DNA-Schäden *in vivo* und *in vitro*. Außerdem eliminiert Ascorbinsäure $O_2^{\bullet-}$, $HO^\bullet$, $ROO^\bullet$, $^1O_2$, O_3 sowie andere reaktive Moleküle und hilft bei der Regenerierung der Antioxidanzien Harnsäure und α-Tocopherol [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Unter dem Begriff Vitamin E sind Tocopherol- und Tocotrienol-Isomere zusammengefasst, von denen das RRR-α-

Tocopherol die größten Wirkungen zeigt. Hauptquellen des fettlöslichen Vitamin E sind vor allem pflanzliche Öle, insbesondere Getreidekeimöle [Belitz et al., 2001]. Tocopherole (TocH) inhibieren die Lipidperoxidation, da sie die entstehenden Lipidperoxide ($LOO^{\bullet}$) abfangen, bevor sie mit Membran-Proteinen oder angrenzenden Fettsäuren reagieren können. Außerdem reagieren sie mit $^1O_2$ sowie mit $O_2^{\bullet-}$ und $HO^{\bullet}$. Die entstehenden Tocopheryl-Radikale ($Toc^{\bullet}$) können durch Ascorbat wieder regeneriert werden [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Weitere wichtige dietätische Antioxidanzien sind **Carotinoide** (z.B. Lycopin oder β-Carotin), die neben ihrer antioxidativen Wirksamkeit auch deutlich krebspräventive Eigenschaften zeigen und **Selen**, dessen antioxidative Wirksamkeit wahrscheinlich auf einer Steigerung der Enzymaktivität von GPx und Thioredoxin-Reduktase beruht, die beide Selen im aktiven Zentrum aufweisen [Borek, 2004; Pan und Ho, 2008; Valko et al., 2006]. Auf die große Gruppe der antioxidativ wirksamen sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, unter denen sich vor allen Dingen die **Polyphenole** hervorheben, soll in Abschnitt 3.4 näher eingegangen werden. In den letzten Jahren ist noch eine weitere Substanzklasse, die **Isothiocyanate**, in den Fokus der molekularen Ernährungsforschung gerückt die, obwohl sie (bis auf wenige Ausnahmen) keine direkte antioxidative Wirksamkeit aufweisen, über die Modulation protektiver Enzyme (wie GSTs, γGCL, GPx, GSR, …) eine starke krebspräventive Wirkung aufweisen [Pan und Ho, 2008; Valgimigli und Iori, 2009].

3.3.1.3. Antioxidativ wirksame Proteine

Eine wichtige Rolle bei der zellulären antioxidativen Abwehr spielen, neben den Antioxidanzien, die antioxidativ wirksamen Enzyme, deren Hauptaufgabe die Eliminierung schädlicher ROS ist; die drei wichtigsten sollen nun vorgestellt werden:

Superoxid-Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) ist ein Sammelbegriff für Oxidoreduktasen, die in allen Aerobiern vorkommen und die Umwandlung des Superoxid-Radikal-Anions zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff katalysieren:

$$2\,O_2^{\bullet-} + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Da SOD das Superoxidradikal-Anion als Substrat nutzt, ist sie vor allem in den Zellkompartimenten zu finden, in denen vermehrt $O_2^{\bullet-}$ generiert wird, wie Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen. Eine weitere Erklärung für die spezifische Lokalisierung der SODs ist die Undurchlässigkeit der Phospolipidmembranen für $O_2^{\bullet-}$. So ist die Anwesenheit der SOD in diesen Organellen zur Entgiftung toxischer Sauerstoffspezies unentbehrlich. Basierend auf dem Metall-Cofaktor können die SODs der Metazoa in zwei Klassen eingeteilt werden: Kupfer/Zink- (CuZn-) und Mangan- (Mn-) SOD; die ebenfalls existierende Eisen-SOD findet sich nur in Prokaryoten und Pflanzen. Von den drei in

Säugetieren entdeckten SOD-Isoformen gehören zwei zu den Cu/Zn-SOD (intrazelluläre SOD1, extrazelluläre SOD2) sowie eine Mn-SOD (SOD3) [Alscher et al., 2002].

Die **Katalase** (CAT; EC 1.11.1.6) ist eine Oxidoreduktase, die Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt und in fast allen aeroben Organismen vorkommt:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Katalase ist in allen tierischen Hauptorganen lokalisiert, besonders konzentriert liegt sie in der Leber vor. Subzellulär ist die Katalase größtenteils in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert. Diese, von nur einer Membran umgebenen Organellen, enthalten viele zelluläre Enzyme, die H_2O_2 generieren, z.B. die Glykolat-Oxidase oder Flavoprotein-Dehydrogenasen [Halliwell und Gutteridge, 1999]. Die Katalase hat verschiedene physiologische Funktionen im Organismus. Einerseits dient das Enzym in Organellen als Peroxidase, andererseits schützt sie Hämoglobin und andere Protein-Thiole in Erythrozyten vor oxidativen Schäden [Römpp, 2009].

Glutathion-Peroxidasen (GPx; EC 1.11.1.9) reduzieren organische Peroxide (ROOH) und H_2O_2 zu den entsprechenden Alkoholen (ROH) bzw. H_2O (siehe Abbildung 3.10). Die benötigten Reduktionsäquivalente werden durch die Oxidation von GSH zu GSSG bereitgestellt. Die Regenerierung des GSSG wird durch GSR mit NADPH als Cofaktor gewährleistet [Kelly et al., 1998]. Bisher sind vier Selen-abhängige Isoenzyme bekannt, die zytosolische GPx (cGPx, GPx1), die gastrointestinale GPx (GI-GPx, GPx2), die Plasma GPx (pGPx, GPx3) und die Phospholipid-Hydroperoxid GPx (PHGPx, GPx4). Des Weiteren existieren auch noch zwei Selen-unabhängige Isoenzyme: GPx5 wird in den Nebenhoden von Nagern und Affen exprimiert und enthält Cystein anstatt Selenocystein im katalytischen Zentrum. GPx6 wurde bisher ausschließlich im Geruchsephithel des Menschen nachgewiesen [Brigelius-Flohe, 2006].

Die vorgestellten Enzyme wirken nicht für sich alleine, sondern verstärken und unterstützen sich gegenseitig in ihrer Wirkung. So kann CAT das durch SOD gebildete H_2O_2 eliminieren während durch SOD $O_2^{\bullet-}$ abgebaut wird, welches als Inhibitor von CAT und GPx auftreten kann [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Im weiteren Sinne können auch Eisentransport- und -speicherproteine zu den antioxidativ wirksamen Proteinen gezählt werden. Während die oben vorgestellten Enzyme schon gebildete ROS abfangen, binden Transferrin und Ferritin Eisen-Ionen, um sie dem Organismus für Redox-Reaktionen zu entziehen. Das Glykoprotein **Transferrin** bindet freie Eisenionen im Blutplasma während **Ferritin** für die intrazelluläre Speicherung des Eisens zuständig ist; dieses in Ferritin gebundene Eisen macht etwa 26 % des gesamten Eisenpools aus. Durch die hohe Affinität von Transferrin zu Eisen und seiner

üblicherweise nur unvollständigen Sättigung (ca. 20 – 30 %) wird der Anteil an freiem Eisen im Blut im Normalfall auf Null reduziert [Halliwell und Gutteridge, 1999; Römpp, 2009].

3.3.1.4. Das antioxidant responsive element (ARE)

Neben der Beseitigung von ROS und Reparatur bereits geschädigter Makromoleküle spielt auch die Regulation protektiver Enzyme durch das sogenannte *antioxidant responsive element* (ARE), manchmal auch *electrophile responsive element* (EpRE) genannt, in der Chemoprävention eine große Rolle. Zu den ARE-regulierten Proteinen gehören Enzyme des Glutathionsyntheseweges (z.B. γGCL und Glutathion-Synthase), Redoxproteine mit aktiven Sulfhydrylgruppen (z.B. Thioredoxin) und Fremdstoff-metabolisierende Enzyme (GSTs, UDP-Glucuronosyl-Transferasen (UGTs), NQO1 und Hämoxygenase-1). Sie haben die Funktion der Detoxifizierung und/oder besitzen antioxidative Funktionen, wodurch sie die Zelle vor genotoxischer Schädigung schützen [Lee und Surh, 2005; Lee-Hilz et al., 2006; Nguyen et al., 2003]. Das ARE kann durch eine Reihe strukturell unterschiedlicher Substanzen aktiviert werden. Dazu gehören Phenole, Chinone, Mercaptane, thiolhaltige Strukturen wie Isothiocyanate, Schwermetalle oder Hämkomplexe. Die meisten aktivierenden Substanzen zeigen elektrophile und sulfhydrylbindende Eigenschaften [Lee und Surh, 2005].

Der „nuclear factor erythroid 2-related factor 2“ (Nrf2) ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor, der in der ARE-vermittelten Zellantwort auf oxidativen Stress und Fremdstoffe eine Rolle spielt. In der inaktiven Form liegt Nrf2 an Keap1 (Kelch-like erythroid-cell-derived protein with CNC homology-associating protein 1) gebunden im Zytoplasma vor. Nach Dissoziation des Komplexes durch Wechselwirkung der Aktivatoren mit den Cysteinresten von Keap1 oder nach Phosphorylierung des Komplexes kann Nrf2 in den Kern gelangen und an das ARE binden [Lee-Hilz et al., 2006].

3.3.2. Sekundäre endogene Abwehr / Reparatur oxidativer Zellschäden

Neben der Inaktivierung von ROS (primäre Abwehr, siehe Abschnitt 3.3.1) hat der Körper auch Strategien um bereits geschädigte Makromoleküle (DNA, Proteine, Lipide) entweder zu reparieren oder, falls das nicht möglich ist, diese Strukturen gezielt abzubauen.

3.3.2.1. DNA

Die korrekte Funktion der DNA-Reparaturenzyme ist für aerobe Lebewesen essentiell zum Überleben, da Zellen mit geschädigter DNA entweder die Zellteilung aussetzen (bis die DNA repariert ist) oder, falls das nicht möglich ist, in Apoptose gehen.

Fast alle oxidativen DNA-Schäden werden durch Basen-Exzisions-Reparatur (BER) repariert; dabei wird selektiv die geschädigte Base erkannt, ausgeschnitten und die entstehende Lücke wieder mit der richtigen Base gefüllt [Robertson et al., 2009].
Bei größeren Läsionen, die durch BER nicht korrigiert werden können (z.B. Crosslinks wie Pyrimidin-Dimere oder DNA- Addukte mit Kanzerogenen wie *cis*-Platin, Benzo[a]pyren-Diolepoxid, aromatischen Aminen, Aflatoxinen oder Nitrosaminen), kommt das Verfahren der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) zum Einsatz. Dabei wird ein größeres Nukleotid von 27 – 29 Basenpaaren Länge ausgeschnitten, in deren Zentrum die Modifikation liegt. Die entstandene Lücke wird dann, mit dem komplementären DNA-Strang als Vorlage, wieder gefüllt und durch eine DNA-Ligase geschlossen [Nouspikel, 2009]. Nach einem ähnlichen Verfahren funktioniert auch die Korrektur falsch eingefügter Basen (mismatch repair); diese können bei der Neusynthese der DNA eingefügt werden, aber auch durch Mutationen entstehen (z.B. frameshift-Mutation, Punktmutation). Dabei wird ein Oligonukleotid von 300 – 500 Basenpaaren ersetzt. Eine fehlerhafte DNA-Mismatch-Reparatur ist wahrscheinlich der Grund für das Auftreten von HNPCC (siehe Abschnitt 3.1.5.2) [Halliwell und Gutteridge, 1999; Möslein, 2008].
Eine der am schwersten zu reparierenden Läsionen stellt der DNA-Doppelstrangbruch dar, für den es zwei verschiedene Reparatur-Mechanismen gibt. Zum einen das nicht-homologe Endjoining, bei dem die beiden Enden der geschädigten DNA wieder ligiert werden, ohne eine homologe Vorlage (Schwester-Chromatid) zu haben. Der andere Mechanismus ist die homologe Rekombination, die den Bruch beseitigt indem die Informationen auf dem unbeschädigten Chromatid als Vorlage für die Neusynthese der fehlenden DNA genutzt werden. Dazu werden DNA-Abschnitte zwischen den beiden Chromatiden ausgetauscht (Schwesterchromatid-Austausch) [Wyman und Kanaar, 2006].
Das DNA-Reparatursystem wird unterstützt durch einen p53-vermittelten (vorübergehenden) Zellzyklusarrest. Dadurch werden die Zellteilung und die Weitergabe der DNA-Schäden an Tochterzellen verzögert und der Schaden kann repariert werden. Ist der Schaden zu schwer, geht die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) [Hoeijmakers, 2007].

3.3.2.2. Proteine

Oxidierte Proteine können ebenfalls repariert werden, wobei dies hauptsächlich die Regeneration oxidierter Thiole von Cystein und Methionin beinhaltet (siehe auch Abschnitte 3.2.2.2 und 3.3.1.1), die durch Disulfidreduktasen (z.B. Thioredoxin-System), Methionin-Sulfoxid durch MetSOx-Reduktasen regeneriert werden [Halliwell und Gutteridge, 1999; Stadtman, 2001].
Der größte Anteil irreversibel oxidierter Proteine wird jedoch abgebaut. Dies erfolgt über proteinspezifische Proteasen, lysosomale Proteasen sowie durch den zytoplasmatischen

26S-Proteasomkomplex, zu dem das 20S-Core Proteasom sowie zwei 19S-Cap Komplexe gehören. Abzubauende Proteine werden vom Körper durch Ubiquitinylierung (Bindung mehrerer Ubiquitin-Moleküle) markiert; diese werden durch die 19S-Cap Komplexe erkannt und entfernt. Gleichzeitig wird die Tertiärstruktur der Proteine ATP-abhängig zerstört und das lineare Protein wird sequentiell vom 20S-Core Proteasom abgebaut [Lecker et al., 2006].

3.3.2.3. Lipide

Hauptziel oxidativer Angriffe sind vor allem Membran-Lipide, Fettsäuren und Lipoproteine. Fettsäure-Peroxide in Membranen können mit Hilfe der Phospholipase A_2 von den Phospholipiden abgespalten und durch Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase zum Fettsäure-Alkohol reduziert werden. Die fehlende Fettsäure wird durch Reacylierung mit Fettsäure-CoA wieder ersetzt [Halliwell und Gutteridge, 1999].

3.4. Flavonoide und Polyphenole

Epidemiologische Studien beweisen, dass eine obst- und gemüsereiche Ernährung das Risiko an Krebs zu erkranken deutlich mindern kann [Steinmetz und Potter, 1996]. Viele der protektiven Wirkungen von Obst und Gemüse werden den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (auch Phytochemikalien genannt) zugeschrieben. Während die primären Pflanzenstoffe als Nährstoffe vorwiegend am Energiestoffwechsel und am Aufbau der Pflanze beteiligt sind, dienen die im sekundären Stoffwechsel gebildeten Substanzen (sekundäre bzw. nicht nutritive Pflanzeninhaltsstoffe) der Pflanze u.a. als Abwehrmittel gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farb- und Aromastoffe. Insbesondere wegen ihrer protektiven Effekte auf die Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten sind diese Substanzen verstärkt ins Interesse der Forschung gerückt [Craig, 1999].

3.4.1. Struktur und Vorkommen

Unter der Bezeichnung Polyphenole wird eine Klasse von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zusammengefasst, die als gemeinsames Merkmal einen oder mehrere phenolische Ringe aufweisen [Manach et al., 2004]. Die Gruppe der Polyphenole besteht aus mehreren tausend (derzeit) bekannten Substanzen und ist im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet. Die Biosynthese der Polyphenole geht von der Aminosäure Phenylalanin aus [Li et al., 2007] und ist schematisch in Abbildung 3.11 dargestellt:

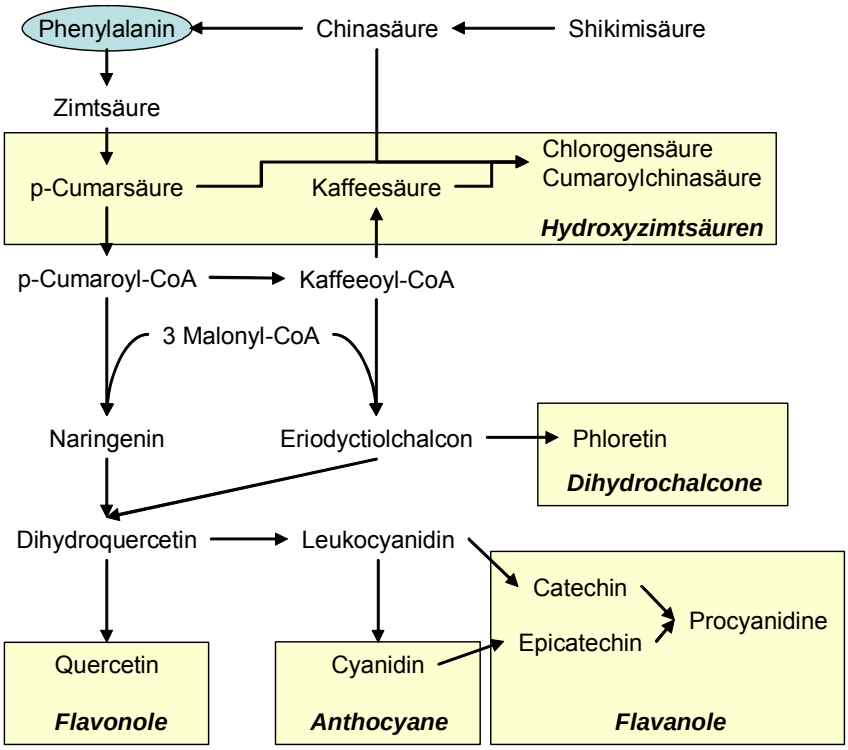


Abbildung 3.11: Biosynthese der Polyphenole in Äpfeln; nach [Li et al., 2007] modifiziert

Die wichtigsten Vertreter innerhalb der Polyphenole lassen sich in Gruppen mit unterschiedlich komplexen phenolischen Grundgerüsten aufteilen:

- Phenolcarbonsäuren und deren Derivate
- Flavonoide und (Dihydro-)Chalcone
- Cumarine
- Stilbene

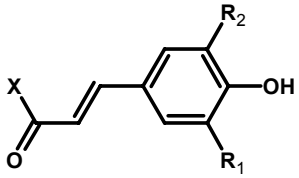
Zur besseren Strukturierung können auch diese Gruppen wiederum in Untergruppen eingeteilt werden. Da Stilbene und Cumarine bislang nicht als Inhaltsstoffe von Äpfeln nachgewiesen worden sind, soll im Folgenden nur auf die beiden ersten Gruppen eingegangen werden.

3.4.1.1. Phenolsäuren

Unter dem Begriff Phenolsäuren werden Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren (Abbildung 3.12) zusammengefasst, die meist mit organischen Säuren (z.B. Chinasäure) oder mit Zuckern verestert sind [Watzl und Rechkemmer, 2001b].

Hydroxyzimtsäuren, die sich von der Zimtsäure (3-Phenyl-*trans*-propensäure) ableiten, spielen auf Grund ihres teilweise hohen Gehaltes in verschiedenen Pflanzen eine wichtige Rolle. Vor allem die Chlorogensäure (5-Kaffeeoylchinasäure), die in Kaffee und Äpfeln, aber auch in Beeren- und Steinobst vorkommt, erreicht Konzentrationen, die im Bereich von 500 (Äpfel) bis 2080 (Heidelbeere) mg/kg FW (Frischgewicht) liegen können [Belitz et

al., 2001; Rice-Evans und Pecker, 2003]. In frisch aufgebrühtem Kaffee finden sich Gehalte von 500 – 800 mg/L [Olthof et al., 2003]. Die beiden anderen Isomere, 3- und 4-Kaffeoylchinasäure sind in Äpfeln zumeist nur in Spuren vorhanden; in Kirschen oder Pflaumen können sie jedoch hohe Konzentrationen erreichen (in Pflaumen: 4-Kaffeeoylchinasäure bis zu 100 mg/kg FW, 3-Kaffeeoylchinasäure bis zu 771 mg/kg FW) [Rice-Evans und Pecker, 2003].



Hydroxyzimtsäuren

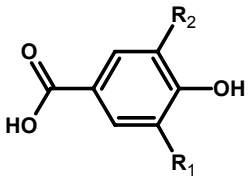
X = OH

p-Cumarsäure R_1=H R_2=H

Kaffeesäure R_1=OH R_2=H

X = 5-(-)-Chinasäure-Ester

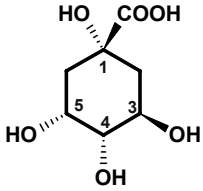
Chlorogensäure R_1=OH R_2=H



Hydroxybenzoesäuren

Gallussäure R_1=OH R_2=OH

Protocatechusäure R_1=OH R_2=H



(-)-Chinasäure

Abbildung 3.12: Häufig in Lebensmitteln vorkommende Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren, nach [Watzl und Rechkemmer, 2001b] modifiziert

Die zweite Gruppe der phenolischen Säuren stellen die **Hydroxybenzoesäuren** dar, die aus einem C_6C_1-Gerüst bestehen. Sie finden sich in Äpfeln kaum, sind jedoch, zumeist als Konjugate (z.B. an Zucker oder auch an Catechine) in vielen Pflanzen zu finden. Außerdem können sie als intestinale Abbauprodukte von anderen Polyphenolen im humanen Kolon entstehen (siehe Abschnitt 3.4.2.5). Ester der Gallussäure und der Hexahydroxydiphensäure bilden, neben den Proanthocyanidinen, eine der beiden Hauptklassen der pflanzlichen Gerbstoffe, die hydrolysierbaren Gerbstoffe oder Tannine [Belitz et al., 2001].

3.4.1.2. Flavonoide

Die Gruppe der Flavonoide, mit über 6500 bekannten Verbindungen wohl die größte Gruppe der in der Nahrung vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, besteht aus einem Diphenylpropan- oder Flavan-Gerüst ($C_6C_3C_6$) mit zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) (Abbildung 3.13). Die große strukturelle Vielfalt kommt durch Modifizierungen an den Grundgerüsten, zumeist durch Hydroxylierung aber auch durch Veresterung (z.B. Acetylierung) oder Veretherung (O-Methylierung) zu Stande [Watzl und Rechkemmer, 2001a]. An Hand struktureller Unterschiede am C-Ring können die Flavonoide in sechs Klassen eingeteilt werden:

- Flavonole
- Flavanole (Catechine)
- Anthocyane und Proanthocyanidine
- Flavanone
- Flavone
- Isoflavonoide

Abbildung 3.13 zeigt die wichtigsten, im Apfel vorkommenden Flavonoide:

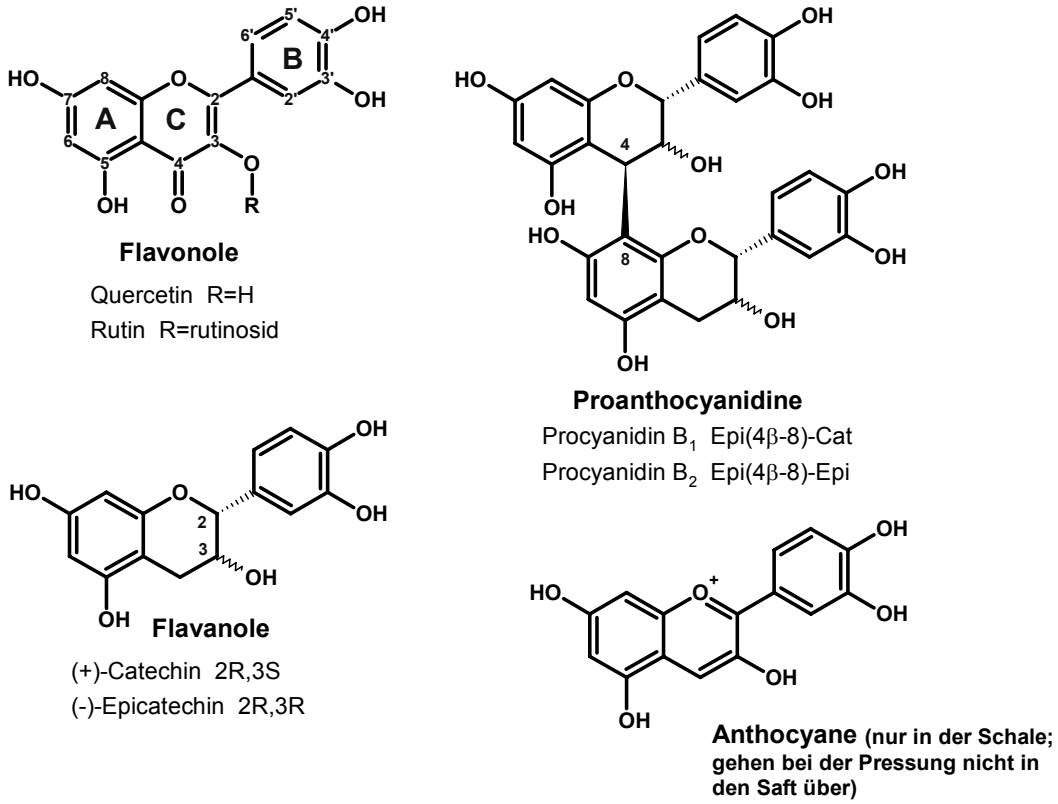


Abbildung 3.13: Strukturen wichtiger Flavonoide in Äpfeln. Flavonol-Struktur mit Kennzeichnung von A-, B-, und C-Ring sowie Nummerierung der C-Atome

Flavonole liegen meist als 3-Glycoside, weniger häufig als 7-Glycoside vor. Zuckerreste sind häufig Glucose, Galactose, Rutinose und weniger häufig Rhamnose, Arabinose, Xylose und Glucuronsäure. Außer den Rutinosiden gibt es zahlreiche weitere Di-, aber auch Tri- und Tetraglycoside [Thielen, 2006]. Flavonole sind die am häufigsten vorkommenden Flavonoide in der Nahrung und hauptsächlich in Zwiebeln (bis zu 1,2 g/kg FW), Lauch, Kohl, Brokkoli und Heidelbeeren zu finden; Tee und Rotwein enthalten bis zu 45 bzw. 30 mg/L Flavonole. Je nach Apfelsorte enthalten diese bis zu 1059 mg/kg FW Flavonole; in den sortenreinen Säften finden sich Gehalte bis zu 27 mg/L [Kahle et al., 2005a; Thielen, 2006]. Da die Biosynthese der Flavonole durch Sonnenlicht unterstützt wird, reichern sie sich vor allem im äußeren Gewebe der Pflanzen an [D'Archivio et al., 2007; Thielen, 2006]. Für die Aufnahme von Flavonolen finden sich Werte von 5,4 bis 35 mg pro Tag [Manach et al., 2005; Ovaskainen et al., 2008].

Flavanole oder **Catechine** kommen (anders als fast alle anderen Flavonoide) nicht als Glykoside sondern in monomerer und polymerer Form vor. Die Leitstrukturen in Pflanzen sind Catechin und Epicatechin; dabei finden sich Gallocatechin, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat (EGCG) vor allem in Tee. Weiterhin finden sich Catechine in Früchten wie Aprikosen und Kirschen, wobei Tee (Grüntee bis zu 800 mg/L), Schokolade (bis zu 460 mg/kg FW) und Rotwein (300 mg/L) mit Abstand die besten Quellen darstellen [D'Archivio et al., 2007; Watzl und Rechkemmer, 2001a].

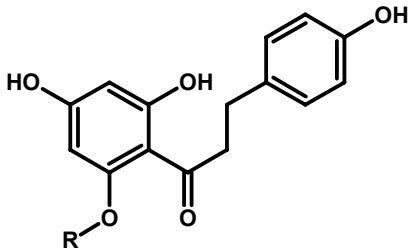
Pro(antho)cyanidine stellen Dimere, Oligomere und Polymere der einfachen Catechine dar. Durch Hydrolyse mit verdünnter Säure in organischen Lösungsmitteln zerfallen sie in Anthocyanidine, woher sie ihren Namen haben. Auf Grund ihrer starken Größenunterschiede stellen sie eine recht heterogene Gruppe dar, mit Polymerisationsgraden von 2 bis > 10. Auch strukturell können sie sehr variieren: Grundstrukturen sind die Flavanole, die meist an der 4- und 8-Position miteinander verknüpft sind, in seltenen Fällen auch an der 6-Position. Daneben sind aber auch Verzweigungen sowie Bindungen mit Nichtflavonoiden möglich [Manach et al., 2004]. Procyanidine sind für den bitteren und adstringenten Geschmack vieler Lebensmittel (Äpfel, Tee, Wein,…) verantwortlich, wobei das Maximum des Bittergeschmackes bei Procyanidin-Tetrameren liegt, während ein adstringenter Geschmack für höherpolymere Procyanidine mit etwa 6 bis 10 Grundeinheiten charakteristisch ist [Lea und Arnold, 1978]. Bislang gibt es kaum verlässliche Daten über den Procyanidingehalt v.a. höherer Polymere in Lebensmitteln, es wird jedoch angenommen das Auftreten und Menge in etwa den monomeren Flavanolen entsprechen [D'Archivio et al., 2007; Manach et al., 2004].

Anthocyanidine sind verantwortlich für einen großen Teil der roten, blauen, violetten und schwarzen Farben bei Pflanzen. Sie sind verantwortlich für die Farbe roter Äpfel, gehen aber beim Pressen nicht in den Saft über [Gerhäuser, 2008]. Anthocyanidine treten hauptsächlich als Glycosiden auf (und heißen dann Anthocyane), mit dem Zuckerrest in 3-, 5-, oder 7-Position. Sie finden sich in stark gefärbten Lebensmitteln wie Rotwein (bis zu 350 mg/L), Beeren und anderen Früchten vor allem in der Schale. Der Gehalt ist im Allgemeinen proportional zur Farbintensität und erreicht Werte von 2 – 4 g/kg FW in Brombeeren und schwarzen Johannisbeeren [D'Archivio et al., 2007]. Auch für Äpfel wurden Anthocyangehalte von bis zu 4 g/kg FW beschriebenen [Wojdylo et al., 2008], die tatsächlichen Werte liegen wahrscheinlich weit darunter.

Da Flavone, Flavanone und Isoflavone in Äpfeln nicht vorkommen, soll in dieser Arbeit nicht weiter auf sie eingegangen werden.

3.4.1.3. Dihydrochalcone

Phloretin, dessen Struktur in Abbildung 3.14 dargestellt ist, zählt zu den Dihydrochalconen. Sie finden sich in Nahrungsmitteln in Äpfeln, Erdbeeren und in Rooibos-Tee [Gerhäuser, 2008].



Dihydrochalcone
Phloretin R=H
Phloretin-2'-O-Glucosid (Phloridzin) R=Glu
Phloretin-2'-O-Xyloglucosid R=Xyl-Glu

Abbildung 3.14: Struktur der Dihydrochalcone am Beispiel Phloretin

Von Phloretin und seinen Glycosiden wurde lange Zeit angenommen, dass sie ausschließlich in Äpfeln und ihren Verarbeitungsprodukten (Apfelsaft, Apfelwein) zu finden sind. 2003 konnte Phloridzin jedoch auch in Erdbeeren identifiziert werden [Hilt et al., 2003].

Die in Äpfeln vorhandenen Polyphenole gehen bei der Pressung nicht vollständig und nicht zu gleichen Teilen in den Saft über. Hier spielen technologische Aspekte, die Lokalisation der Polyphenole im Apfel, deren Stabilität und Wasserlöslichkeit eine wesentliche Rolle. Auf diese Aspekte wird später eingegangen (Abschnitt 3.5).

3.4.2. Pharmakokinetik der Polyphenole

Da den Polyphenolen bioaktive Wirkungen zugeschrieben werden und sie auch vom Körper aufgenommen werden, kann ihr Schicksal, wie das anderer Xenobiotika auch, pharmakokinetisch durch das ADME-Konzept (absorption, distribution, metabolism, excretion) beschrieben werden [Marquardt und Schäfer, 2004]:

3.4.2.1. Absorption

Die **Absorption** der Polyphenole findet hauptsächlich im Darm (Dünn- und Dickdarm) statt. Es ist wahrscheinlich, dass das saure Milieu des Magens keinen Einfluss auf die Flavonoid-Glykoside hat und dass diese unverändert ins Duodenum gelangen. Einige Aglyca können bereits im Magen resorbiert werden; genau wie Anthocyanidine, was in Versuchen mit Nagern gezeigt werden konnte [D'Archivio et al., 2007].

Die meisten Aglyca werden im Dünndarm ohne weitere Probleme aufgenommen. Dies geschieht vermutlich mit Hilfe der Glucose-Transporter SGLT1 und GLUT2, die sowohl Flavonoid-Glykoside als auch deren Aglyka durch die apikale Membran in die Zelle schleusen können [Chen et al., 2007]. In der Zelle finden sich β-Glucosidasen, die die

aufgenommenen Glycosiden spalten [Day et al., 2000]. Andere Polyphenole, die als Ester oder Polymere vorliegen und in dieser Form nicht oder nur begrenzt aufgenommen werden können, müssen zunächst gespalten werden. Dies geschieht entweder durch Enzyme der Bürstensaum-Membran (wie LPH, Abschnitt 3.4.2.3) oder durch die intestinale Mikroflora des Darms (Abschnitt 3.4.2.5).

Für die Aufnahme von freien Hydroxyzimtsäuren werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. Zum einen die Aufnahme durch passive Diffusion der protonierten Säure im Magen und zweitens die Beteiligung aktiver Transporter im Dünndarm [Ader et al., 1996; Olthof et al., 2001]. Veresterte Hydroxyzimtsäuren wie Chlorogensäure werden wahrscheinlich zu einem Teil in Magen oder Dünndarm als intaktes Molekül absorbiert, wie Studien an Illeostomiepatienten belegen, bei denen eine Aufnahme von 33 % geschätzt wurde [Olthof et al., 2001]. Ein Großteil der Ester gelangt vermutlich unmetabolisiert in den Dickdarm, wo sie durch die intestinale Mikroflora gespalten und dann absorbiert werden [D'Archivio et al., 2007].

Sämtliche im Dünndarm nicht absorbierten Polyphenole gelangen in den Dickdarm wo sie, nach Metabolisierungs- und Abbaureaktionen durch die Mikroflora (Abschnitt 3.4.2.5), ebenfalls aufgenommen werden können. Welcher Anteil das Kolon erreicht ist nicht genau bestimmt. Bei Illeostomiepatienten, welche Polyphenole entweder als Reinstoffe oder als Bestandteil von Lebensmitteln aufgenommen haben, finden sich Werte zwischen 0 und 66 % [Kahle et al., 2005b; Olthof et al., 2001].

Da die Enterozyten des Darmes eine starke metabolische Aktivität aufweisen, finden hier auch schon die ersten Metabolisierungsreaktionen statt, noch bevor die Polyphenole in die Leber gelangen. Im Wesentlichen sind das Hydrolyse und Phase II-Reaktionen, auf welche aber in Abschnitt 3.4.2.3 näher eingegangen werden soll.

3.4.2.2. Verteilung

Im Gegensatz zu Pharmaka werden Polyphenole nur in geringen Mengen aufgenommen. Pharmaka können die Stoffwechselwege absättigen und kommen in unkonjugierter Form in Leber und Blut vor. Dies ist mit den phenolischen Verbindungen aus der Nahrung normalerweise nicht möglich, die zum größten Teil im Dünndarm metabolisiert werden und vorwiegend als Glucuronide über die Pfortader in die Leber gelangen. Dort können sie dann weiteren Metabolisierungsschritten unterliegen, bevor sie biliär durch den enterohepatischen Kreislauf als Aglyca oder glucuronidierte/methylierte/sulfatierte Konjugate wieder in das Kolon gelangen können [Scalbert und Williamson, 2000; Williamson et al., 2000]. Die biliäre Exkretion der Polyphenole und ihrer Konjugate ist dabei abhängig von ihrem Molekulargewicht, Polarität und Struktur [Siegers und Klaassen, 1983].

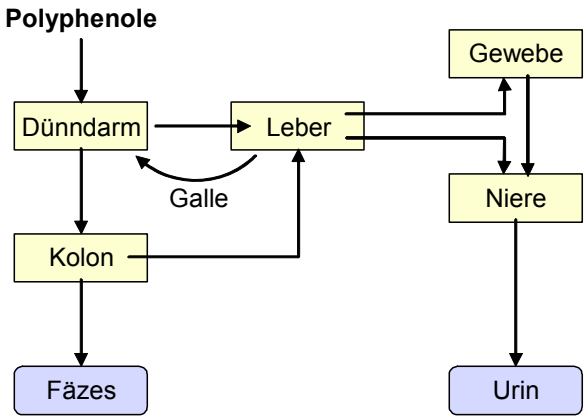


Abbildung 3.15: Mögliche Verteilungswege von Polyphenolen im Menschen, nach [Scalbert und Williamson, 2000]

Eine weitere Möglichkeit ist die Verteilung im Blutkreislauf. So konnten nach Gabe von Quercetin und Quercetin-Glykosiden (als Reinstoff oder als Bestandteil in Lebensmitteln) deren Glucuronide und Sulfate als Metabolite im Blut nachgewiesen werden; freies Quercetin wurde nicht gefunden [Day et al., 2001; Graefe et al., 2001; Manach et al., 2004].

3.4.2.3. Metabolismus

Bevor die phenolischen Substanzen aus dem Dünndarm ins Blut resorbiert werden, können sie schon in den Enterozyten einer Reihe von metabolischen Phase I- (Hydrolyse) und Phase II-Reaktionen (Konjugationen) unterliegen (First Pass-Effekt) (Abbildung 3.16).

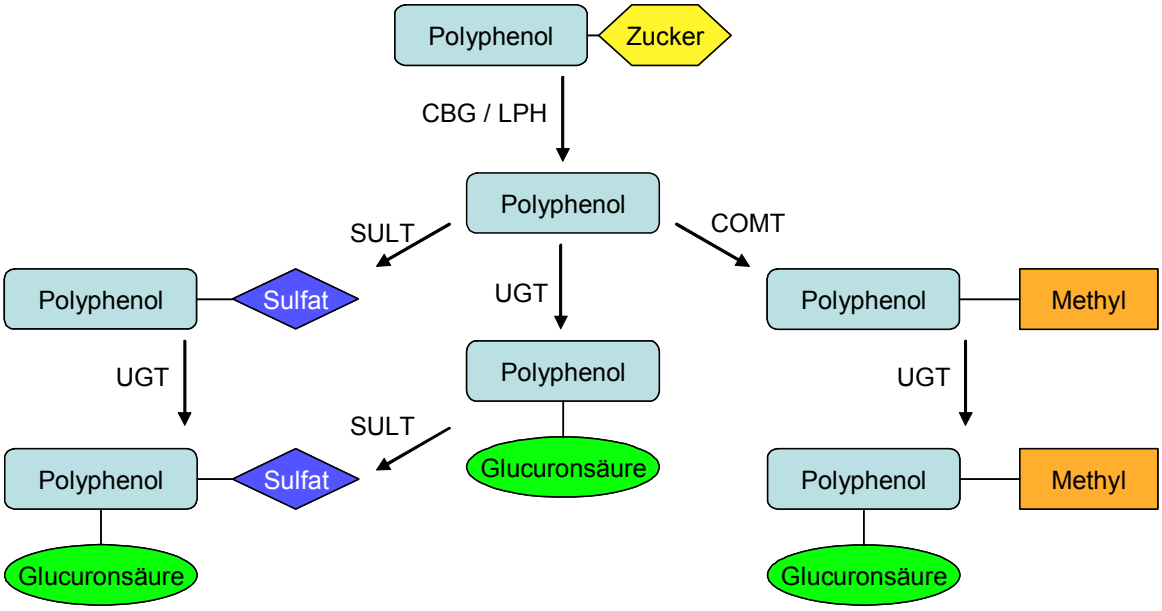


Abbildung 3.16: Vereinfachtes Schema zum möglichen Metabolismus im Dünndarm nach [Scalbert und Williamson, 2000]; CBG: cytosolische β-Glucosidase; LPH: Laktase-Phloridzin-Hydrolase; COMT: Catechol-O-Methyltransferase; UGT: UDP-Glucuronyltransferase; SULT: Phenol-Sulfotransferase

Hydrolyse

Glycosiden werden je nach Art des Zuckers und dessen Bindungsort durch intestinale β-Glucosidasen hydrolysiert. Zwei β-Glucosidasen wurden im Menschen identifiziert, die bei der Hydrolyse von Glycosiden eine Rolle spielen:

Laktase-Phloridzin-Hydrolase (LPH, EC 3.2.1.108) ist ein Enzym, welches im Bürstensaum des Dünndarms lokalisiert ist und hauptsächlich Laktose und Laktosylceramide aus der Milch hydrolysiert. Mit einer zweiten hydrophoben Domäne kann es zusätzlich Phloridzin in Phloretin und Glucose spalten. Auch Quercetin-Glycoside (v.a. Quercetin-3-glucosid) sind Substrate für die LPH, wobei die Umsetzung allerdings an der Laktase- und nicht an der Phloridzin-Hydrolase-Domäne abläuft [Day et al., 2000; Nemeth et al., 2003].

Die zytosolische β-Glucosidase (CBG) weist eine breite Substratspezifität auf und wurde vor allem in Leber, Niere und Dünndarm von Säugern gefunden. Sie wird mit der Detoxifizierung von Xenobiotika in Verbindung gebracht, um eine Bindungsstelle für Konjugationsreaktionen zu schaffen und damit eine schnelle Ausscheidung zu ermöglichen. Sie spaltet Glycoside, wobei Quercetin-3-glucosid und Rutin keine Substrate für dieses Enzym sind [Nemeth et al., 2003].

Cytochrom-P450-abhängige Phase-I-Reaktionen

Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen (CYPs) sind an der Metabolisierung von Flavonoiden beteiligt und können Hydroxylierungen und Demethylierungen katalysieren. Vor allem die beiden Isoenzyme CYP1A1 und CYP3A4 sind in den Metabolismus von Flavonoiden im Darm involviert. Ort und Grad der Reaktionen hängen stark vom Substitutionsmuster der Flavonoide ab: Hydroxylierung findet bei Flavonoiden mit keiner oder einer Hydroxylgruppe am B-Ring statt, während bei Anwesenheit von zwei oder mehr Hydroxylgruppen keine weiteren Hydroxylierungen beobachtet werden konnten. Demethylierungen finden sich nur bei Substanzen mit einer 4'-Methoxygruppe (z.B. Tamarixetin), nicht aber bei ihren 3'-O-methylierten Derivaten (z.B. Isorhamnetin) [Breinholt et al., 2002; Nielsen et al., 1998].

Konjugation

Die Polyphenole verbleiben nach ihrer Hydrolyse nicht lange in ihrer Aglycon-Form, sondern werden schnell konjugiert.

Catechol-O-Methyltransferase (COMT, EC 2.1.1.6) ist im Dopamin-Metabolismus involviert; sie unterliegt einem funktionellen genetischen Polymorphismus und kommt in verschiedenen Geweben vor. Außerdem ist sie verantwortlich für die Methylierung von Polyphenolen, dabei bestimmt die Art des Polyphenols den Ort der Methylierung. An der

4'-Position kann durch CYP-450-Enzyme eine Demethylierung stattfinden, jedoch nicht an 3'-Position, die die bevorzugte Angriffsstelle der COMT ist [Scalbert und Williamson, 2000; Williamson et al., 2000].

UDP-Glucuronyltransferasen (UGT; EC 2.4.1.17) katalysieren die Konjugation von Polyphenolen mit Glucuronsäure. Die Glucuronidierung von Polyphenolen wird vor allem durch die UGT 1A-Familie katalysiert, die in Darm, Leber und Niere vorkommen. Durch Alkohol, Drogen, Rauchen und durch Ernährung wird die Aktivität der UGT gesteigert, was die zum Teil großen interindividuellen Unterschiede erklärt [Scalbert und Williamson, 2000]. Die Glucuronidierung der Flavonoide verläuft regioselektiv, wobei die 3'-Position die bevorzugte Stelle der Glucuronidierung ist. Fehlt diese, verläuft die Glucuronidierung ausschließlich in 7-Position [Davis und Brodbelt, 2008]. Hydroxylierte Zimtsäuren können von Enterozyten ebenfalls glucuronidiert werden. Diese Reaktion findet z.B. bei Kaffeesäure an den beiden Hydroxylgruppen des aromatischen Ringes statt [Kern et al., 2003].

Sulfotransferasen (SULT; EC 2.8.2.1) sind eine kleine Gruppe zytosolischer Enzyme, die weit verbreitet sind. Es sind verschiedene Isoformen bekannt, von denen SULT1A1 und SULT1A3 die für die Sulfatierung von Polyphenolen entscheidenden Isoenzyme sind. Diese Enzymfamilie wird nicht durch Nahrung, Xenobiotika oder Umweltfaktoren induziert; einige werden hingegen durch Polyphenole gehemmt (Substrat-Inhibierung). Ausmaß von Sulfatierung und Inhibierung sind abhängig von der Struktur des C-Rings der Flavonoide [Huang et al., 2009; Scalbert und Williamson, 2000]. Die Sulfatierung der Hydroxyzimtsäuren verläuft, wie die Glucuronidierung, ebenfalls bevorzugt an den aromatischen OH-Gruppen [Kern et al., 2003].

Sonstige Phase-II-Enzyme, z.B. N-Acetyltransferase, Glutathion-S-Transferasen und Epoxidhydrolasen spielen keine wesentliche Rolle für den Polyphenol-Metabolismus [Scalbert und Williamson, 2000], jedoch wurde *in vitro* eine spontane GSH-Adduktbildung von Polyphenolen mit o-Catechol-Struktur (nach Oxidation zum o-Chinon mittels Tyrosinase/O_2 oder Meerrettich-Peroxidase (HRP)/H_2O_2) beschrieben [Moridani et al., 2001a; Moridani et al., 2001b].

3.4.2.4. Ausscheidung

Die Ausscheidung der Polyphenole erfolgt sowohl renal als auch biliär. Die Ausscheidungsrate schwankt zwischen 0,3 % und 19 % der aufgenommenen Menge. Dabei finden sich deutliche Substanzunterschiede sowohl zwischen den Stoffklassen als auch innerhalb einer Gruppe: Während die Ausscheidung für Chlorogensäure im Schnitt 0,3 % beträgt, wird Kaffeesäure zu 11 %, Quercetin-Glycoside zu 2,5 % und (Epi)Catechin zu 19 % über den Urin ausgeschieden [Manach et al., 2005].

Neben den Ausgangssubstanzen werden im Urin auch noch zahlreiche ihrer Metaboliten ausgeschieden. Polyphenole liegen hauptsächlich als Glucuronide aber, wie alle anderen Polyphenole, auch als Metabolite (oder glucuronidierte Metabolite) vor. Diese stammen zum Teil aus dem Abbau der Polyphenole durch Darmbakterien im Dickdarm und anschließender Resorption [Olthof et al., 2003; Rechner et al., 2002].

In Fäzes und vor allen Dingen in Fäzeswasser finden sich die Polyphenole/Abbauprodukte, die entweder im Darm nicht resorbiert werden oder durch den enterohepatischen Kreislauf wieder in den Darm sezerniert werden. Die Bestimmung dieser Substanzen erlaubt eine Abschätzung der Polyphenol-Gehalte im Darmlumen und lässt Schlüsse über die metabolische Aktivität von Darmbakterien und Leber zu [Jenner et al., 2005].

Ein großer Teil der Flavonoide wird wahrscheinlich nach Abbau über die Atemluft ausgeschieden. In Versuchen mit ^{14}C-markiertem Quercetin konnten in der Ausatemluft 42 – 64 % der oral verabreichten Radioaktivität als $^{14}CO_2$ detektiert werden, während der Anteil im Urin bei 3,3 – 5,7 % und der in Fäzes bei 0,2 – 4,6 % lag [Walle et al., 2001]. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Erkenntnissen zum intestinalen Metabolismus von Quercetin überein, da der radioaktiv markierte Kohlenstoff genau der ist, der durch die Decarboxylierung (Abbildung 3.17) abgespalten wird.

3.4.2.5. Bakterieller Metabolismus im Kolon

Aufgabe der intestinalen Mikroflora des Kolons ist der Abbau noch nicht verdauter Nahrungsbestandteile. Dazu zählen hauptsächlich (im Dünndarm nicht verdaute) Kohlenhydrate und Proteine, aber auch Xenobiotika wie Medikamente und bioaktive Lebensmittel-Inhaltsstoffe können von Darmbakterien metabolisiert werden [Rechner et al., 2004; Sousa et al., 2008; Thews, 1999].

Der Begriff Ballaststoffe beschreibt eine Vielzahl von **Kohlenhydraten** (Polysacchariden), die der Hydrolyse durch Verdauungsenzyme vollständig oder teilweise entgehen. Sie werden deshalb im Dünndarm nicht resorbiert und gelangen in den Dickdarm [Biesalski und Grimm, 2004]. Die in Äpfeln vorherrschenden Ballaststoffe sind Zellulose, Hemizellulose und Pektin [Sembries et al., 2003]. Ballaststoffe können zwar auch von den Bakterien im Darm nicht aufgenommen werden, jedoch besitzen sie spaltende Enzyme die diese Polymere zu kleineren Einheiten abbauen. So trennt die Zellulase, die aus einer exo- und einer endo-β-(1$\rightarrow$4)-Glukanase besteht, die glycosidischen Bindungen und spaltet die Zellulose zu Glucose, Zellobiose und -triose. Andere Bakterien produzieren Pektinase, welche Pektin abbaut [Gottschalk, 1988]. Die monomeren Kohlenhydrate können dann von den Bakterien aufgenommen und abgebaut werden. Hauptabbauprodukte sind kurzkettige Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids) wie Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure, die bei den physiologischen Bedingungen im

Kolon deprotoniert (als Acetat, Propionat und Butyrat) vorliegen. Aber auch andere Fettsäuren werden in geringem Maße gebildet, z.B. Valerat, Hexanoat und verzweigte SCFA wie iso-Butyrat und iso-Valerat [Beyer-Sehlmeyer et al., 2003].

Polyphenole erreichen den Dickdarm auf drei Wegen: entweder passieren sie den Dünndarm unverändert (als Glycosid, Aglycon oder Ester) oder werden von den Enzymen der Bürstensaummembran oder der intestinalen Mikroflora schon im Dünndarm metabolisiert [Kahle et al., 2007]. Die dritte Möglichkeit ist die Absorption im oberen Gastrointestinaltrakt, gefolgt von Konjugationsreaktionen und der biliären Exkretion ins Kolon [Gao et al., 2006]. Insgesamt erreichen bis zu 80 % der aufgenommenen Polyphenole in freier oder konjugierter Form das Kolon, wo sie durch die dortige Mikroflora weiter verstoffwechselt werden [Kahle et al., 2005b; Rechner et al., 2004].

Der erste Schritt des intestinalen Abbaus beinhaltet eine Dekonjugation der Polyphenole durch Glycosidasen, Glucuronidasen und Sulfatasen [Gao et al., 2006]. Anders als humane Enzyme ist die intestinale Mikroflora nun in der Lage, das Grundgerüst der Flavonoide/Polyphenole abzubauen, was in einer Vielzahl neuer Metabolite resultiert, im Allgemeinen mit einer einfacheren Struktur als die der Ausgangsstoffe [Spencer, 2003].

Der Abbau der **Flavonole** (wie Quercetin-3-glucosid) beginnt mit einer Deglycosilierung des entsprechenden Zucker-Restes, z.B. durch *Eubacterium ramulus* oder *Enterococcus casseliflavus*. Der weitere Abbau ist dann abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm. Während *Enterococcus casseliflavus* das Quercetin-Gerüst intakt lässt und nur die Glucose zur Energiegewinnung verstoffwechselt, greift *Eubacterium ramulus* auch das Aglycon an und produziert daraus das für Quercetin charakteristische Abbauprodukt 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure und Phloroglucinol, welches weiter zu Acetat und Butyrat abgebaut wird (Abbildung 3.17) [Braune et al., 2001]. Jedoch dient der Abbau des Quercetins nicht der Energiegewinnung, da *Eubacterium ramulus* ohne Zucker und mit Quercetin als einzigem Substrat nicht lebensfähig ist [Blaut et al., 2003]. Auch andere Flavonoide können von *Eubacterium ramulus* abgebaut werden. Dabei scheint die 4-Carboxyfunktion der Flavone, Flavonole und (Dihydro)Chalcone von entscheidender Bedeutung zu sein da die Flavanole Catechin und Epicatechin, denen diese funktionelle Gruppe fehlt, kein Substrat dieses Bakterienstammes darstellen. Auch die Anwesenheit der 3-Hydroxy-Gruppe hat einen Einfluss auf das Endprodukt des Abbaus. Flavonole (mit 3-OH-Gruppe) werden zu den entsprechend dem B-Ring substituierten Phenylessigsäuren, die Flavone (ohne 3-OH-Gruppe) zu Phenylpropionsäuren abgebaut werden. Grund für diesen Unterschied ist die Bildung einer Pyruvat-Zwischenstufe beim Abbau der Flavonole, welche bei der nachfolgenden Decarboxylierung ein C-Atom verliert (Abbildung 3.17) [Schneider et al., 2000].

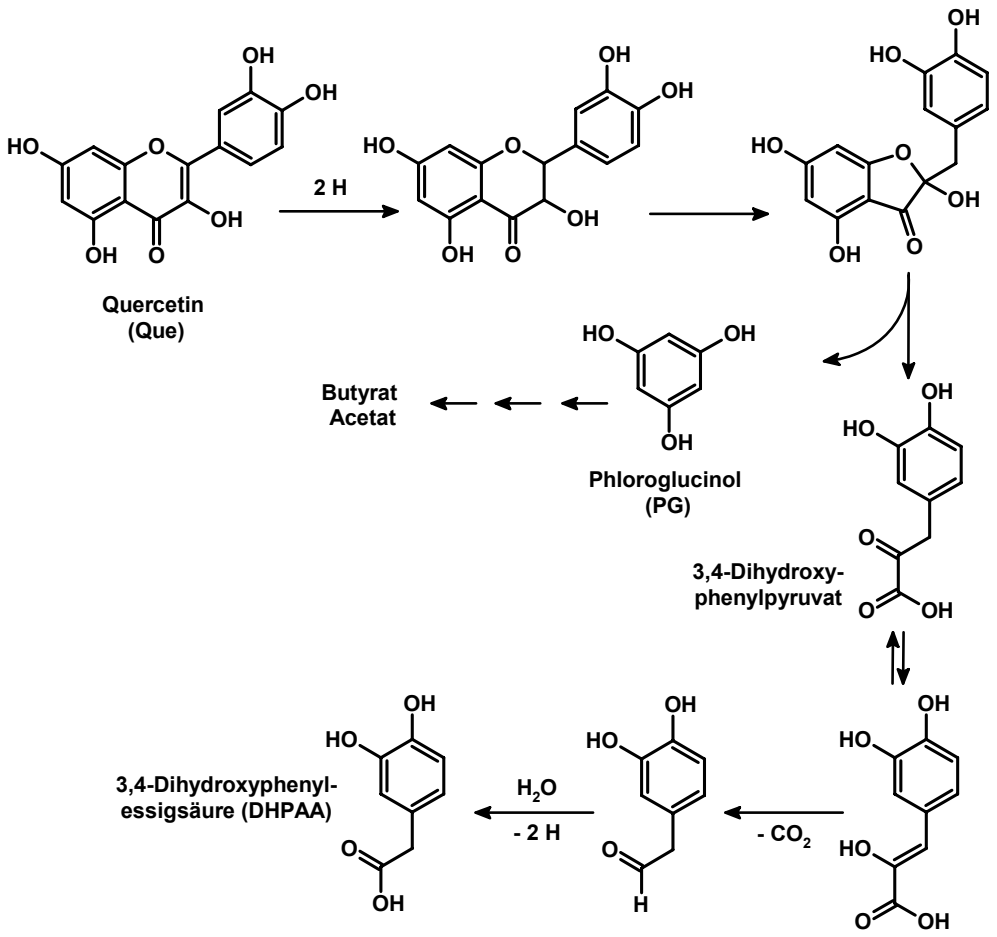


Abbildung 3.17: Abbau von Quercetin durch *Eubacterium ramulus*, nach [Blaut et al., 2003]

Auch andere Bakterienstämme als die beiden genannten sind in der Lage, Polyphenole abzubauen. So hat die Gruppe von M. Blaut am Deutschen Forschungsinstitut für Ernährung (DIFE) in Potsdam bislang einige Stämme entdeckt die, mehr oder weniger spezifisch, verschiedene Flavonoide oder Phenolsäuren metabolisieren. Als Beispiele sei neben den bereits erwähnten *Eubacterium ramulus* oder *Enterococcus casseliflavus* noch das gut untersuchte *Clostridium orbiscindens* genannt, welches Flavonoid-Aglyca zu den entsprechend substituierten Phenolsäuren abbaut, glycosilierte Flavonoide wie etwa Rutin auf Grund seiner fehlenden Deglycosylase-Aktivität aber nicht umzusetzen vermag [Schoefer et al., 2003].

Der Abbau des Dihydrochalcons **Phloretin** verläuft analog dem der Flavone, welche in dieser Abbaureaktion Vorläufer der Dihydrochalcone darstellen. Entsprechend dem Substitutionsmuster des B-Rings (nur eine 4-Hydroxygruppe) entsteht als Abbauprodukt hauptsächlich 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure sowie Phloroglucinol (Abbildung 3.18) [Schoefer et al., 2003].

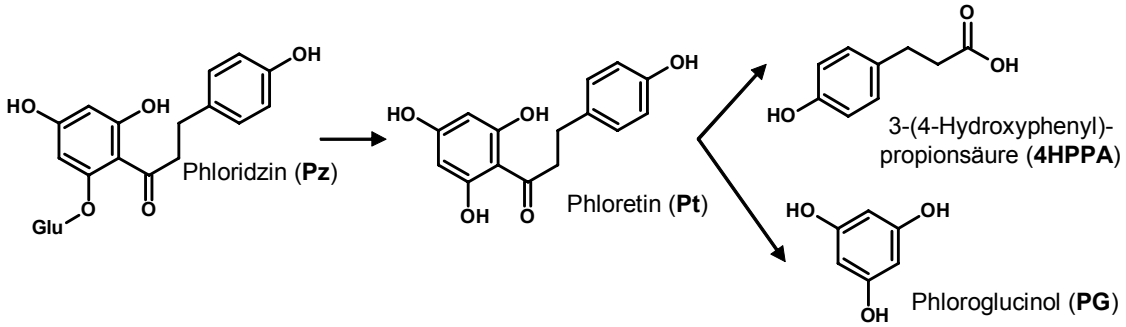


Abbildung 3.18: Abbau der Dihydrochalcone durch die intestinale Mikroflora, nach [Schoefer et al., 2003]

Der Abbau der **Flavanole** verläuft von (Epi)Catechin über die entsprechend hydroxylieren (-)-5-γ-Valerolactone (3',4'-Dihydroxy- aus (Epi)Catechin bzw. 2',3',4'-Trihydroxy- aus (Epi)Gallocatechin) zur 3-Phenylpropionsäure [Mulder et al., 2005]. Beim mikrobiellen Abbau der oligomeren Procyanidine entstehen neben dem Monomeren Epicatechin als Hauptmetabolite 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure und das (-)-5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-γ-Valerolacton (Abbildung 3.19). Als weitere Metaboliten konnten 3- und 4-hydroxylierte Phenylessig-, Phenylpropion- und Phenylvaleriansäuren identifiziert werden [Appeldoorn et al., 2009].

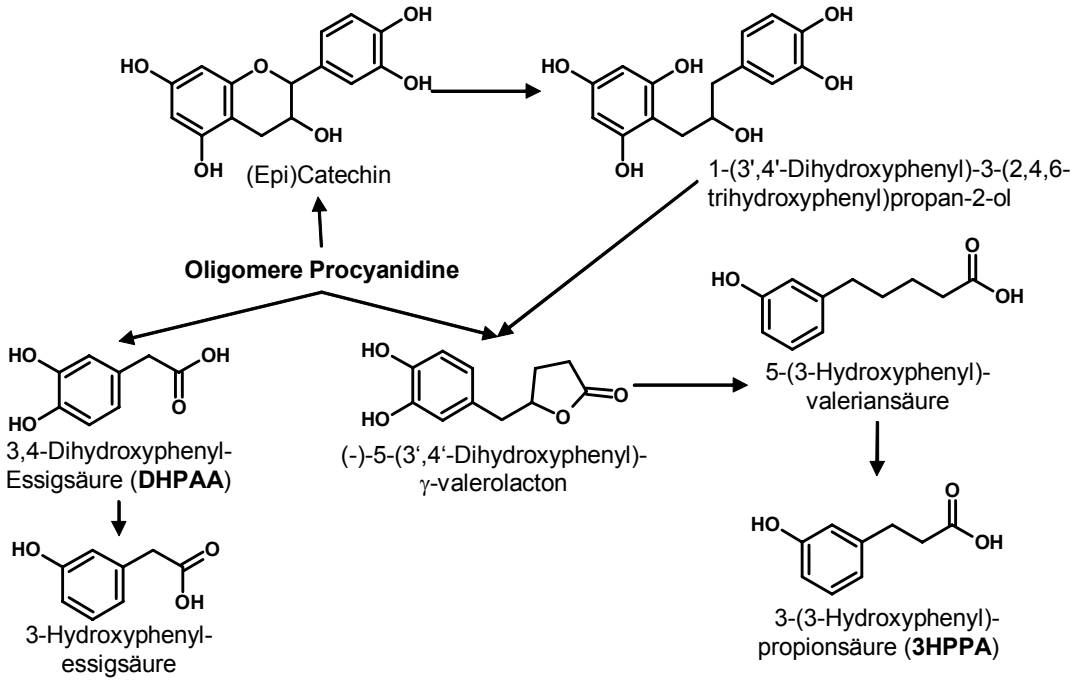


Abbildung 3.19: Vermutlicher Abbau der Flavanole und oligomeren Procyanidine, nach [Appeldoorn et al., 2009]

Chlorogensäure kann ebenfalls durch die Mikroflora abgebaut werden: zunächst entstehen China- und Kaffeesäure und daraus Dihydrokaffeesäure und 3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure. Nach Resorption der Metabolite im Kolon können sie

dehydroxyliert und/oder β-oxidiert werden. Durch Glycinierung entstehen Hippursäurederivate, die auch als Endprodukte für Chlorogensäure-, Teecatechin- und Quercetinglycosid-Metabolismus beschrieben sind (Abbildung 3.20) [Rechner et al., 2004].

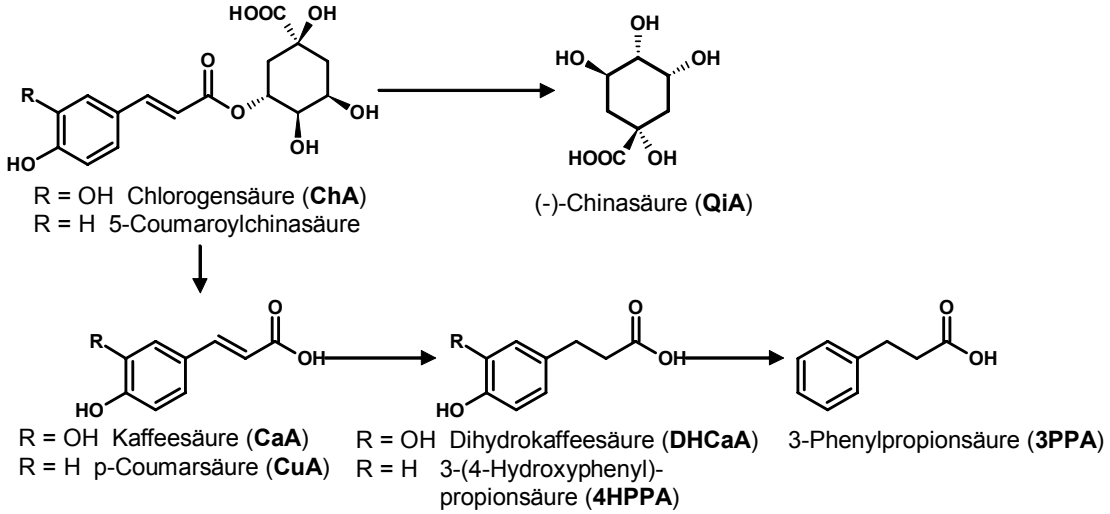


Abbildung 3.20: Abbau der Hydroxyzimtsäuren, nach [Rechner et al., 2004]

Viele dieser Metabolite sind mehr oder weniger hydroxylierte Phenolcarbonsäuren, die im Darm einfach resorbiert werden. In der Leber unterliegen sie weiteren Reaktionen wie O-Methylierung, β-Oxidation und/oder Glycinierung, so dass sie schließlich als methylierte Hydroxyphenolcarbonsäuren oder Hippursäurederivate in den Urin ausgeschieden werden (Abbildung 3.21) [Olthof et al., 2003; Rechner et al., 2002; Rice-Evans und Pecker, 2003].

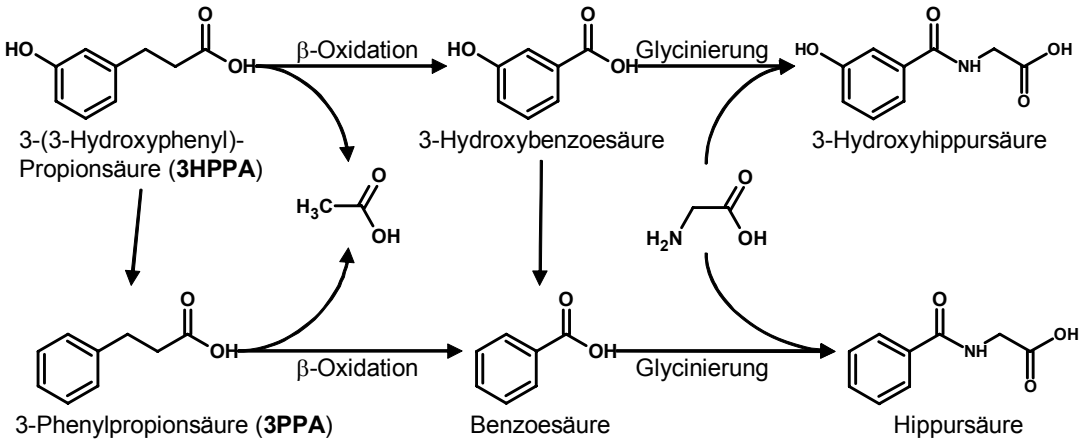


Abbildung 3.21: Metabolisierung der Phenolsäuren zu Hippursäuren in der Leber, nach [Rechner et al., 2002; Rice-Evans und Pecker, 2003]

3.4.3. Antioxidative Wirksamkeit der Polyphenole

Antioxidanzien sind Verbindungen, welche, in physiologischer Konzentration, Biomoleküle (Proteine, Nukleinsäuren, Lipide, Kohlenhydrate) vor oxidativen Veränderungen, vor allem

durch reaktive Sauerstoff-Spezies, schützen [Dangles et al., 1999]. Nach Halliwell Gutteridge [Halliwell und Gutteridge, 1999] wirken antioxidative Substanzen durch

- Unterdrückung der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies, entweder durch Inhibierung von Enzymen oder durch Abfangen von Metallionen, die an der ROS-Bildung beteiligt sind
- Direktes Abfangen reaktiver Sauerstoff-Spezies
- Induktion der antioxidativen Abwehr

Die antioxidative Wirksamkeit der Polyphenole beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen. Die wichtigsten sind die Übertragung von Wasserstoffatomen und Elektronen sowie die Komplexierung redoxaktiver Metallionen [Rice-Evans et al., 1996]. Auf diese beiden Mechanismen soll im Folgenden näher eingegangen werden. Polyphenole sind auch in der Lage, die antioxidative Abwehr von Zellen und Lebewesen zu verändern. Dies wird in Abschnitt 3.4.4 behandelt.

3.4.3.1. Reduktion

Auf Grund ihres niedrigen Redox-Potentials sind Flavonoide in der Lage ROS mit einem höheren Redox-Potential (Tabelle 3.3), wie Superoxid-, Peroxyl-, Alkoxyl- und Hydroxylradikale, zu reduzieren [Jovanovic et al., 1994; Pietta, 2000]. Bei der Oxidation geben die Polyphenole ein Elektron ab und werden selbst oxidiert. Diese Oxidation kann auf drei unterschiedlichen Reaktionsmechanismen beruhen:

1. **Protonen-gekoppelter Elektronen-Transfer (PCET)**

$$\text{PhO-H} + {}^{\bullet}\text{OR} \rightarrow [\text{PhO---H---}{}^{\bullet}\text{OR}]$$

$$[\text{PhO---H---}{}^{\bullet}\text{OR}] \rightarrow \text{PhO}^{-} + \text{H-}{}^{\bullet}\text{OR}$$

$$\text{PhO}^{-} + \text{H-}{}^{\bullet}\text{OR} \rightarrow \text{PhO}^{\bullet} + \text{H-OR}$$

Dieser Mechanismus findet sich häufig, wenn beide Reaktionspartner Sauerstoff als reaktive Gruppe besitzen, wie es z.B. bei Polyphenolen und ROS der Fall ist oder bei Reaktionen zwischen Phenolen und Phenoxyl-Radikalen. Hier kommt es zunächst zur Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen der Hydroxy-Gruppe des Phenols und einem nichtbindenden Elektronenpaar des Sauerstoff-Radikals bevor das Proton an dieses transferiert wird. Das zu übertragende Elektron bewegt sich dabei vom nichtbindenden 2p-Orbital des Phenols in das einfach besetzte Molekül-Orbital des Radikals [Litwinienko und Ingold, 2007].

2. **Direkter Wasserstoff-Atom-Transfer (HAT)**

$$\text{PhO-H} + \text{R}^{\bullet} \rightarrow \text{PhO}^{\bullet} + \text{R-H}$$

Bei diesem Mechanismus inaktiviert das Antioxidans ein Radikal durch Abgabe eines Wasserstoff-Atoms ($H^{\bullet}$) an dieses. Die Fähigkeit einer Substanz als Antioxidans zu wirken wird hier vor allem durch die Bindungsdissoziationsenergie (BDE) der H-abgebenden Gruppe bestimmt, d.h. die Reaktion läuft ab, wenn die BDE auf der Eduktseite kleiner ist als auf der Produktseite. Typische Werte (ΔBDE) liegen im Bereich von ~ -10 kcal/mol [Estevez und Mosquera, 2008; Prior et al., 2005]. Dieser Reaktionsweg wird zwar oft in der Literatur beschrieben, aber nach neueren Studien besteht die Möglichkeit, dass die HAT-Reaktion kein eigener Mechanismus ist, sondern gleichzusetzen ist mit dem PCET [Foti, 2007].

3. Sequentieller Protonen-Verlust Elektronen-Transfer (SPLET)

$$\text{PhO-H} \rightleftharpoons \text{PhO}^- + \text{H}^+$$
$$\text{R}^{\bullet} + \text{PhO}^- \rightarrow \text{R}^- + \text{PhO}^{\bullet}$$
$$\text{R}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-H}$$

Hier geht dem eigentlichen Elektronen-Transfer (in Schritt 2) die Dissoziation der Hydroxy-Gruppe mit Bildung eines Phenolat-Anions (PhO^-) voraus. Dieser Mechanismus findet daher vor allen Dingen in stark polaren Medien statt, in denen die anderen beiden Mechanismen durch kinetische Lösungsmitteleffekte abgeschwächt sind. Außerdem ist der SPLET stark von pH-Wert der Lösung abhängig, der direkt die Ionisierung (Schritt 1) beeinflusst [Foti, 2007].

In polaren Lösungsmitteln (S) wie z.B. Wasser wird die Oxidation eines freien Radikals durch PCET/HAT erschwert, da durch H-Brückenbindung ein 1:1-Komplex der Form PhO-H---S gebildet wird. Dieser ist aus sterischen Gründen nicht in der Lage, sein Wasserstoff abzugeben was nur ein „freies“ Phenol vermag. Dennoch finden sich auch in polaren Medien immer noch genug freie Phenole, die Radikale abfangen können, wenn auch mit verminderter Geschwindigkeit [Foti, 2007; Litwinienko und Ingold, 2007].

Grundsätzlich können aber alle drei Reaktionen ablaufen, wobei entweder eine dominiert oder eine Kombination dieser drei. Faktoren, die einen Einfluss auf den Mechanismus haben sind wie schon erwähnt das Lösungsmittel, aber auch die Struktur des Antioxidans und dessen Löslichkeit. Außerdem sind BDE und Ionisierungspotential zwei weitere Faktoren, die den Mechanismus und die Stärke eines Antioxidans bestimmen [Prior et al., 2005]

Bei der Oxidation von Radikalen entstehen, egal durch welchen Mechanismus, Phenoxyl-Radikale ($PhO^{\bullet}$), die durch Mesomeriestabilisierung im aromatischen System relativ stabil sind. Das Phenoxyl-Radikal ist nun in der Lage, verschiedene Folgereaktionen

einzugehen: es kann entweder ein weiteres Radikal oder sich selbst durch Dimerisierung inaktivieren:

$$PhO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R\text{-}Ph{=}O$$

$$PhO^{\bullet} + PhO^{\bullet} \rightarrow PhO\text{-}Ph{=}O \text{ oder } O{=}Ph\text{-}Ph{=}O$$

Diese Reaktionen finden vor allem an den Ring-C-Atomen in *ortho*- oder *para*-Position zum Sauerstoff-Radikal statt. Im Fall der Dimerisierung entstehen nicht, wie vielleicht erwartet, symmetrische Peroxide der Form PhO-OPh; vielmehr kommt es zur Ausbildung von C-C oder C-O-Bindungen [Foti, 2007].

Tabelle 3.3: Standard-Reduktionspotentiale (pH 7) von reaktiven Sauerstoffspezies und Polyphenolen [Foley et al., 1999; Halliwell und Gutteridge, 1999; Jovanovic und Simic, 2000]. Die ROS sind angegeben mit der oxidierten Spezies auf der linken und der reduzierten Spezies auf der rechten Seite

Substanz	Standard-Redoxpotential [V]
O_2 , H^+ / $HO_2^{\bullet}$	- 0,46
O_2 / $O_2^{-\bullet}$	- 0,33
Quercetin	0,33
Epigallocatechingallat	0,43
Kaffeesäure	0,53
Chlorogensäure	0,55
Catechin	0,57
Rutin	0,60
$O_2^{-\bullet}$, $2H^+$ / H_2O_2	0,94
$ROO^{\bullet}$, H^+ / ROOH	0,77 – 1,44 (je nach R)
$HOO^{\bullet}$, H^+ / H_2O_2	1,06
$RO^{\bullet}$, H^+ / ROH	1,60
$OH^{\bullet}$, H^+ / H_2O	2,31

Neben der beschriebenen Ein-Elektronen-Oxidation sind die Polyphenole auch zur Zwei-Elektronen-Oxidation in der Lage. Dabei folgt der eben beschriebenen Reaktion zum Phenoxyl-Radikal ein weiterer Oxidationsschritt (z.B. durch Reduktion eines weiteren Radikals), durch die das Phenoxyl-Radikal zur Oxo-Gruppe oxidiert wird (Abbildung 3.22).

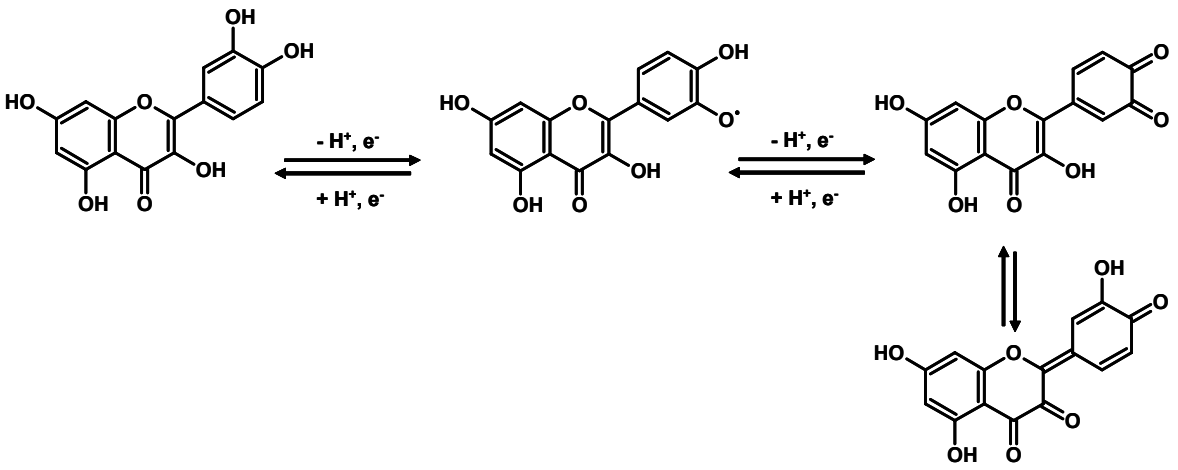


Abbildung 3.22: Ein- und Zwei-Elektronen-Oxidation am Beispiel von Quercetin nach [Dangles et al., 1999]

Die Fähigkeit zur Abgabe von Wasserstoffatomen aus Hydroxylgruppen hängt von deren Anzahl, vor allem aber von deren Position ab. Durch Struktur-Wirkungs-Untersuchungen wurden folgende Strukturmerkmale als wesentlich für die antioxidative Wirksamkeit der Flavonoide erkannt:

- eine *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring, meistens an 3',4'-Position
- die Carbonylgruppe an Position 4 in Konjugation zur 2,3-Doppelbindung
- Hydroxylgruppen in Position 3 und 5

(Zur Nummerierung der C-Atome in Flavonoiden siehe Abbildung 3.13).

Quercetin weist alle diese Strukturmerkmale auf, so dass es mit einer antioxidativen Wirksamkeit von 4,7 mM Trolox (im TEAC-Assay, siehe Abschnitt 3.7.10.1) das effektivste Antioxidans ist [Rice-Evans et al., 1996]. Eine Entfernung (Maskierung) einer oder mehrerer Elemente führt zur Verringerung der antioxidativen Kapazität, wie Abbildung 3.23 verdeutlicht.

Vor allem die Anwesenheit der 3'4'-Dihydroxygruppe (*ortho*-Catechol) hat einen starken Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide. Die vicinale OH-Gruppe kann das entstandene Phenoxyl-Radikal durch Wasserstoff-Brückenbindung derart stabilisieren, dass es zu einer Verminderung der BDE um 8,3 kcal/mol kommt [Brigati et al., 2002; Lucarini et al., 2004]. Dies spiegelt sich in der stark verminderten antioxidativen Wirksamkeit von Kaempferol im Vergleich zu Quercetin wider (1,3 bzw. 4,7 mM TEAC, vgl. Abbildung 3.23). Auch die C2-C3-Doppelbindung hat einen stabilisierenden Effekt auf die oxidierten Spezies, da sie es den entstandenen Radikalen bzw. Chinonen ermöglicht, über das ganze Molekül zu delokalisieren (Abbildung 3.22). Ohne die Doppelbindung steht dazu nur das π-System des B-Ringes zu Verfügung. Auch die C3-OH-Gruppe dient der Mesomeriestabilisierung der oxidierten Flavonoide. Sie ermöglicht, zusammen mit der C4-Keto-Funktion, die Ausbildung von Grenzformeln mit *ortho*-Catechol-Struktur an C3'-

C4' und C3-C4 (Abbildung 3.22). Fehlt die C3-OH-Gruppe (wie bei Luteolin) oder ist sie durch glycosidische Bindung inaktiviert (wie bei Rutin) kommt es zu einer Verminderung der antioxidativen Kapazität.

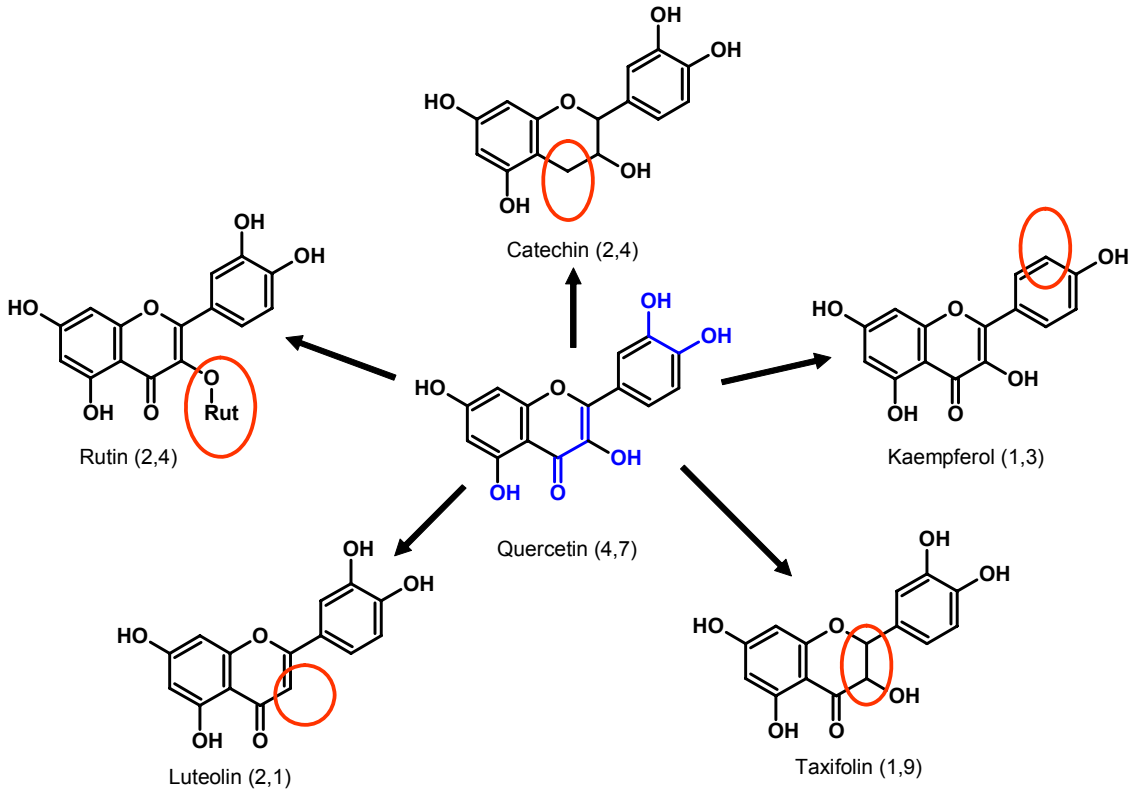


Abbildung 3.23: Einfluss verschiedener Strukturmerkmale auf die antioxidative Kapazität von Flavonoiden; in Klammern: TEAC [mM Trolox]; nach [Rice-Evans et al., 1996]

Die Wirkung von Flavonoiden ist außerdem abhängig vom pH-Wert: da die pK_a-Werte von Quercetin in wässrigem Milieu im physiologischen Bereich liegen, liegt es als Dianion vor. Ein Vergleich der pK_a-Werte zeigt, dass die Deprotonierung bevorzugt an den OH-Gruppen an C4' und C7 stattfindet, da die negative Ladung von dort über das ganze Molekül delokalisiert werden kann. Dagegen ist die Deprotonierung an C3 und C5 durch Wasserstoffbrücken-Bindung an die C4-Keto-Gruppe erschwert [Lemanska et al., 2001]. Auch Hydroxyzimtsäuren zeigen eine pH-abhängige Änderung ihrer Reduktionspotentiale und damit eine Steigerung ihrer antioxidativen Eigenschaften mit steigendem pH [Amorati et al., 2006; Giacomelli et al., 2002].

3.4.3.2. Komplexierung von Metallionen

Metallionen wie Cu(I) oder Fe(II) sind essentiell für viele der physiologischen Vorgänge des Körpers, z.B. im Hämoglobin oder als Cofaktoren verschiedener Enzyme. Diese Ionen sind jedoch schon in atto-molaren Konzentrationen (10^{-18} mol/L) beteiligt an der Bildung von ROS. Vor allem die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals durch Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion wird durch sie katalysiert; außerdem sind sie

mitverantwortlich für die Metall-induzierte Lipidperoxidation [Guo et al., 2007; Halliwell und Gutteridge, 1999; Valko et al., 2006].

Polyphenole haben die Fähigkeit, Metallionen durch Chelatbildung zu binden und dadurch die Eisen- oder Kupfer-katalysierte Bildung schädlicher Radikale zu verhindern. Flavonoide besitzen dazu drei mögliche Bindungsstellen zur Ausbildung von Metall-Flavonoid-Komplexen. Dies sind die Catechol-Gruppe (3',4'-Dihydroxyphenyl-Gruppe, Position I) des B-Rings, die 3-Hydroxy-4-Carbonyl-Gruppe (C-Ring, Position II) und die 5-Hydroxy-4-Carbonyl-Position (A- und C-Ring, Position III) (Abbildung 3.24) [Pietta, 2000].

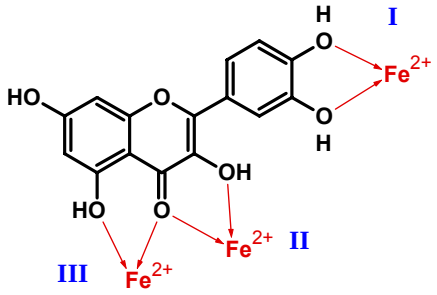


Abbildung 3.24: Mögliche Bindungsstellen für Übergangsmetall-Chelat-Komplexe, nach [Pietta, 2000]

Versuche mit spezifisch hydroxylierten Flavonolen zeigen, dass die bevorzugte Bindungsstelle für Fe^{2+} Position II ist, gefolgt von den Positionen III und I. Für Fe^{3+} hingegen konnte die Reihenfolge I > II > III ermittelt werden. Für die Stöchiometrie der Komplexbildung konnten 1:1- und 1:2-Komplexe von Fe mit Quercetin belegt werden; die Bildung eines 2:3-Komplexes (Fe:Quercetin) wird vermutet. Der 1:2-Komplex hat ein Fe^{2+} im Kern, welches tetraedrisch von zwei Quercetin-Molekülen koordiniert wird. Der 1:1-Komplex ist quadratisch planar, wobei Quercetin zwei Bindungsstellen ausfüllt. Die dritte Bindungsstelle ist durch ein Molekül Wasser besetzt. Für den 2:3-Komplex wird vermutet, dass ein Quercetin-Molekül verbrückend zwischen den beiden Fe-Kernen sitzt, die jeweils von einem weiteren Quercetin koordiniert sind. Auch für Fe^{3+}:Quercetin sind Komplexe der Stöchiometrie 1:1- und 1:2 bekannt, wobei der 1:2-Komplex dieselbe Form hat wie für Fe^{2+}. Beim 1:1-Komplex ist das Fe tetraedrisch koordiniert, die beiden freien Koordinationsstellen sind durch Wasser besetzt [Guo et al., 2007].

Ein weiterer Aspekt der antioxidativen Wirkung durch Komplexierung von Metallionen ist das sog. „site specific scavenging“: Sollte das Metallion auch nach seiner Komplexierung noch katalytisch aktiv sein, dann können die gebildeten Radikale direkt durch das benachbarte Flavonoid abgefangen werden [van Acker et al., 1998].

3.4.4. Biologische Wirkungen von Polyphenolen

Neben ihrer „direkten“ (zellfreien) antioxidativen Wirksamkeit, also dem Abfangen freier Radikale oder der Chelatisierung redoxaktiver Metall-Ionen, haben Polyphenole auch Einfluss auf eine ganze Reihe „indirekter“ (zellulärer) Effekte, indem sie die Abwehr der beteiligten Zellen modulieren. So wurde in den letzten Jahren vermehrt die präventive Wirkung von Polyphenolen auf die Entstehung verschiedener Erkrankungen (v.a. Krebs) auf verschiedenen Ebenen (von *in vitro*-Assays bis hin zu epidemiologischen Studien) untersucht. Die chemopräventive Wirkung der Polyphenole lässt sich dabei in zwei Mechanismen einteilen: Blockierung der Initiationsphase oder Unterdrückung der weiteren Wirkung (Promotion, Progression, Angiogenese, Invasion, Metastasierung) [de Kok et al., 2008]. Mögliche Wege um die Initiationsphase der Kanzerogenese zu blockieren beinhalten das frühe Abfangen reaktiver Sauerstoff-Spezies und anderer kanzerogener Strukturen sowie die Modulation des zellulären Metabolismus, um die Giftung von Prokanzerogenen zu verhindern und reaktive Metabolite schneller auszuscheiden. Ist es bereits zum Angriff der DNA gekommen, können Polyphenole deren Reparatur forcieren, bevor sich die entstandene Läsion als Mutation manifestiert [de Kok et al., 2008]. „Suppressive“ Verbindungen wirken nach der Initiation durch Kanzerogene. Sie greifen hemmend in die prämaligne und maligne Transformation von initiierten Zellen auf der Stufe der Promotion und Progression ein. Zugrunde liegende Mechanismen sind z.B. Wachstumshemmung, Modulation zellulärer Differenzierung und Apoptose, Erhöhung der Immunantwort sowie Aktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. Inaktivierung von Onkogenen [Lee und Surh, 2005]. Aufgrund der Heterogenität der Substanzen haben sie meist nicht nur eine einzige Wirkung, sondern greifen in viele Mechanismen des Organismus ein. Da in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft phenolische Verbindungen in einer komplexen Mischung vorliegen, sind potenzielle chemoprotektive Effekte meist nicht auf bestimmte Inhaltsstoffe zurückzuführen (additive und synergistische Wirkung) [de Kok et al., 2008].

3.4.4.1. Modulation des Fremdstoff-Metabolismus

Die Enzyme des Phase I- (Cytochrom P450) und Phase II-Metabolismus spielen nicht nur eine Rolle bei der Metabolisierung von Flavonoiden und Polyphenolen (Abschnitt 3.4.2.3), sie können auch durch diese Verbindungen in ihrer Aktivität beeinflusst werden, so dass potentielle Kanzerogene verstärkt abgefangen werden. Einige Flavonoide beeinflussen die Expression von CYP450, vor allem die Modulation der Isoenzyme CYP 1A1, 1A2, 2E1 und 3A4 schon auf Genexpressionsebene durch Bindung an den Ah (aryl hydrocarbon)-Rezeptor und Wirkung als Agonisten/Antagonisten. Dadurch könnte die giftende Wirkung des Phase I-Metabolismus auf viele Kanzerogene (wie z.B. Nitrosamine oder

polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) verringert werden [Gerhäuser, 2008; Moon et al., 2006; Pohl et al., 2006]. Auch detoxifizierende Phase II-Enzyme werden durch Polyphenole moduliert. Aber während die Aktivität der CYPs durch Polyphenole meist gehemmt wird (was zu einer verminderten Giftung von Präkanzerogenen führt), wird durch Induktion des Phase II-Metabolismus die Detoxifizierung/Ausscheidung gefördert. Dies umfasst die Induktion von Glutathion-S-Transferasen, Sulfotransferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen [Gerhäuser, 2008].

3.4.4.2. Einfluss auf die DNA-Reparatur

Durch die große Anzahl oxidativer DNA-Schäden durch ROS sind effiziente Reparatur-Mechanismen notwendig, die die Manifestation von Mutationen als Folge (oxidativer) DNA-Modifikationen verhindern. Eine verstärkte Aufnahme von Polyphenolen kann zu einer verstärkten DNA-Reparatur führen, was durch verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien angedeutet wird [Collins et al., 2003; Guarrera et al., 2007; Maurya et al., 2005]. Allerdings beruht dieser Anstieg nicht auf einer vermehrten Expression der Reparatur-zugehörigen Gene, da diese allenfalls leicht induziert wurden [Collins et al., 2003; Guarrera et al., 2007].

3.4.4.3. Proliferationshemmende Effekte

Die wichtigsten Mechanismen der Suppression bzw. der Eliminierung von Tumorzellen sind Zellzyklus-Arrest bzw. Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion. Flavonoide und Polyphenole zeigten in vielen *in vitro*-Studien wachstumshemmende Effekte in Kolonkrebszellen [Kern et al., 2005; Middleton et al., 2000; Veeriah et al., 2006]. So führte die 72h Inkubation von HT-29 Zellen mit polyphenolreichem Apfelsaftextrakt AE02 (zur Erklärung der Extrakte siehe Abschnitt 3.6) zu einer Wachstumshemmung der Zellen (IC_{50} = 134 µg/mL), was durch die Untersuchung einzelner Extraktbestandteile bestätigt wurde (IC_{50}-Werte zwischen 89 und >300 µmol/L) [Kern et al., 2005].

Angriffspunkte der Zellzykluskontrolle sind die Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die durch Polyphenole zumeist durch Induktion von CDK-Inhibitoren wie p21 oder p27 deaktiviert werden und damit zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1- oder G2/M-Phase führen [Ramos, 2008]. Weitere Angriffspunkte liegen in der MAP-Kinase-Kaskade, wo Polyphenole bereits auf der Ebene des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) eine Hemmung zeigen und damit das Anschalten des weiteren Signalweges verhindern [Kern et al., 2005]. Durch Interaktionen mit dem Aryl-Hydrocarbonrezeptor (AhR) können ebenfalls Signalwege aktiviert werden, die mit dem Zellwachstum assoziiert sind; auch die Hemmung von Cyclinen verläuft, zumindest partiell, durch Interaktion mit dem AhR [Murray et al., 2006].

Ein weiterer Mechanismus zur Kontrolle des Zellwachstums ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Dieser kann durch zwei Signalwege initiiert werden: einmal extrinsisch, über Plasmamembran-Rezeptoren vermittelt oder intrinsisch über Aktivierung der Mitrochondrien. An der mitochondrialen Regulation der Apoptose sind Proteine der Bcl-2-Familie beteiligt, die sich in Agonisten und Antagonisten unterteilen lassen. Sie regulieren die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, welches zusammen mit Apaf-1 das sogenannte Apoptosom bildet und die Aktivierung von Caspasen (cysteinyl-aspartate specific protease) initiiert. Auch die extrinsische Stimulation von Membran-Rezeptoren (z.B. durch den Tumor-Nekrose-Faktor TNFα oder FasL) führt zur Caspase-Aktivierung. Die durch diese Wege aktivierten sogenannten Initiator-Caspasen (Caspase 8, 9) aktivieren ihrerseits wieder Effektor-Caspasen (v.a. Caspase 3), die für den proteolytischen Abbau verantwortlich sind. Bei der Apoptose erfährt die Zelle eine Reihe morphologischer Veränderungen: ein Schrumpfen und Abrunden (Abbau des Zytoskeletts durch Caspasen), Chromatinkondensation und Fragmentierung der DNA (Bildung einer „DNA-Leiter“ durch Endonukleasen) und Bildung apoptotischer Körperchen (die dann durch Phagozytose verdaut werden) [Gerhäuser, 2008; Halliwell und Gutteridge, 1999; Marquardt und Schäfer, 2004]. Durch vermehrte Expression proapoptotischer bzw. Hemmung antiapoptotischer Proteine sowie durch Induktion der Caspase 3-Aktivität wurden Flavonoide und Polyphenole als Apoptose-induzierende Verbindungen identifiziert [Gerhäuser, 2008; Kampa et al., 2004; Kuntz et al., 1999].

3.4.4.4. Einfluss auf Entzündungsreaktionen

Polyphenole sind starke Antioxidantien, aber ihre anti-inflammatorische Wirkung *in vivo* beruht vermutlich auf einer Modulation der Signaltransduktion und Genexpression [Shapiro et al., 2007]. Ein wichtiges Ziel der Polyphenole ist NF-κB, welches als entscheidender Transkriptionsfaktor für die Genese von Entzündungen betrachtet wird. Im Normalfall ist NF-κB im Cytosol an einen Inhibitor (IκB) gebunden und wird durch IκB-Kinasen (IκK) von ihm getrennt. IκK kann durch bei Entzündungsreaktionen freigesetzte Cytokine (z.B. TNFα), Endotoxine oder ROS aktiviert werden. Das freigesetzte NF-κB kann dann in den Kern translozieren und die Expression pro-inflammatorischer Genprodukte induzieren. Dazu gehören u.a. TNFα, Cyclooxygenase 2 (COX-2) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Entzündungsreaktion aber auch das Tumor-Wachstum fördern [Ramos, 2008]. Das induzierbare Enzym COX-2 katalysiert die Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure und ist in vielen Tumorgeweben überexprimiert. Der daraus resultierende Überschuss an Prostaglandinen kann die Kanzerogenese durch proliferierende, antiapoptotische und angiogene Eigenschaften fördern [Gerhäuser, 2008; Ramos, 2008]. Die

induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist ebenfalls ein Enzym, welches eng mit Entzündungsreaktionen im Körper assoziiert ist [Gonzalez-Gallego et al., 2007].
Die anti-inflammatorische Wirkung der Polyphenole beruht wahrscheinlich auf einer Hemmung der NF-κB-Freisetzung durch Hemmung der IκK-Aktivität, was den Abbau des NF-κB-Inhibitors IκB verhindert [Shapiro et al., 2007].
Bei Versuchen an Nagern konnte durch Verabreichung von Polyphenolen (Resveratrol, EGCG, Grünteeextrakt, Quercetin-Glykoside) eine deutliche Verbesserung der (induzierten) Kolitis erzielt werden [Shapiro et al., 2007].

3.4.5. Adverse Effekte

Flavonoide und Polyphenole haben reaktive, funktionelle Gruppen, so dass nicht nur antioxidative und protektive, sondern auch adverse Effekte zu erwarten sind. Die relevanten Strukturmerkmale sind die freie Hydroxylgruppe an C3, die Doppelbindung an C2-C3 mit der Ketogruppe an C4 und auch die Catecholgruppe im B-Ring. Auf Grund ihrer Fähigkeit zum Redox-Cycling zeigen sie auch unerwünschte Eigenschaften, die in erster Linie auf ihre elektrophilen Metabolisierungsprodukte (Chinone, Methide) zurückzuführen sind.

3.4.5.1. Mutagenität und Genotoxizität

Ende der 70er Jahre untersuchten Brown et al. im Ames-Test über 70 verschiedene Flavonoide auf ihre mutagenen Eigenschaften. Wie von Czeczot bestätigt, zeigte vor allem Quercetin mutagene Eigenschaften, ebenso Rhamnetin und Kaempferol, während die Quercetin-Glycoside keine mutagenen Eigenschaften aufwiesen [Brown und Dietrich, 1979; Czeczot et al., 1990]. Durch Zusatz metabolisierender Systeme (S9-Mix) ließ sich das mutagene Potential der Flavonoide fast durchgängig steigern. Neben den oben genannten strukturellen Eigenschaften spielt für die Mutagenität von Flavonolen das Vorhandensein der Hydroxylgruppe an C7 eine große Rolle [Czeczot et al., 1990]. Es wurde gezeigt, dass nicht die Ausgangsstrukturen an sich für die Mutagenität verantwortlich sind, sondern die Chinon-/ Chinon-Methid-Strukturen [Rietjens et al., 2005].

3.4.5.2. Prooxidative Eigenschaften

Neben den antioxidativen Eigenschaften zeigen viele Polyphenole auch prooxidative Effekte, das heißt eine Bildung von ROS, was dem antioxidativen Charakter dieser Verbindungen eigentlich widerspricht, aber vermutlich auf denselben Mechanismen – Oxidation der 3',4'-Dihydroxystruktur zum *o*-Catechol – beruht. Durch diese Oxidation kann molekularer Sauerstoff zum Superoxidradikal-Anion oder dieses zu H_2O_2 reduziert werden. Eine Strukturvoraussetzung für eine Chinonbildung ist die Catecholgruppe, wie

sie z.B. bei Quercetin, Kaffeesäurederivaten und (Epi)Catechin vorliegt. Quercetin ist hinsichtlich seiner prooxidativen Eigenschaften gut untersucht, einen Überblick über mögliche Oxidationswege zeigt Abbildung 3.25:

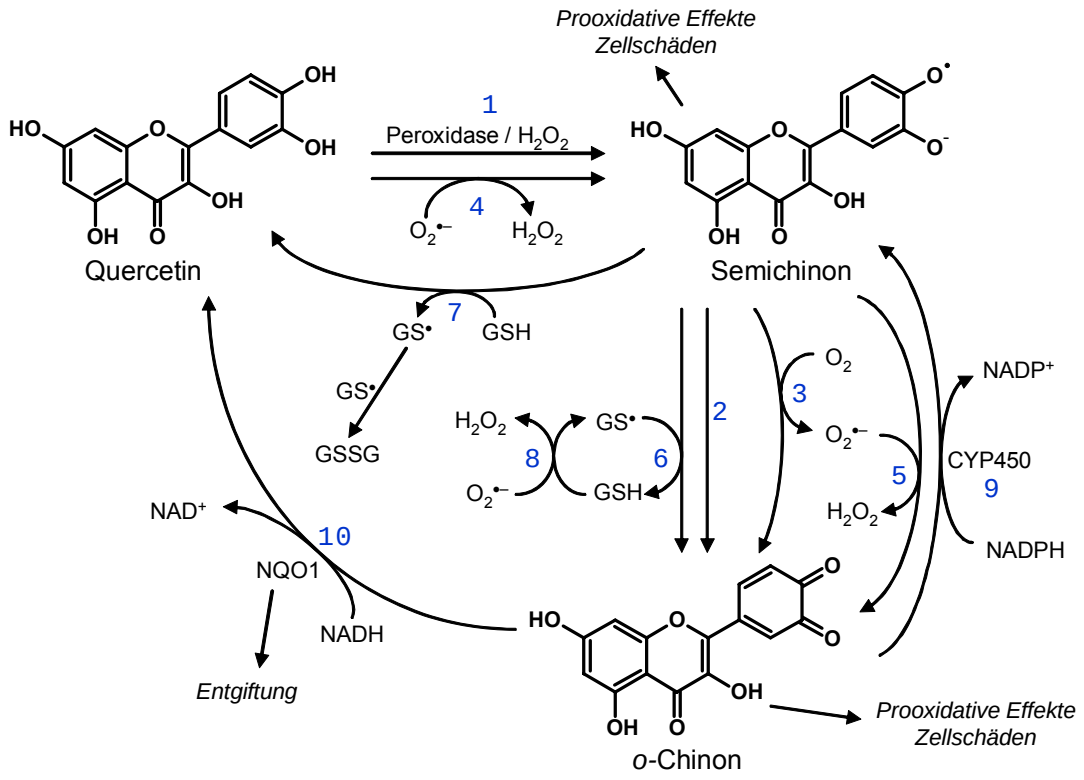


Abbildung 3.25: Mögliche Oxidationswege von Quercetin in Zellen; nach [Metodiewa et al., 1999] (ohne Beachtung der Stöchiometrie); Erklärung der Reaktionen im Text

Die Reaktion von Quercetin (Q) mit Peroxidasen (1) folgt nach dem allgemeinen Mechanismus:

$$2\,Q + H_2O_2 \rightarrow 2\,Q^{\bullet-} + 2\,H_2O$$

Die mesomere Struktur des gebildeten o-Semichinonradikals ($Q^{\bullet-}$) geht von der Catecholgruppe aus und verläuft über alle drei Ringe, was Voraussetzung für die Radikalstabilisierung ist. Es kann jedoch auch zur *o*-Chinonstruktur (Qq) disproportionieren (2):

$$2\,Q^{\bullet-} \rightarrow Qq + Q$$

Ist Sauerstoff zugegen, kann die Reaktion vom Semichinon zum Chinon auch über die Bildung des Superoxidradikal-Anions verlaufen (3):

$$Q^{\bullet-} + O_2 \rightarrow Qq + O_2^{\bullet-}$$

Superoxidradikal-Anionen können von Quercetin-Molekülen unter Bildung des Semichinonradikals abgefangen werden (4):

$$Q + O_2^{\bullet-} + 2\,H^+ \rightarrow Q^{\bullet-} + H_2O_2$$

Auch das Semichinon kann Superoxidradikal-Anionen abfangen (5):

$$Q^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2\,H^+ \rightarrow Qq + H_2O_2$$

Das endogene Antioxidans Glutathion kann ebenfalls an Redox-Reaktionen des Quercetins beteiligt sein. Glutathionyl-Radikale ($GS^{\bullet}$) können durch Semichinone reduziert werden (6):

$$Q^{\bullet-} + GS^{\bullet} \rightarrow Qq + GSH$$

Das Glutathionyl-Radikal kann z.B. bei der Ein-Elektronenübertragung mit dem Semichinonradikal gebildet werden (7):

$$Q^{\bullet-} + GSH \rightarrow Q + GS^{\bullet}$$

oder bei der Abfangreaktion des Superoxidradikal-Anions durch Glutathion (8):

$$GSH + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow GS^{\bullet} + H_2O_2$$

CYP450 kann durch Ein-Elektronenübertragung das Chinon zum entsprechenden Semichinon reduzieren (9). Die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) reduziert die chinoide Form durch Zwei-Elektronenübertragung zurück zur Ausgangsverbindung (10), so dass Quercetin wieder dem oben genannten Redox-Cycling zur Verfügung steht [Metodiewa et al., 1999]. Auch Epicatechin kann durch Tyrosinase und Peroxidasen zum *o*-Chinon oxidiert werden. Diese Oxidation wurde mit Apfel-Phenoloxidasen beobachtet, dabei ist das Zwischenprodukt bei physiologischem pH-Wert nicht stabil und weitere Reaktionen wie Dimerisierungen oder Polymerisierungen sind möglich [Moridani et al., 2001b].

Einflussfaktoren für diese (unerwünschte) prooxidative Wirkung der Polyphenole sind u.a. das verwendete Lösungsmittel, die Anwesenheit redoxaktiver Metall-Ionen und vermutlich der pH-Wert [Amorati et al., 2006; Lapidot et al., 2002]. Dabei ist festzustellen, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf *in vitro*-Experimenten beruhen; eine prooxidative Wirksamkeit der Polyphenole *in vivo* konnte bislang nicht gezeigt werden [Halliwell, 2008].

GSH-Adduktbildung

Neben der Bildung von ROS durch Redox-Cycling kann das als Zwischenprodukt entstandene Chinon weiter reagieren und über Methide Glutathion-Addukte bilden. Dabei bestimmen Deprotonierungsgrad und Substitutionsmuster die Adduktbildung, d.h. der Ort der Bindung ist pH-abhängig. Neutrale Chinone bilden v.a. am C-Ring Addukte mit Glutathion. Im neutralen pH-Bereich liegt das Chinon als Monoanion vor und bildet bevorzugt Addukte am A-Ring. B-Ring-Adduktbildung findet vor allem bei höherer Deprotonierung des Chinons statt. Diese Glutathion-Addukte wurden im *in vitro*-Zellsystem sowie *in vivo* als entsprechende Mercaptursäuren im Urin gefunden [Awad et al., 2002]. Für Catechine wurden nach Oxidation zum o-Chinon Mono-, Di- oder Tri-Glutathionkonjugate nachgewiesen. Die bevorzugte Position der Adduktbildung ist dabei C5', gefolgt von C6' und C2'. Auch Catechindimere können bis zu zwei

Glutathionmoleküle binden [Moridani et al., 2001b]. Die Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure, Chlorogensäure und Dihydrokaffeesäure bilden ebenfalls, enzymatisch katalysiert durch NADPH/Rattenleber-Mikrosomen, über entsprechende Chinonstrukturen GSH-Addukte, mit einer Regioselektivität von C5 > C6 ≥ C2. [Moridani et al., 2001a].
Durch diese Adduktbildung wird der zelluläre Glutathion-Spiegel verringert; die Zellen sind dadurch anfälliger für oxidative Schäden, da ein wichtiger antioxidativer Abwehrmechanismus wegfällt. Die beobachtete GSH-Depletion kann letztendlich bis zum Tod der Zelle führen [Moridani et al., 2001a].

3.5. Apfelsaft und seine Inhaltsstoffe

Die Hauptaufnahmequellen für Polyphenole in der menschlichen Nahrung sind Kaffee, Tee, Rotwein sowie Obst und Gemüse bzw. die daraus gewonnene Säfte, wobei Apfelsaft, als in Deutschland am häufigsten konsumiertem Fruchtsaft eine besondere Rolle zukommt [D'Archivio et al., 2007; Scalbert und Williamson, 2000; VdF, 2009]. Tabelle 3.4 zeigt einige Daten zu Verwendung und Verbrauch von Äpfeln und Apfelsaft in Deutschland.

Tabelle 3.4: Produktion und Verbrauch von Äpfeln bzw. Apfelsaft in Deutschland [BMELV, 2008; VdF, 2009]

Jahr	Erntemenge Äpfel	Verwendung [%]		Produktion Apfelsaft	Pro-Kopf-Verbrauch
	[t]	Tafelobst	Industrie	[t]	[L]
2005				985.456	12,4
2006	947.611	67	32	978.374	12,0
2007	1.070.036	63	36	897.895	11,4
2008	1.046.995	73	26	776.940	9,2

Herstellung von Apfelsaft

Die Herstellung von Apfelsaft zeigt Abbildung 3.26. Zur Vorbereitung der Früchte wird das Obst gewaschen und anschließend sortiert, um faule und unreife Früchte zu entfernen. Nach der Entstielung wird das Obst mechanisch durch Obstmühlen zerkleinert. Im darauf folgenden Verfahren der Entsaftung werden diskontinuierliche und kontinuierliche Pressen eingesetzt. Die Saftausbeute liegt bei Äpfeln bei 70 %. Der Rückstand der Saftgewinnung, der Trester, dient zur Pektingewinnung. Die anschließende Saftbehandlung umfasst eine Vorklärung, die die Abtrennung des Trubs erleichtert und Nachtrübungen verhindert. Danach erfolgt ein enzymatischer Abbau von Pektinen, die Entfernung von Polyphenolen durch Zusatz von Gelatine oder Polyvinylpyrrolidon und eine Entfernung von Proteinen durch Adsorption an Bentonit. Anschließend wird der Saft mittels Filtration durch poröse Schichten wie Zellulose bzw. Kieselgur oder durch eine Zentrifugation geklärt.

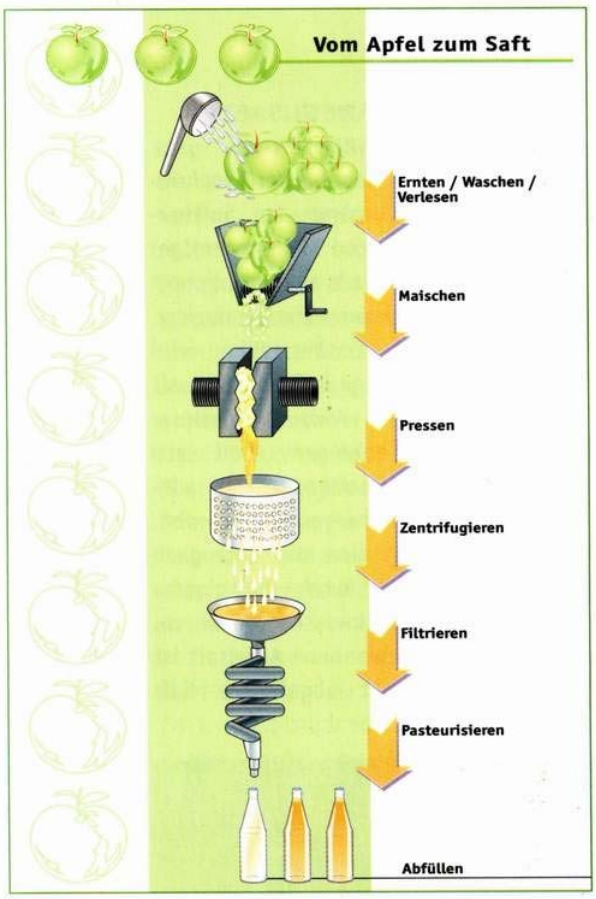


Abbildung 3.26: Vom Apfel zum Saft [VdF, 2009]

Bei naturtrüben Apfelsäften erfolgt eine Trubstabilisierung, bei der die Trubstoffe durch kurzzeitige Behandlung mit Polygalacturonsäure-Präparaten partiell abgebaut und damit stabilisiert werden können.

Um eine enzymatische Bräunung durch die Oxidierung noch vorhandener Polyphenole zu verhindern, wird Vitamin C zugesetzt. Zur Abtötung von Mikroorganismen und Inaktivierung von Enzymen wird der Saft z.B. durch eine Pasteurisation haltbar gemacht. Eine zweite Pasteurisation wird nach der Auslagerung bzw. Abfüllung des Fruchtsaftes, z.B. durch Erhitzen der verschlossenen Flaschen, durchgeführt [Belitz et al., 2001].

3.5.1. Polyphenolprofil von Apfelsaft

Im Allgemeinen enthalten Lebensmittel eine komplexe Mischung von Polyphenolen. Äpfel und Apfelsaft gehören zu den wenigen Lebensmitteln, deren Polyphenol-Profil

weitestgehend bekannt ist [D'Archivio et al., 2007]. Das Polyphenol-Profil von Äpfeln ist durch eine große strukturelle Diversität gekennzeichnet. Es finden sich Flavanole (v.a. (-)-Epicatechin und Procyanidine), Hydroxyzimtsäuren (Kaffeoyl- und *p*-Coumaroylchinasäuren), die für Äpfel spezifischen Dihydrochalcone (Phloretin-2-glucosid und –xyloglucosid) sowie Flavonole und Anthocyanidine in der Schale (siehe Tabelle 3.5). Einflussfaktoren, die den Gehalt und die Zusammensetzung an Polyphenolen bestimmen sind die Apfelsorte, Reifegrad, Jahreszeit, Exposition mit Sonnenlicht sowie Lagerungs- und Prozessbedingungen [Guyot et al., 2003; Kahle et al., 2005a].

Tabelle 3.5: Polyphenolgehalt [mg/L] verschiedener Apfelsäfte, nach [Kahle et al., 2005a]. n.q.: nicht quantifizierbar (< Bestimmungsgrenze)

	Säfte aus		Kommerzielle Säfte	
	Tafeläpfeln	Mostäpfeln	klar	trüb
Substanzgruppe	(n=4)	(n=7)	(n=3)	(n=21)
Flavan-3-ole	50 - 95	70 - 393	14 - 32	46 - 120
Dihydrochalcone	10 - 35	34 - 171	9 - 54	28 - 87
Hydroxyzimtsäuren	61 - 68	134 - 593	69 - 122	94 - 259
Flavonole	n.q. - 4	n.q. - 27	n.q. - 7	3 - 14
Gesamt	154 - 178	261 - 970	110 - 173	182 - 459

Sortenauswahl

Die Wahl der Apfelsorte ist von entscheidender Bedeutung, stellt sie doch den größten Variationsfaktor für den Polyphenol-Gehalt des späteren Saftes dar. So wurde in Saft aus Tafeläpfeln mit 154-178 mg/L wesentlich niedrigere Gehalte an Polyphenole gemessen als in Säften aus „alten“ Mostapfelsorten (261-970 mg/L) [Kahle et al., 2005a].

Da es sich bei den zu untersuchenden phenolischen Substanzen um Sekundärprodukte des Pflanzenmetabolismus handelt, wird die Bildung von Polyphenolen durch verschiedene Faktoren wie Sonnenlicht [Manach et al., 2004], saisonale Schwankungen während verschiedener Jahrgänge [van der Sluis et al., 2001] und Reifegrad der Früchte [Guyot et al., 2003] beeinflusst. Zwischen den Jahrgängen, auch schon bei verschiedenen Standorten der Apfelbäume und innerhalb eines Apfelbaumes sind daher bedeutende Unterschiede bezüglich des Polyphenolgehaltes und -profils der Früchte zu erwarten.

Phenolverteilung im Apfel

Ein weiterer Faktor für Verluste während der Verarbeitung ist die ungleiche Verteilung der Polyphenole im Apfel: So findet sich der Hauptteil der Polyphenole im Parenchym (30-67 %), gefolgt von Schale (17-48 %) und Kerngehäuse (11-28 %). Während die

Flavonolglykoside und Anthocyane fast ausschließlich in der Schale enthalten sind, kommen die Catechine und deren Oligomere zwar hauptsächlich in der Schale vor, zu geringeren Anteilen aber auch in Fruchtfleisch und Kerngehäuse, einschließlich der Samen. Hydroxyzimtsäuren und Phloretinglykoside befinden sich bevorzugt im Kerngehäuse, jedoch auch im Fruchtfleisch [Thielen, 2006].

Technologische Aspekte

Diese Verteilung hat auch Auswirkungen auf den Polyphenolgehalt des Apfelsafts, da durch die Pressung der überwiegende phenolische Anteil der festen Apfelbestandteile (Schale und Gehäuse), vor allem Proanthocyanidine und Flavonolglykoside, im Trester verbleiben und nicht mit in den Saft überführt werden [Schieber et al., 2001]. Dies führt zu Einbußen von ca. 50 % der Polyphenole [Rechner et al., 1999]. Eine weitere Ursache für die ungleiche Überführung der einzelnen Polyphenole ist ihre Wasserlöslichkeit: Chlorogensäure ist am besten wasserlöslich und hat daher den größten Anteil im Saft [Van Der Sluis et al., 2002]. Mittels so genannter Tresterverflüssigung durch Enzymbehandlung des Pressrückstandes (Trester) mit Pektinasen und Zellulasen oder durch alkoholische Extraktion des Tresters lassen sich gebundene Polyphenole herauslösen und in den Tresterextraktionssaft überführen [Van Der Sluis et al., 2002; Will et al., 2000]. Dieser technologische Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchung von Tresterextraktionssäften berücksichtigt.

Auch während der Obstverarbeitung kommt es zu Verlusten von phenolischen Verbindungen, die zum Teil über 50 % betragen können [Rechner, 2002]. Ursachen für diese Abnahme liegen zum einen in der Oxidation der phenolischen Verbindungen, zum anderen in dem unzureichenden Zellaufschluss des Obstes. Die stärkste Oxidation geschieht in der Maische vor und während des Pressens und umfasst sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Reaktionen. Die enzymatischen Reaktionen werden durch Polyphenol-Oxidasen katalysiert. Startreaktion ist immer die enzymatische Oxidation des *o*-Hydrochinons zum *o*-Chinon. Die Folge-Reaktionen, die zur Bildung der braunen Melanoidine führen, sind nicht enzymatisch [Lu et al., 2006]. Trotz verschiedener Schutzmaßnahmen, z.B. Ascorbinsäurezugabe, ist deren Ausmaß meist nicht unerheblich. Die aktiven Enzyme weisen eine besondere Affinität zu Hydroxyzimtsäuren (vor allem Kaffeesäureverbindungen) auf, während Catechine und Procyanidine schlechter umgesetzt werden [Cheynier et al., 1988; Guyot et al., 2003]. Catechine verschwinden durch Oxidation und Umsetzung mit oxidierten Hydroxyzimtsäuren fast völlig. Der Gehalt an Procyanidinen wird nimmt ebenfalls stark ab (Faktor 4-9), ebenso die Konzentration an Hydroxyzimtsäuren (Faktor 1,5-4,5) und Dihydrochalconen (Faktor 1,4-2,3) [Guyot et al., 2003].

3.5.2. Apfelsaft-Trub

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal von Apfelsäften ist die Einteilung in klare und trübe Säfte. Während der Trub die den klaren Säften durch Filtration, Zentrifugation oder Klärung entfernt wird, erfolgt den trüben Säften meistens eine Trubstabilisierung, die die enzymatische Bräunung verhindert und das Absetzen am Flaschenboden verhindert [Belitz et al., 2001].

Barth et al. haben die Zusammensetzung von Apfelsaft-Trub analysiert und fanden heraus, dass der verwendete Trub zu 48,6 % aus Lipiden besteht [Barth et al., 2007]. Als weitere Bestandteile wurden Proteine (ca. 24 %), Zellwand-Oligosaccharide (7,4 %) und 18% unidentifizierte Polyphenole genannt. Andere Quellen sprechen den oligomeren Procyanidinen einen Anteil von >60 % des Trubs zu [Gerhäuser, 2008]. Dabei sind die in Trub enthaltenen Procyanidine wahrscheinlich höhere Oligomere, wie ein Vergleich des Polymerisierungsgrades von klarem und trübem Apfelsaft zeigt [Hümmer et al., 2008].

3.6. Polyphenolische Extrakte aus Äpfeln, fermentierte Extrakte und fermentierter Trub

Zur Untersuchung der protektiven Wirkung von Apfelsaft *in vitro* wurden Polyphenol-angereicherte Extrakte verwendet, die hier näher beschrieben werden sollen. Die Herstellung und Analytik der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apfelsaftextrakte erfolgte in der Forschungsanstalt Geisenheim, Abteilung Weinanalytik & Getränkeforschung (Arbeitsgruppe Prof. Dietrich). Die Quantifizierung der Polyphenole wurde mittels HPLC-DAD durchgeführt, [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung pers. Mitteilung], die Bestimmung der oligomeren Zuckerbausteine mittels HPAEC (high performance anion exchange chromatography) nach Säurehydrolyse [Saeman et al., 1945] und der Procyanidingehalt photometrisch nach Depolymerisierung mittels Säure/Butanol-Assay [Hümmer et al., 2008]..

3.6.1. Herstellung der Apfelsaftextrakte

Die Gewinnung der Apfelsaftextrakte erfolgt mittels Festphasenextraktion der phenolischen Bestandteile des Apfelsaftes an Adsorberharz (z.B. XAD16 oder SP70). Anschließend wird die Säule zur Entfernung primärer Apfelsaftinhaltsstoffe (org. Säuren, Zucker, Mineralien) mit destilliertem Wasser gespült. Die Elution der phenolischen

Substanzen erfolgt mittels Ethanol. Der alkoholische Extrakt wird eingeengt, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Ausbeute liegt ungefähr bei 1 g Extrakt pro Liter Saft [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung].

3.6.2. Zusammensetzung der Apfelsaftextrakte

Die Hauptkomponenten der Apfelsaftextrakte (AEs) sind Polyphenole (23 – 49 %), Oligo- und Polysaccharide (8 – 38 %) und oligomere Procyanidine (24 – 57 %) [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung]. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Extrakte ist in Tabelle 3.6 angegeben. Um das Polyphenolprofil in seiner Zusammensetzung zu variieren wurden für die Extrakte, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten, verschiedene Apfelsorten und Technologien verwendet:

AE01: Ausgangsmaterial sind Äpfel der Sorte Boskoop der Ernte 2001.

AE02: Apfelsaftextrakt AE02 entstammt Äpfeln verschiedener Sorten der Ernte 2002, darunter ein hoher Anteil Mostapfelsorten (25 % Topaz, 17,5 % Bohnapfel, 22,5 % Winterrambur und 15 % Bittenfelder, 20 % gemischtes Tafelobst).

Trestersaft-Extrakt 03 (AE03B): Dieser Extrakt AE03B unterscheidet sich von den anderen Apfelsaftextrakten durch seine Herstellungsweise. Der Apfelsaft wurde aus verschiedenen Tafelapfelsorten (Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold) der Ernte 2003 hergestellt. Der normale Apfelsaft (A-Saft) wurde für die Herstellung jedoch nicht berücksichtigt. Stattdessen wurde der gepresste Rückstand (Trester) für zwei Stunden mit Zellulase und Pektinasen behandelt, um die im Trester verbliebenen Polyphenole herauszulösen. Der daraus resultierende „Tresterextraktionssaft“ (B-Saft) wurde für die Extraktgewinnung eingesetzt.

AE04: Auf Grund der schlechten Ernte im Jahr 2004 entstammt der AE04 einer Mischung von Apfelsäften der Ernte 2002 und 2003. Dabei wurden 250 L des Apfelsaftes von 2002 (identisch mit dem eingesetzten Apfelsaft für AE02), 50 L Tresterextraktionssaft (s. AE03B) und je 200 L der naturtrüben Mostapfelsäfte aus Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambur vermischt.

AE05: Dieser Extrakt besteht aus einer Mischung sortenreiner Apfelsäfte der Mostapfelsorten Bittenfelder (10 %), Bohnapfel (23 %), Börtlinger (18 %), Seeestermühler (25 %) sowie 24 % Topaz (Tafelapfel) der Ernte 2005.

AE06: AE06 entstammt den Mostapfelsorten Bohnapfel (10 %), Maunzen (45 %), Winterrambur (10 %) der Ernte 2006. Zusätzlich wurde noch 35 % gemischtes Tafelobst verwendet.

AE06B: In Anlehnung an den Trestersaft-Extrakt AE03B wurde auch aus der Ernte 2006 ein solcher Extrakt hergestellt. Dazu wurden ausschließlich Mostäpfel der Sorte Bittenfelder eingesetzt, um einen möglichst hohen Anteil an Polyphenolen zu erhalten.

Nach der Entsaftung wurde der Trester mit Wasser aufgeschlämmt und für 2 h bei 54°C mit Pektinase und Cellulase gerührt. Der dekantierte Extraktionssaft wurde zusätzlich mit Pektinase behandelt und zur Extraktgewinnung verwendet.

AE07: Zur Gewinnung des AE07 wurden folgende Apfelsorten ausgewählt: 48 % Bittenfelder, 26 % Brettacher, 11 % Braeburn, 8 % Jonagold sowie 7 % gemischtes Mostobst.

Die Quantifizierung der Polyphenole erfolgte mittels HPLC-DAD [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung pers. Mitteilung], die oligomeren Zucker wurden mittels HPAEC (high performance anion exchange chromatography) nach Säurehydrolyse [Saeman et al., 1945] quantifiziert und der Procyanidingehalt photometrisch nach Depolymerisierung mittels Säure/Butanol-Assay [Hümmer et al., 2008]. Herstellung und Analytik der Apfelsaftextrakte wurden in der Forschungsanstalt Geisenheim, Abteilung Weinanalytik & Getränkeforschung durchgeführt.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der verwendeten phenolischen Apfelsaftextrakte [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung]; n.d.: < Nachweisgrenze

		AE01	AE02	AE03B	AE04	AE05	AE06	AE06B	AE07
Procyanidin B1	mg/g	2,9	7,0	6,2	n.d.	2,4	2,1	2,4	2,5
(+)-Catechin	mg/g	n.d.	n.d.	2,7	n.d.	5,9	4,2	4,2	4,8
Procyanidin B2	mg/g	16,0	15,1	18,4	12,1	n.d.	28,6	17,1	20,6
(-)-Epicatechin	mg/g	11,8	19,2	17,7	12,5	5,9	30,4	14,3	12,8
Procyanidin C1	mg/g	4,7	n.d.	3,4	2,0	2,5	16,0	13,5	3,9
Σ Flavan-3-ole	mg/g	**35,4**	**41,3**	**48,4**	**26,6**	**16,7**	**81,3**	**51,5**	**44,5**
Phloretin-2-xyloglucosid	mg/g	42,7	66,2	31,7	68,9	28,2	29,1	9,6	54,2
Phloridzin	mg/g	34,7	27,9	78,9	48,0	28,7	9,2	24,4	23,6
Σ Dihydrochalcone	mg/g	**77,4**	**94,1**	**110,6**	**116,9**	**56,9**	**38,4**	**34,0**	**77,7**
Chlorogensäure	mg/g	171,8	181,5	19,2	183,2	183,9	140,3	76,6	124,9
4-Caffeoylchinasäure	mg/g	10,2	n.d.	1,2	9,2	20,9	4,1	5,0	16,3
Coumaroylglucose	mg/g	0,8	n.d.	n.d.	11,9	2,9	0,1	0,2	1,2
Kaffeesäure	mg/g	5,5	4,8	4,0	7,5	3,9	0,1	0,7	0,0
3-Coumaroylchinasäure	mg/g	16,0	9,5	3,0	9,4	2,0	3,1	0,7	5,5
4-Coumaroylchinasäure	mg/g	72,4	77,3	5,0	66,0	84,9	37,3	52,1	98,2
5-Coumaroylchinasäure	mg/g	7,0	10,4	3,8	39,8	n.d.	2,0	0,2	0,0
p-Cumarsäure	mg/g	1,8	n.d.	4,2	2,6	1,3	0,2	0,6	1,0
Σ phenolische Säuren	mg/g	**285,5**	**283,5**	**40,4**	**329,6**	**299,8**	**187,3**	**136,0**	**247,1**
Quercetin-3-rutinosid	mg/g	1,8	2,6	49,1	4,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-galactosid	mg/g	0,9	0,8	8,1	1,8	1,5	1,0	2,8	1,1
Quercetin-3-glucosid	mg/g	1,4	1,4	12,3	1,5	0,7	0,5	0,6	0,4
Quercetin-3-xylosid	mg/g	0,5	n.d.	18,1	n.d.	n.d.	0,3	1,4	0,6
Quercetin-3-arabinosid	mg/g	n.n.	n.d.	3,5	n.d.	n.d.	0,2	0,0	0,9
Quercetin-3-rhamnosid	mg/g	3,2	4,1	25,1	4,3	1,3	1,4	0,9	1,5
Σ Flavonole	mg/g	**7,8**	**8,9**	**116,2**	**12,1**	**3,5**	**3,4**	**5,7**	**4,4**
Σ Polyphenole	mg/g	**406,1**	**427,8**	**315,6**	**485,2**	**376,9**	**310,3**	**227,3**	**373,7**
Fucose	%	0,3	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,6	0,0
Rhamnose	%	0,3	0,3	1,8	0,5	0,6	0,3	2,2	0,5
Arabinose	%	0,8	1,0	5,0	0,3	1,8	0,7	17,9	0,6
Galactose	%	0,8	0,7	2,5	0,3	0,9	0,8	2,9	0,4
Glucose	%	12,7	11,2	11,2	5,6	7,5	6,1	9,9	7,0
Xylose	%	2,0	2,7	1,3	0,6	1,0	0,4	2,9	1,1
Galacturonsäure	%	0,1	0,0	0,6	0,2	0,2	0,4	1,6	0,1
Glucuronsäure	%	0,8	0,2	0,2	0,1	1,0	0,1	0,2	0,6
Σ Oligosaccharide	%	**17,7**	**16,3**	**22,8**	**7,5**	**13,0**	**8,7**	**38,2**	**10,3**
Σ Procyanidine	%	25	36	46	52	24	57	35	48,3
Gesamt	%	**83,3**	**95,1**	**100,3**	**108,1**	**74,7**	**96,7**	**96,0**	**96,0**

3.6.3. Herstellung / Zusammensetzung der Apfelschalenextrakte

Neben den Extrakten aus Apfelsaft wurden auch zwei Schalenextrakte auf ihre antioxidative Wirksamkeit untersucht. Dazu wurden Apfelschalen mit heißem Wasser extrahiert und dann mittels Festphasenextraktion die Polyphenole gewonnen. Die Elution erfolgte mit Ethanol und anschließender Lyophilisierung. **PE:** Dieser Apfelschalenextrakt wurde aus einer Mischung von Schalen verschiedener Tafeläpfel gewonnen. **GS:** Als Ausgangsmaterial dienten Apfelschalen der Sorte Granny Smith.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Apfelschalenextrakte [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung]

		PE	GS
Procyanidin B1	mg/g	1,3	2,6
(+)-Catechin	mg/g	2,1	2,6
Procyanidin B2	mg/g	19,2	17,3
(-)-Epicatechin	mg/g	12,3	9,7
Procyanidin C1	mg/g	6,8	15,3
Σ Flavan-3-ole	mg/g	**41,6**	**47,5**
Phloretin-2-xyloglucosid	mg/g	18,2	15,8
Phloridzin	mg/g	24,8	19,6
Σ Dihydrochalcone	mg/g	**43,0**	**35,5**
5-Caffeoylchinasäure	mg/g	20,0	10,2
4-Caffeoylchinasäure	mg/g	0,7	0,4
Coumaroylglucose	mg/g	n.d.	n.d.
Kaffeesäure	mg/g	0,3	0,4
3-Coumaroylchinasäure	mg/g	1,2	1,9
4-Coumaroylchinasäure	mg/g	5,3	3,3
5-Coumaroylchinasäure	mg/g	n.d.	n.d.
p-Cumarsäure	mg/g	0,2	0,4
Σ phenolische Säuren	mg/g	**27,8**	**16,6**
Quercetin-3-rutinosid	mg/g	n.d.	n.d.
Quercetin-3-galactosid	mg/g	36,8	71,7
Quercetin-3-glucosid	mg/g	7,1	23,0
Quercetin-3-xylosid	mg/g	7,4	14,7
Quercetin-3-arabinosid	mg/g	18,0	26,5
Quercetin-3-rhamnosid	mg/g	26,5	27,4
Σ Flavonole	mg/g	**95,7**	**163,3**
Σ Polyphenole	mg/g	**208,1**	**262,8**
Σ Oligosaccharide	%	**24,5**	**24,0**
Σ Procyanidine	%	**43,0**	**44,0**
Gesamt	%	**88,3**	**94,3**

3.6.4. Herstellung der untersuchten *in vitro*-Fermentate aus Apfelsaftextrakt

In vitro-Systeme werden häufig benutzt, um den Metabolismus der Mikroflora des Dickdarms zu simulieren, da *in vivo*-Experimente an Menschen und Tieren oft teuer und schwer durchzuführen sind [Minekus et al., 1999]. Außerdem ist es bei *in vivo*-Studien schwierig Metabolite, die während der Fermentation entstehen, zu isolieren, da sie oft direkt resorbiert werden.

Die Fermentation wurde unter anaeroben Bedingungen (80% N_2, 10% CO_2, 10% H_2) bei 37°C [Barry et al., 1995] an der Friedrich Schiller-Universität Jena von der AG Pool-Zobel durchgeführt. Als Bakterienquelle dienten die Fäzes von drei verschiedenen Spendern, die in einem Phosphatpuffer homogenisiert werden. Diese Impflösung wurde mit einer Suspension der Apfelsaftextrakte vermischt (10 mg AE/mL), und für 6 h bzw. 24 h unter obenstehenden Bedingungen im Schüttelwasserbad inkubiert. Zusätzlich wurde bei allen Zeiten eine Fermentationskontrolle (Fermentation ohne AE-Zugabe) mitgeführt. Nach 6 bzw. 24h wurde die Fermentation abgestoppt und die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Aliquots dieses Fermentationsüberstandes wurden auch an die AG Schreier (Universität Würzburg) zur Analytik der verbliebenen Extrakt-Polyphenole geschickt.

3.6.5. Herstellung der untersuchten *in vitro*-Fermentate aus Apfelsaft-Trub

An der Forschungsanstalt Geisenheim wurde mittels Ultrafiltration (300 kDa) die Trubphase aus dem Apfelsaft AS07 isoliert und mit dem Fermentationsmodell der Friedrich Schiller-Universität Jena anaerob fermentiert. Die Konzentration des Trubs betrug 10 mg/mL, die Fermentationsdauer 24h bei 37°C anaerob im Schüttelwasserbad. Eine Fermentationskontrolle (Fermentation ohne Trub) wurde mitgeführt. Nach 24h wurde die Fermentation abgestoppt und die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Aliquots dieser Fermentationsüberstandes gingen auch an die AG Richling (TU Kaiserslautern) zur Polyphenol-Analytik.

3.7. Testmethoden

3.7.1. Verwendete Zelllinien

Die Zelllinie Caco-2

Die Zelllinie Caco-2 wurde 1974 aus dem primären Kolontumor (Adenokarzinom) eines 72-jährigen kaukasoiden Mannes isoliert. Caco-2 Zellen wachsen adhärent, und bilden im Laufe ihrer Kultivierung ein flächendeckendes Monolayer aus [DSMZ, 2006]. Charakteristisch für Caco-2 Zellen ist ihre spontane Differenzierung, die nach 2-3 Wochen zur Bildung polarisierter Zellen mit intakten tight junctions sowie der Ausbildung von Mikrovilli an der apikalen Membran führt. Differenzierte Zellen exprimieren an ihrem Bürstensaum verschiedene Hydrolasen, ähnlich normalen intestinalen Enterozyten (u.a. Sucrase-Isomaltase, Laktase, Aminopeptidase N, Dipeptylpeptidase IV). Diese Expression ist auch vergleichbar mit der in fötalen Kolonzellen, ausgereifte Kolonzellen exprimieren diese Enzyme nicht. Des Weiteren haben Caco-2 Zellen verschiedene weitere, in intestinalen Zellen lokalisierte Proteine, wie die Hexose-Transporter SGLT und GLUT. Die Expression verschiedener Fremdstoff-metabolisierender Enzyme (Cytochrom P450, UDP-Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen, Glutathion-S-transferasen) erlaubt weiterhin die Verwendung zur pharmakokinetischen Erforschung von Wirkstoffen [Sambruy et al., 2001]. Eine Besonderheit der Zelllinie Caco-2 ist die fehlende Aktivität des Enzyms NQO1 (NAD(P)H-abhängige Chinon-Oxidoreduktase 1), die sie (im Vergleich zu anderen Zellen, z.B. HT-29) deutlich empfindlicher gegen Menadion-induzierten oxidativen Stress machen [Karczewski et al., 1999]. Die meisten anderen Parameter differenzierter Caco-2 Zellen wie elektrochemische Eigenschaften, Ionenleitung und Permeabilität ähneln denen von Kolonzellen. Auch die Expression von Transportproteinen für Fremdstoffe (ATP-binding cassette transporter, ABC und solute carriers, SLC) gleicht eher der von normalen Kolonzellen [Calcagno et al., 2006]. Diese Eigenschaften machen Caco-2 Zellen zu einem der am häufigsten verwendeten Modelle für Studien der intestinalen Absorption und Toxikokinetik [Sambruy et al., 2001].

Die Zelllinie HT-29

Die Zelllinie HT-29 wurde im Jahr 1964 aus dem primären Kolontumor (Adenokarzinom) einer 44 Jahre alten kaukasoiden Frau isoliert und etabliert [DSMZ, 2006]. Sie ist ebenfalls adhärent wachsend mit einer Verdopplungszeit von 40-60 h und zeichnet sich im undifferenzierten Zustand durch einen hohen Glucosekonsum aus. Nach ihrer Konfluenz wachsen sie als Multilayer nicht polarisierter, undifferenzierter Zellen. Durch Austausch der Glucose durch Galactose, Inosin oder Uridin kann eine Differenzierung der Zellen

innerhalb von 3-4 Wochen mit Ausbildung von tight junctions und einem apikalen Bürstensaum vorgenommen werden. Differenzierte HT-29 Zellen exprimieren ähnliche Enzyme wie intestinale Enterozyten (Hydrolasen, Villin) aber mit deutlich verminderter Aktivität [Zweibaum, 1993].
Haupteinsatzgebiete dieser Zelllinie sind Untersuchungen zu Glucosemetabolismus und zu Hormonrezeptoren, z.B. EGF, Neurotensin oder Prostaglandine. Durch die Möglichkeit zur Differenzierung eignen sich HT-29 Zellen ebenfalls zur Aufklärung molekularer Mechanismen zu deren Modulation [Rousset, 1986].

Die Ausstattung der beiden Zelllinien mit antioxidativen Enzymen unterscheidet sich nur leicht voneinander. Die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD, CAT und GPx in den beiden Zelllinien HT-29 und Caco-2 gegeben. Dabei weisen HT-29 im Vergleich zu Caco-2 eine höhere GPx-Aktivität auf, während die SOD und CAT-Aktivität in Caco-2 Zellen höher ist [Cullmann, 2009; Digles, 2008]. Ein Vergleich der absoluten Werte mit Literaturdaten kann nicht vorgenommen werden, da diese stark von der verwendeten Methode abhängig sind; so finden sich für die CAT-Aktivität in Caco-2 Zellen Werte zwischen 0,5 und 15 U/mg Protein [Kameoka et al., 1999; Wijeratne et al., 2005].

3.7.2. Bestimmung der Viabilität (Trypanblau-Ausschlusstest)

Zur Bestimmung der Viabilität wird der Trypanblau-Ausschlusstest verwendet, welcher die Unterscheidung zwischen lebenden von toten Zellen ermöglicht. Dazu wurden in einem Mikroreaktionsgefäß ein Aliquot Zellsuspension mit einem Aliquot Trypanblau gemischt und in die Neubauer-Zählkammer gebracht. Aufgrund der permeablen Membran von geschädigten Zellen lagert sich der Farbstoff in diese ein und sie erscheinen blau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop hell leuchtend, da sie den Farbstoff nicht aufnehmen. Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der intakten, viablen Zellen zur Gesamtzellzahl und wird in % angegeben [Lindl, 2002]:

3.7.3. Induktion von (moderatem) oxidativem Stress

Obwohl die Zellen bei *in vitro*-Versuchen einem wesentlich höheren O_2-Partialdruck ausgesetzt sind als im Körper (ca. 150 mm Hg gegenüber 1-10 mm Hg [Halliwell, 2003]), ist das Ausmaß oxidativer Basisschäden dennoch so gering, dass verringernde Effekte durch Antioxidanzien nur sehr schwer zu erfassen sind. Daher werden die Zellen zur Untersuchung präventiver und antioxidativer Effekte mit zusätzlichen ROS exponiert, um künstlich oxidativen Stress zu erzeugen. Dies geschieht durch Inkubation mit Reagenzien, die entweder selbst ROS darstellen oder in einer Reaktion ROS freisetzen. Dabei soll das

Ausmaß an oxidativem Stress so gewählt werden, dass es in einem physiologisch relevanten Bereich liegt. So wurden in Leukozyten von Hämodialysepatienten oxidative DNA-Schäden von 6 – 10 % TI (tail internsity) beobachtet [Müller et al., 2004; Spormann, 2008].

Um eine direkte Interaktion zwischen Testsubstanz und Oxidans ausschließen zu können, erfolgt die Inkubation in einem Zweistufenprotokoll, bei dem zuerst die Testsubstanz und danach, getrennt durch einen Waschschritt, das Oxidans inkubiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Oxidantien verwendet, die im Folgenden vorgestellt werden:

3.7.3.1. Menadion

Bei Menadion (Md, 2-Methyl-1,4-naphthochinon, Vitamin K_3) handelt es sich um ein Analogon der Vitamine K_1 und K_2, dem die isoprenoide Seitenkette an Position 3 fehlt. Obwohl es so in der Natur nicht vorkommt, kann es jedoch nach Aufnahme von Vitamin K als Metabolit entstehen [Thijssen et al., 2006]. Die Aufnahme von Vitamin K erfolgt zu >90 % als Vitamin K_1, dessen wichtigste Quellen grüne Gemüse und Kohl darstellen. Vitamin K_2 entsteht in fermentierten Lebensmitteln und kann auch durch humane Darmbakterien synthetisiert werden [Belitz et al., 2001; Thijssen et al., 2006].

Wie alle *o*- und *p*-Chinone ist Md in der Lage, durch Redox-Cycling ROS zu bilden (Abbildung 3.27). Dies geschieht durch Reduktion von O_2 zum Superoxid-Radikal-Anion $O_2^{\bullet-}$. Dabei wird das Md in einer Ein-Elektronen-Oxidation vom Hydrochinon zum Semichinon bzw. vom Semichinon zum Chinon oxidiert. Diese Reaktion wird durch Peroxidasen katalysiert, während die Rückreaktion durch Reduktasen (u.a. P450-Reduktase, NO-Synthase) vermittelt wird [Garner et al., 1999; Thor et al., 1982]. Als Entgiftungsreaktion fungiert in Zellen eine Zwei-Elektronen-Reduktion vom Chinon zum Md, welche durch NQO1 katalysiert wird [Eisenbrand und Metzler, 2005].

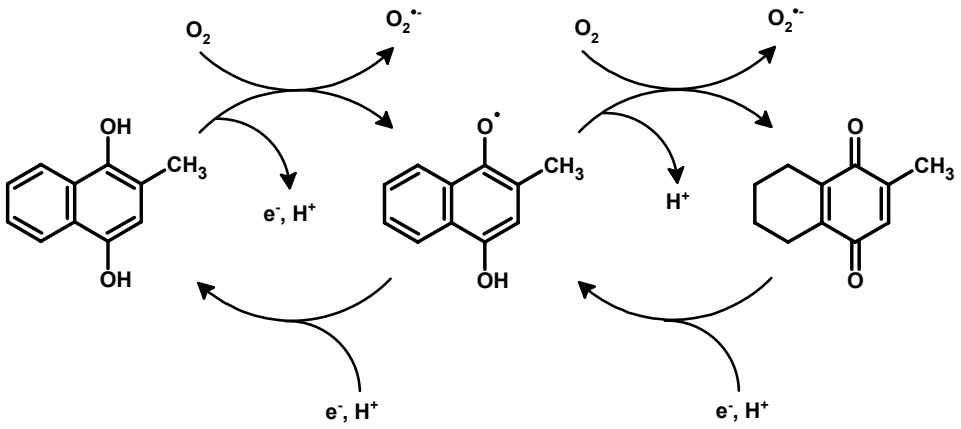


Abbildung 3.27: Redox-Cycling von Menadion, nach [Eisenbrand und Metzler, 2005; Klotz et al., 2002]

Aus dem, während des Redox-Cycling mit O_2 entstehenden, $O_2^{\bullet-}$ kann durch Dismutation (enzymatisch durch SOD oder nichtenzymatisch) H_2O_2 entstehen, welches durch Spuren von Metall-Ionen in das hochreaktive Hydroxylradikal $HO^{\bullet}$ umgewandelt werden kann [Bolton et al., 2000].

Chinone wie Md sind ebenfalls Michael-Akzeptoren, daher können sie kovalent an zelluläre Nukleophile binden. Sie reagieren z.B. relativ gut mit Thiolen wie GSH, was zu einer Depletion des GSH-Spiegels führen kann. Dadurch wird der Zelle freies GSH entzogen und sie wird anfälliger für oxidative Schäden [Bolton et al., 2000].

Neben seiner Funktion als Redox-Cycler und Alkylierungsreagenz ist Menadion auch in der Lage, zelluläre Signalwege zu modulieren, welche bei der Zell-Kommunikation im Hinblick auf Differenzierung, Proliferation und der Induktion von Apoptose von essentieller Bedeutung sind. Herausragende Bedeutung hat hier der *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Signalweg, welcher für die Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose verantwortlich ist [Singh und Czaja, 2007]. Diese Signalwege umfassen Phosphorylierungskaskaden, die zu einer Aktivierung einer MAP-Kinase (MAPK; z.B. *extracellular signal-related kinases,* ERK oder *c-Jun N-terminal kinases,* JNK) führen, die ihrerseits im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche oben genannte Funktionen auslösen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen ROS zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK führt. Durch Aktivierung von ERK1/2 wird JNK inaktiviert, was zu einer gesteigerten Resistenz gegen oxidative Zellschäden führt. Bei großen Mengen ROS (z.B. durch Menadion in hoher Dosierung) oder bei einer Inhibition von ERK1/2 kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Hyperaktivierung von JNK, was letztendlich zur Apoptose der Zelle führt [Singh und Czaja, 2007].

3.7.3.2. tert-Butylhydroperoxid

tert-Butylhydroperoxid (tBuOOH, TBH) ist ein organisches Hydroperoxid. Seine Struktur ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

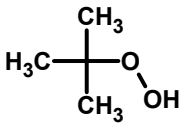


Abbildung 3.28: Struktur von *tert*-Butylhydroperoxid (TBH)

TBH wird häufig als Modellsubstanz zur Generierung oxidativer Zellschäden verwendet, da es als organisches Hydroperoxid kein Substrat für den Abbau durch die ubiquitär vorhandene Katalase darstellt [Altman et al., 1994].

Seine Toxizität beruht wahrscheinlich auf zwei Mechanismen:

1. Bildung von ROS

Durch Fe(II)-vermittelte, $O_2^{\bullet-}$-abhängige Reduktion von tBuOOH entsteht das tButoxyl-Radikal ($tBuO^{\bullet}$), welches als ultimates Oxidans in der Lage ist, zelluläre Moleküle zu schädigen:

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$tBuOOH + Fe^{2+} \rightarrow tBuO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^{-}$$

Diese Reaktion verläuft analog der klassischen Fenton-Reaktion von H_2O_2 und Fe^{2+} zu $^{\bullet}OH$ und Fe^{3+} [Altman et al., 1994; Geiger et al., 1991]. Des Weiteren kann $tBuO^{\bullet}$ auch mittels Ein-Elektronen-Reduktion durch Cytochrom P450 (in Mikrosomen) gebildet werden. Das durch diese Mechanismen entstandene $tBuO^{\bullet}$ kann als Initiator der Lipidperoxidation wirken. Außerdem ist es, in der Nähe der DNA gebildet, in der Lage, H-Atome der Desoxyribose zu abstrahieren. Die dadurch entstandenen Zucker-Radikale können in Anwesenheit von O_2 Zucker-Peroxyl-Radikale bilden. Diese Läsionen können dann zum Auftreten von DNA-Strangbrüchen führen [Halliwell und Gutteridge, 1999].

2. Störung der Glutathion-Homöostase

Da TBH ein Substrat der Glutathion-Peroxidase (GPx) darstellt, erfolgt in der Zelle die Reduktion des Hydroperoxids zum Alkohol:

$$tBu\text{-}OOH + 2\,GSH \rightarrow tBu\text{-}OH + H_2O + GSSG$$

Neben der GPx an sich zeigen auch Glutathion-S-Transferasen eine Peroxidase-Aktivität gegen verschiedene organische Hydroperoxide [Geiger et al., 1991; Prohaska, 1980]:

$$R\text{-}OOH + GSH \rightarrow R\text{-}OH + GS\text{-}OH$$

$$GS\text{-}OH + GSH \rightarrow GSSG + H_2O$$

Durch diese beiden Reaktionen, die eigentlich der Entgiftung dienen, kommt es zu einer Depletion des GSH-Spiegels mit gleichzeitigem Anstieg der GSSG-Konzentration in der Zelle. Dies resultiert in einer gesteigerten Empfindlichkeit gegen weitere oxidative Schäden, da das wichtigste intrazelluläre Antioxidans nicht mehr in ausreichendem Maße vorhanden ist. Diese gestörte GSH-Homöostase führt zum Ca^{2+}-Influx in die Zelle und, durch Aktivierung Ca-abhängiger Proteasen, Phospholipasen und Endonukleasen, zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose [Kass und Orrenius, 1999].

3.7.3.3. AAPH

2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-hydrochlorid (AAPH) ist eine wasserlösliche Azo-Verbindung, die spontan zu Stickstoff und zwei identischen sekundären Radikalen zerfällt. Diese können entweder miteinander (Inaktivierung) oder mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Peroxyl-Radikalen (Abbildung 3.29) reagieren. Obwohl AAPH auch bei *in vivo*-Experimenten verwendet wurde, um in Ratten oder Mäusen oxidativen Stress zu

erzeugen [Dooley et al., 1990], wird es heute vorwiegend zur Generierung von Peroxyl-Radikalen *in vitro* eingesetzt [Huang et al., 2005]. Es wird wegen seiner guten Wasserlöslichkeit und des relativ langsamen und gleichmäßigen Zerfalls häufig für Studien verwendet, bei denen eine konstante Konzentration bzw. Generierung von ROS benötigt wird [Dooley et al., 1990].

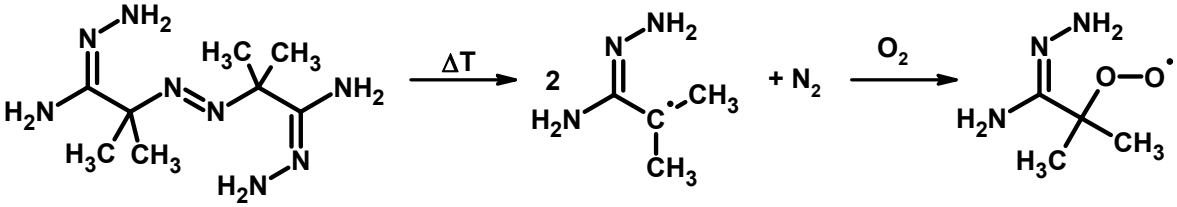


Abbildung 3.29: AAPH zerfällt thermisch induziert zu zwei sekundären C-Radikalen, die mit Sauerstoff zu Peroxylradikalen weiter reagieren; nach [Dooley et al., 1990]

3.7.4. Proteinquantifizierung

Für manche Untersuchungen ist es notwendig, den Proteingehalt der zu untersuchenden Probe (Zelllysat) zu kennen. Dieser fungiert z.B. bei der Glutathionbestimmung (Angabe in nmol GSH pro mg Protein) als Bezugsgröße. Oder für einen Assay muss eine bestimmte Menge an Protein eingesetzt werden (Proteinexpression). Dazu werden häufig colorimetrische Verfahren verwendet, die zwar eine gewisse Unsicherheit aufweisen, jedoch wesentlich einfacher und schneller durchzuführen sind als objektive Proteinquantifizierungen [Lottspeich und Zorbas, 1998].

Der quantitative Nachweis erfolgt an Hand der Farbreaktion funktioneller Gruppen der Proteine mit Farbstoff-bildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffes korreliert direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppe und kann in einem Photometer exakt gemessen werden. Zur Quantifizierung wird die gemessene Absorption mit einer Standardgeraden eines definierten Proteins (hier: Rinderserumalbumin, BSA) vergleichen. Die Unsicherheit dieser photometrischen Assays besteht häufig in der unterschiedlichen Reaktivität des Chromophors gegen unterschiedliche funktionelle Gruppen (Aminosäuren) im Protein. Kommen diese in einer Lösung zufällig häufiger vor, wird irrtümlich ein höherer Proteingehalt gemessen und umgekehrt [Lottspeich und Zorbas, 1998].

3.7.4.1. BCA-Assay

Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA, Abbildung 3.30) wurde erstmals 1985 von Smith et al. beschrieben [Smith et al., 1985]. Die zunächst farblose BCA komplexiert von Proteinen reduzierte Kupfer-Ionen, was zu einer Violettfärbung der Probenlösung führt. Diese kann photometrisch erfasst und durch Vergleich mit einer Protein-Standardgeraden quantifiziert werden.

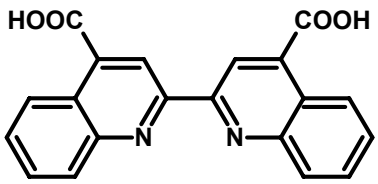


Abbildung 3.30: Struktur der Bicinchoninsäure

Bestimmte Aminosäuren, vor allem Cystein und Cystin, aber auch Tryptophan, Tyrosin und die Peptidbindungen selbst, sind in wässriger Lösung der Lage Cu^{2+} zu Cu^{+} zu reduzieren [Wiechelman et al., 1988]. An dieser Reduktion sind wahrscheinlich zwei verschiedene Reaktionen beteiligt. Einmal eine temperaturunabhängige Oxidation der Protein-Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin durch Cu^{2+} sowie die temperaturabhängige Reaktion der Peptidbindungen mit dem Kupfer [Smith et al., 1985]. Der Assay kann daher für eine gewünschte Sensitivität über die Temperatur reguliert werden.

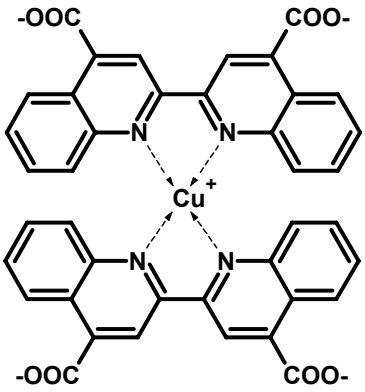


Abbildung 3.31: Der violette $(BCA)_2$-Cu^{+}-Komplex [Smith et al., 1985]

Das entstandene Cu^{+} bildet einen starken Komplex mit 2 Molekülen BCA (Abbildung 3.31), was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu einer Wellenlänge von 562 nm (violett) führt [Smith et al., 1985]. Vorteile dieses Assays sind die einfache Durchführung, gute Sensitivität und recht gute Farbstabilität.

3.7.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung nach Bradford beruht auf Änderung des Absorptionsmaximums eines Farbstoffes nach seiner Bindung an Proteine [Bradford, 1976]. Die Farbveränderung des Protein-Farbstoff-Komplexes kann photometrisch detektiert und mit Hilfe einer Standardgerade quantifiziert werden. Seine Vorteile liegen in seiner Sensitivität, der einfachen und schnellen Durchführung sowie seiner Farbstabilität über einen längeren Zeitraum [Bradford, 1976]. Nachteile dieser Methode sind die Interferenz mit anderen

Agenzien, vor allem Detergenzien oder hohen Salz-Konzentrationen, sowie die hohe Inter-Protein-Variation [Schoel et al., 1995].

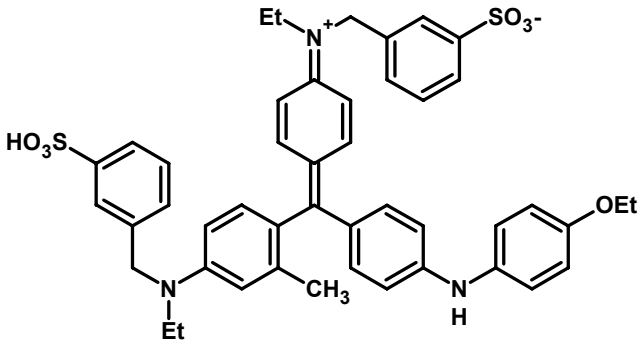


Abbildung 3.32: Struktur von Coomassie Brilliant Blue G250

Das bei der Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzte, kommerziell erhältliche Reagenz besteht aus einer Mischung von Phosphorsäure, Methanol und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Abbildung 3.32) [Bradford, 1976].

3.7.5. Bestimmung des Glutathiongehaltes

Zur Messung von reduziertem Glutathion in Blut bzw. Zellen stehen eine Vielzahl von Assays zur Verfügung: Die ersten Nachweismethoden waren unselektiv und bestimmten statt des GSH-Gehaltes unspezifisch alle Thiole nach Abtrennen von Proteinen z.B. mit *o*-Phtalaldehyd oder der Methode von Ellman. Diese beruht auf der Oxidation von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz, Abbildung 3.33) zum Chromophor 2-Nitro-5-thiobenzoesäure (TNB) durch Thiole in wässriger Lösung [Ellman, 1959].

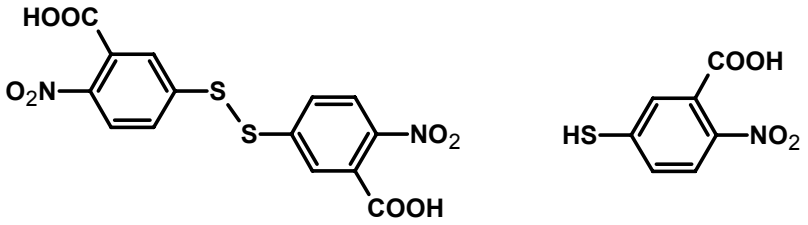


Abbildung 3.33: 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz, links) und 2-Nitro 5-thiobenzoesäure (TNB, rechts)

Gängige Methoden zur chromatographischen Trennung und Bestimmung von Glutathion umfassen HPLC an einer C18-Säule als stationärer Phase oder Kapillarelektrophorese in fused silica-Kapillaren mit fluorimetrischer, photometrischer oder elektrochemischer Detektion bzw. gekoppelt mit einem Massenspektrometer. Da weder GSH noch GSSG gute chromophore bzw. fluorophore Gruppen enthalten werden sie zur Steigerung der Sensitivität häufig noch einer Vor- oder Nachsäulenderivatisierung unterzogen.

Verwendete Reagenzien sind z.B. Monoiodessigsäure oder die oben beschriebenen Reagenzien DTNB und *o*-Phtalaldehyd. Nachteil dieser Derivatisierungsreaktionen ist die teilweise recht unspezifische Bindung der meisten Reagenzien an andere Thiole oder Amino-Gruppen [Camera und Picardo, 2002].

Nicht chromatographische Methoden umfassen photometrische, fluorimetrische und amperometrische Bestimmungen, die jedoch teilweise entscheidende Nachteile wie unzureichende Selektivität und Spezifität haben [Camera und Picardo, 2002]. Dabei ist eine der wichtigsten Prämissen für die Messung von GSH und GSSG die Spezifität zur Unterscheidung zwischen GSH und GSSG bzw. zwischen GSH und anderen Thiolen in komplexen biologischen Matrices sowie die Sensitivität für GSSG, welches in Zellen und Blut nur etwa 1 % der Gesamtkonzentration ausmacht [Camera und Picardo, 2002].

Der in dieser Arbeit verwendete Assay zur Messung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes (tGSH = GSH + GSSG) in Zellen beruht auf der GSH-abhängigen Oxidation von DTNB, zum Chromophor TNB. Diese Methode hat seither, teilweise in modifizierter Form, Anwendung zur Messung von GSH und GSSG in verschiedenen Matrices (Blut, Zellen, Geweben) gefunden [Camera und Picardo, 2002].

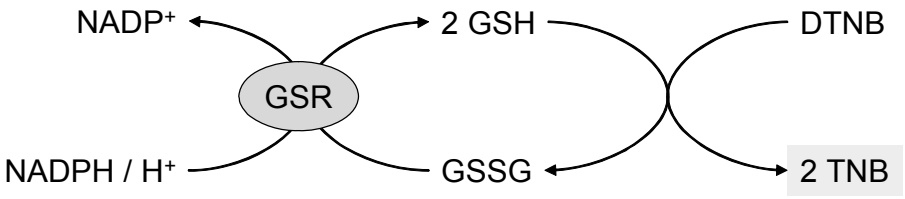


Abbildung 3.34: Prinzip der Glutathion-Bestimmung nach [Gallagher et al., 1994]; Abkürzungen siehe Text.

Die Messung von tGSH erfolgt über einen kinetischen Assay, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich DTNB zum Chromophor TNB reduzieren (Abbildung 3.34). Die Bildung von TNB kann über die Extinktionszunahme bei 412 nm zeitlich verfolgt werden. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme pro Zeit, ist proportional zur Gesamtglutathion (tGSH)-Konzentration, da alle übrigen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) im Überschuss vorhanden sind. Die Berechnung der tGSH-Konzentration erfolgt durch Vergleich mit einer GSH-Standardgeraden [Gallagher et al., 1994].

3.7.6. Detektion (oxidativer) DNA-Schäden (Comet Assay)

Zur Detektion von DNA-Strangbrüchen wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, herangezogen. Der Comet Assay ist zurückzuführen auf eine Beobachtung von Rydberg und Johanson, dass

Zellkerne nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung mit zunehmender Dosis immer diffuser im Mikroskop erschienen. Ostling und Johanson entwickelten daraus eine Technik, bei der die DNA durch Elektrophorese in Abhängigkeit von der Strahlendosis unterschiedlich weit aus dem Zellkern heraustrat [Ostling und Johanson, 1984].

Zur Durchführung des Comet Assay werden die zu untersuchenden Zellen in ein Agarosegel eingebettet und lysiert. Anschließend wird in einer Elektrophoresekammer unter alkalischen Bedingungen die DNA denaturiert (entwunden), eine Elektrophorese durchgeführt, die Objektträger neutralisiert und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 3.35).

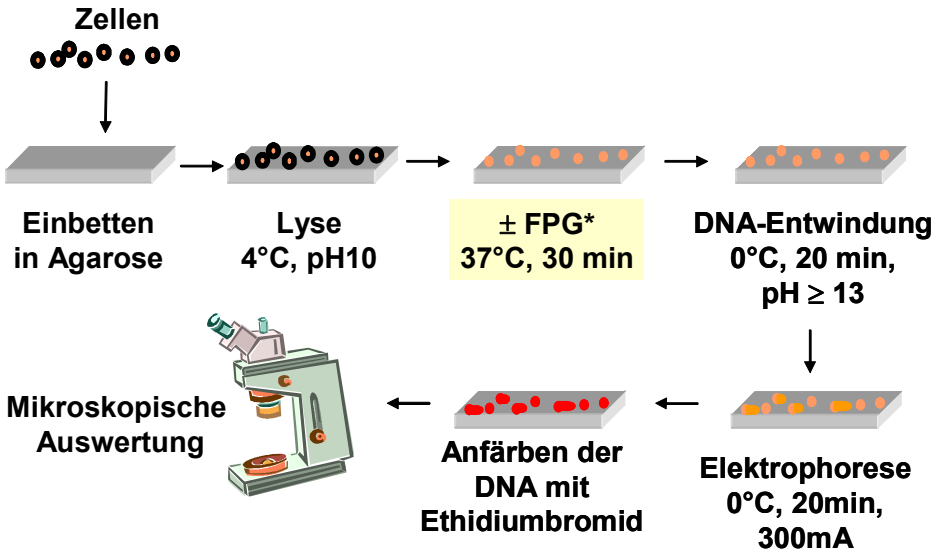


Abbildung 3.35: Durchführung des Comet Assays (schematische Darstellung).

An einem Fluoreszenzmikroskop wird die DNA mit Hilfe einer Digitalkamera Computer-gestützt ausgewertet. Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als runder Punkt, geschädigte DNA bildet charakteristische Formen, die Kometen ähneln (s. Abbildung 3.36) und dem Test seinen Namen gaben. Als Maß für die DNA-Strangbrüche wurde die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif, „tail intensity“, TI) verwendet.

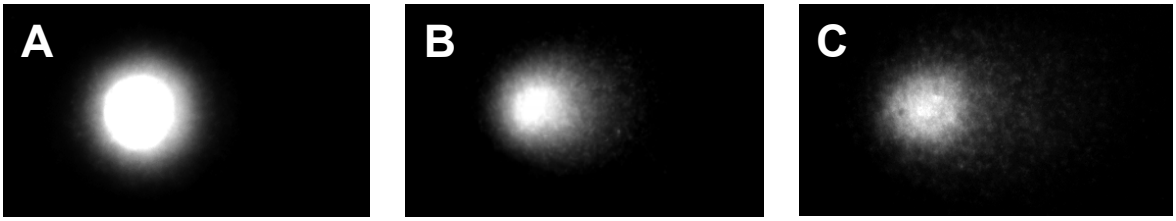


Abbildung 3.36: Beispiele für Kometen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichem Schädigungsausmaß: A: keine, B: leichte und C: starke Schädigung

Neben der oben beschriebenen Methode können durch Variation des pH-Wertes weitere Informationen über die Art der Strangbrüche erhalten werden [Horvathova et al., 1998]: Bei einer DNA-Denaturierung unter neutralen Bedingungen werden nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfasst. Im alkalischen Milieu dagegen (DNA liegt in Einzelsträngen vor) werden neben DSB ab einem pH-Wert von 12,1 auch Einzelstrangbrüche (SSB) und ab einem pH ≥ 13 alkali-labile Stellen detektiert [Fairbairn et al., 1995]. Der Comet Assay wird mittlerweile überwiegend im alkalischen Milieu (pH ≥ 13) durchgeführt [Fairbairn et al., 1995; Kassie et al., 2000; Singh et al., 1988].

Um zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, ist es möglich, die Zellkerne nach Einbetten in Agarose mit Reparaturenzymen wie Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG) oder Endonuklease III zu behandeln. Durch die DNA-Glycosylaseaktivität werden oxidierte Basen (v.a. 8-Oxo-dG durch FPG) sowie deren ringgeöffnete Imidazole herausgeschnitten, wobei eine abasische Stelle verbleibt. Durch die AP-Lyaseaktivität des FPG kann nun die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert (Abbildung 3.37) [Laval, 1996].

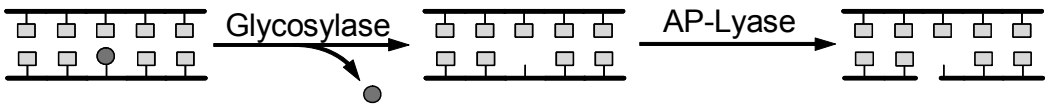


Abbildung 3.37: Wirkung des Reparaturenzyms FPG (schematische Darstellung)

Diese zusätzlichen Schäden führen zu einer Verstärkung der Schweifintensität. Die Differenz aus Strangbrüchen nach Enzymbehandlung und direkten Strangbrüchen (ohne Enzymbehandlung) entspricht den spezifisch oxidativen DNA-Schäden. [Collins et al., 2000]

3.7.7. Zellulärer Redox-Status (DCF-Assay)

Der DCF-Assay ermöglicht die Detektion von ROS in der Zelle. Er beruht auf der Oxidation von Dichlorofluorescin (DCFH) zum Fluorophor Dichlorofluoresc**e**in (DCF; Strukturformeln siehe Abbildung 3.38). Entwickelt wurde diese Methode von Keston und Brandt zur Detektion von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase in einem zellfreien System; später wurde sie zur intrazellulären Bestimmung von ROS optimiert [Bass et al., 1983; Keston und Brandt, 1965]. Seitdem wurde diese Methode häufig eingesetzt, um intrazelluläre ROS mittels Fluoreszenz-Mikroskopie, Durchflusszytometrie oder fluorimetrisch zu detektieren [Wang und Joseph, 1999]. Auch wenn die Spezifität des Tests nicht geklärt ist [Frank et al., 2000], ist dieser Assay eine Screening-Methode, die in Verbindung mit anderen Markern eine Aussage über das Ausmaß oxidativer Zellschädigung und deren Modulation durch Antioxidanzien zulässt.

Die unpolare, nicht fluoreszierende Vorstufe Dichlorofluorescin-diacetat (DCFH-DA) diffundiert durch die Zellmembran ins Innere der Zelle und wird dort durch zelluläre Esterasen oder Hydroxylionen zu DCFH deacetyliert. Durch seine höhere Polarität kann DCFH die Zellen nicht verlassen und akkumuliert dort. In Anwesenheit von zellulären ROS wird DCFH zum fluoreszierenden Farbstoff DCF oxidiert [Wang und Joseph, 1999].

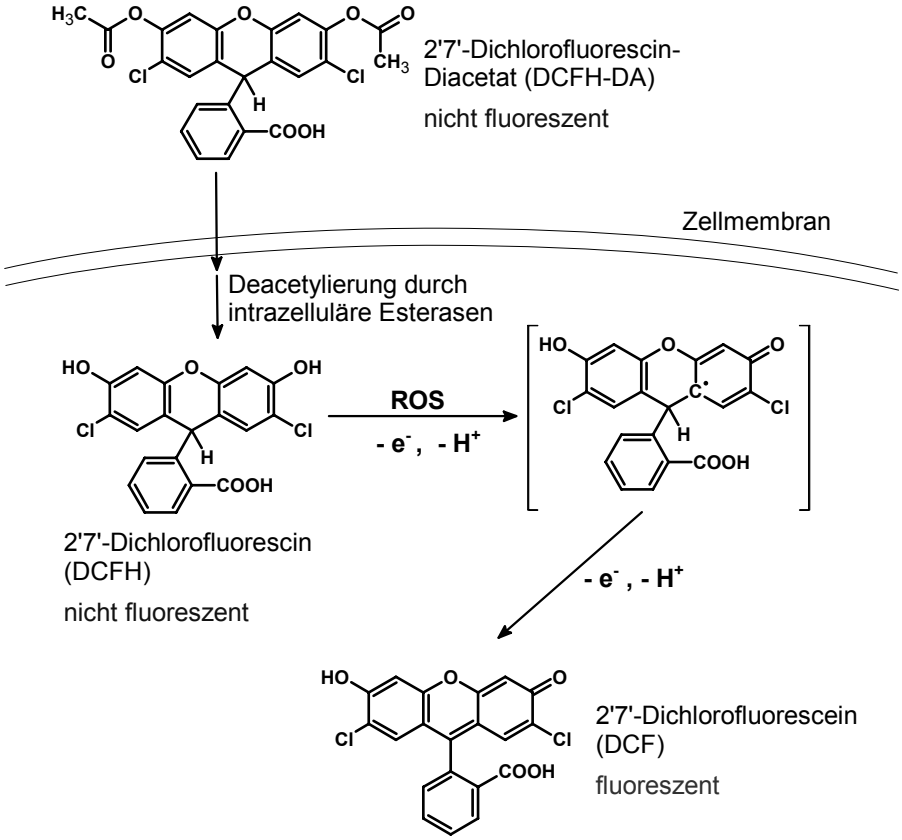


Abbildung 3.38: Aufnahme von DCFH-DA in die Zelle und Oxidation zum fluoreszierenden Farbstoff DCF; nach [LeBel et al., 1992]

Die geringe Spezifität dieser Methode wurde in den letzten Jahren kritisiert. So konnten mehrere ROS identifiziert werden, die allein oder in Kombination mit anderen Substanzen in der Lage sind, DCFH zu oxidieren. Einen Überblick über die verschiedenen Oxidanzien gibt Tabelle 3.8.

Der Assay kann daher herangezogen werden um eine generelle Aussage über dass Ausmaß an oxidativem Stress in der Zelle zu geben ohne jedoch spezifizieren zu können, um welche ROS es sich handelt.

Tabelle 3.8: Reaktive Sauerstoffspezies als mögliche Oxidanzien von DCFH

ROS	mögl. Oxidans	Literatur
$O_2^{\bullet -}$	nein	[Crow, 1997], [LeBel et al., 1992]
H_2O_2	nein	[Crow, 1997]
H_2O_2 / HRP [a)]	ja	[Crow, 1997], [LeBel et al., 1992]
HRP [a)]	ja	[Crow, 1997], [LeBel et al., 1992]
H_2O_2 / Fe^{2+}	ja	[Crow, 1997], [LeBel et al., 1992]
H_2O_2 / Fe^{3+}	nein	[LeBel et al., 1992]
$OH^{\bullet}$	unklar	[LeBel et al., 1992]
$ONOO^-$	ja	[Crow, 1997]
$NO^{\bullet}$	ja	[Wang und Joseph, 1999]
TBH [a)]	ja	[Bloch, 2005; Schäfer, 2006]

[a)] HRP: Meerrettich-Peroxidase; TBH: *tert*-Butylhydroperoxid

3.7.8. Untersuchung der Proteinexpression (Western Blot)

Die Modulation der Proteinexpression in Zellen nach Inkubation mit Testsubstanzen wurde mittels Western Blot untersucht. Dieses Verfahren besteht aus vier Schritten, von denen nur der Transfer eigentlich als Western Blotting bezeichnet wird:

1. Denaturierung der Proteine
2. Elektrophoretische Auftrennung in einem Acrylamid-Gel
3. Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blotting)
4. Immunochemische Detektion

Denaturierung und SDS-PAGE

Unter Denaturierung versteht man die reversible oder irreversible Änderung der nativen Struktur und biologischen Aktivität von Proteinen durch Zerstörung der Struktur höherer Ordnung, d.h. der Zerstörung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins [Römpp, 2009]. Dies geschieht durch Hitze (95°C) sowie durch Zusatz reduzierender Agenzien wie z.B. β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, welche Disulfid-Brücken der Proteine aufspalten. Außerdem wird bei der Denaturierung ein Überschuss an Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Dieses anionische Detergenz bindet an die denaturierten Proteine und überdeckt deren Eigenladungen so effektiv, dass Mizellen mit einem konstanten negativen Masse-Ladungsverhältnis entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein) [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Dadurch ist die elektrophoretische Mobilität *u* der Proteine, die sich durch den empirischen Zusammenhang

$$u \sim \frac{q}{M^{2/3}}$$

u = Mobilität

q = Ladung

M = Molekulargewicht

beschreiben lässt, nur noch von einem Parameter, dem Molekulargewicht *M*, abhängig. Nach der Denaturierung werden die Proteine mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde die Methode nach Laemmli verwendet, bei der das Gel aus zwei unterschiedlich dichten Phasen besteht [Laemmli, 1970]. Die denaturierten Proteine werden auf das Polyacrylamidgel pipettiert (Abbildung 3.39 A) und passieren nach Anlegen einer elektrischen Spannung (150 V) zunächst ein weitporiges Sammelgel (4 % Acrylamid), in dem sie eine gewisse Sortierung nach ihrer Mobilität erfahren (Stacking-Effekt) und an der Grenzschicht zum Trenngel (12 % Acrylamid) nochmals aufkonzentriert werden (Abbildung 3.39 B) [Lottspeich und Zorbas, 1998].

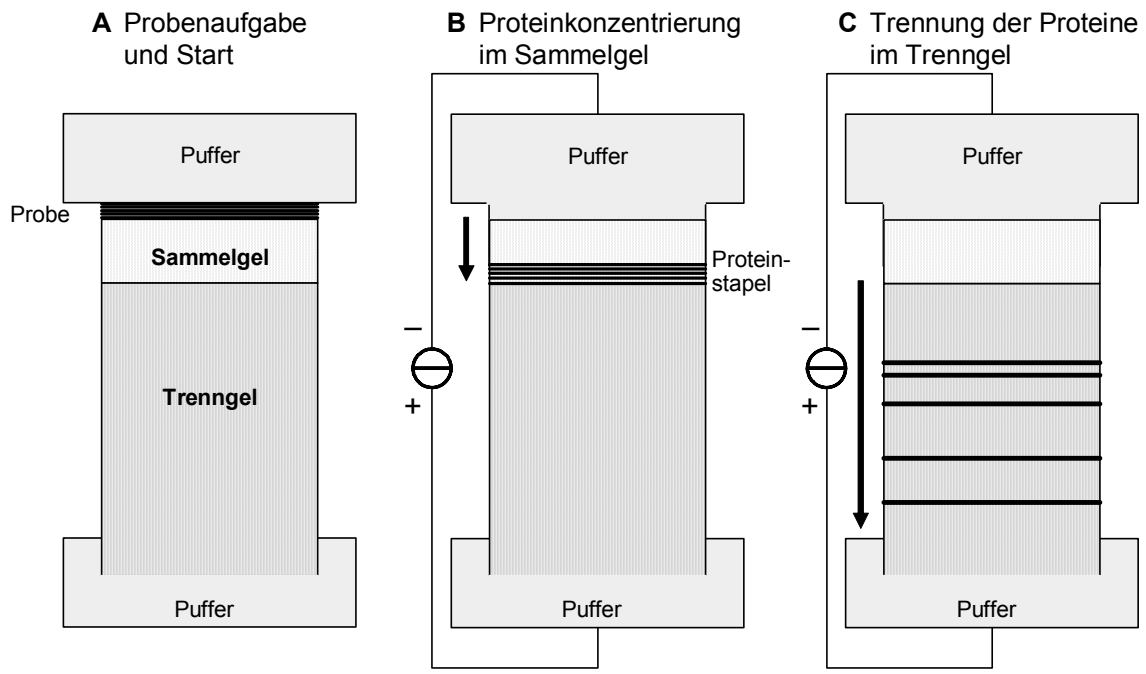


Abbildung 3.39: Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE; schematische Darstellung nach [Lottspeich und Zorbas, 1998].

Im Trenngel erfolgt dann die eigentliche Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Kleine Proteine wandern im elektrischen Feld leichter und schneller durch das Gel als große Proteine, die eher zurückgehalten werden (Abbildung 3.39 C).

Western Blotting

Das Western Blotting, also der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine (Nitrocellulose-) Membran wird inzwischen fast ausschließlich im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Dazu wird das Blot-„Sandwich“, bestehend aus mit Puffer getränkten Filterpapieren, Gel und Membran zwischen zwei Elektroden gelegt (Abbildung 3.) und ein gleich bleibender Strom (ca. 1 mA/cm^2) senkrecht zum Gel angelegt. Dadurch werden die Proteine aus dem Gel eluiert und auf die Membran transferiert [Lottspeich und Zorbas, 1998].

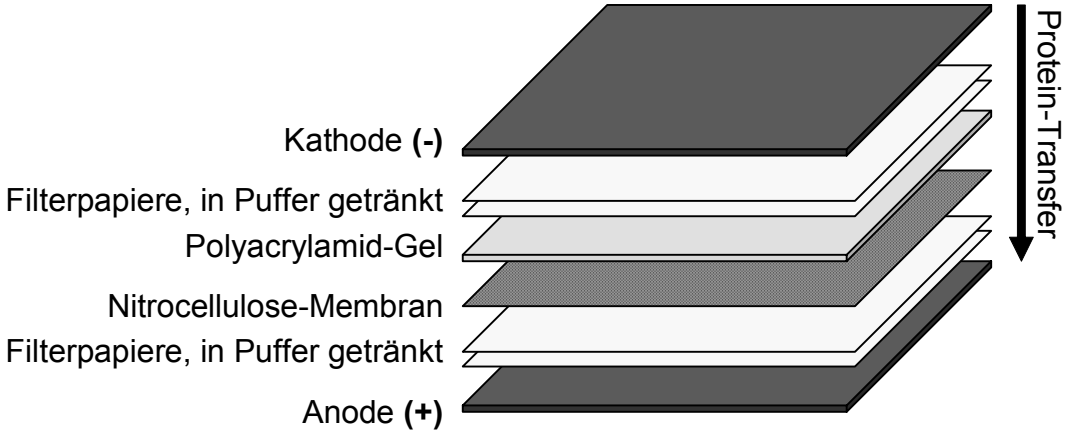


Abbildung 3.40: Semi-Dry-Blotting (schematisch)

Die Blotting-Membran besteht aus Nitrocellulose (auch möglich sind Polyvinylidenfluorid PVDF, positiv geladenes Nylon oder beschichtete Glasfasern) an der die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkung gebunden werden [Lottspeich und Zorbas, 1998; Rehm, 2006]. Nach dem Blotten werden durch Proteine noch nicht besetzte Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit einem Block-Reagenz (BSA, Milchpulver, Tween20) abgesättigt („geblockt“). Dadurch wird ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran verhindert; dies führt zu einem geringeren Grundrauschen und damit einer gesteigerten Empfindlichkeit. Die nach dem Blotten auf der Membran immobilisierten Proteine können dann weiter untersucht werden.

Immunochemische Detektion

Die geblotteten Proteine (= Antigene) lassen sich mit Antikörpern anfärben. Dazu wird der geblockte Blot zunächst mit einem anti-Antigen-Antikörper (1.-Antikörper) bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Antikörper erkennt und bindet recht spezifisch an eine bestimmte Aminosäuresequenz (Epitop) des Proteins. Die Bindung kann dabei über verschiedene Mechanismen erfolgen (H-Brücken- und Ionenbindungen, van der Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkung). Danach erfolgt die Inkubation mit einem markierten 2.-Antikörper, einem anti-1.-Antikörper-Antikörper. Dieser richtet sich zumeist unspezifisch

gegen die Rasse, aus der der Primär-Antikörper gewonnen wurde [Lottspeich und Zorbas, 1998].

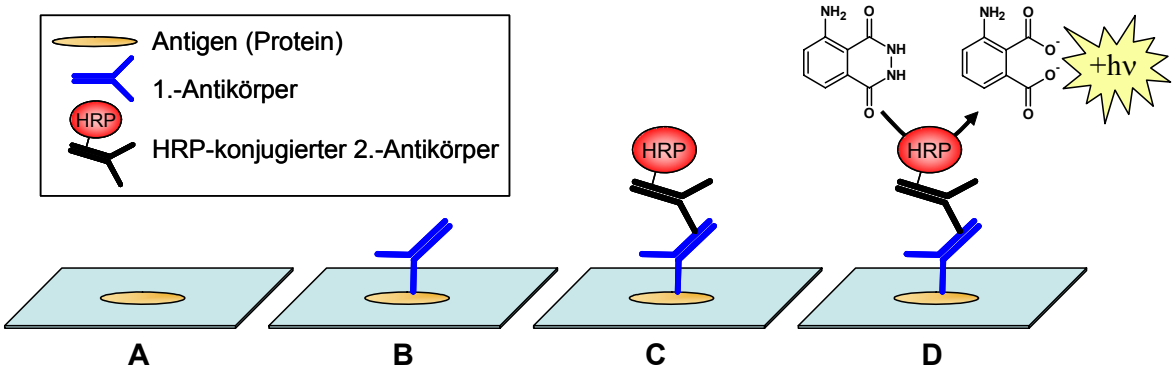


Abbildung 3.41: Prinzip der immunochemischen Detektion. Das immobilisierte Zielprotein (A) wird von einem spezifischen Antikörper erkannt (B). An diesen bindet ein weiterer, HRP-konjugierter Antikörper (C), welcher eine Visualisierungs-Reaktion katalysiert (D).

Die Visualisierung erfolgt durch eine Reaktion des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (HRP), welches an den 2.-Antikörper konjugiert ist. HRP katalysiert die Reaktion von Luminol mit H_2O_2 zu angeregtem 3-Aminophthalat, welches unter Aussendung von Licht (Chemolumineszenz) in den energetischen Grundzustand zurück fällt [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Diese Chemolumineszenz wird dann mittels Luminometer als BLU (Boehringer Light Units) quantifiziert und ist proportional der Proteinmenge auf der Membran.

3.7.9. Quantifizierung von Wasserstoffperoxid (FOX1-Assay)

Die Verwendung von Fe^{2+} und Xylenol-Orange (XO, 3,3′-Bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-*o*-cresolsulfonphthalein) zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde erstmals 1973 von Gupta beschrieben. Wolff et al. optimierten diese Methode zur Messung von Hydroperoxiden in wässrigen Medien (ferrous oxidation in xylenol orange, FOX1) durch Zusatz von Sorbitol bzw. zur Verwendung in unpolaren Medien (FOX2) [Wolff, 1994].

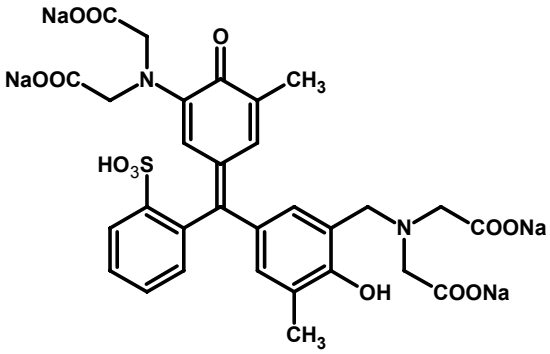


Abbildung 3.42: Xylenol-Orange Tetranatrium-Salz

In der Lösung vorhandenes H_2O_2 (R=H) oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+}, welches in saurer Lösung einen 1:1-Komplex mit XO bildet:

$$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + RO^{\bullet} + OH^{-}$$

$$Fe^{3+} + XO \rightarrow Fe^{3+} \rightarrow XO \text{ Komplex}$$

Durch diese Komplexierung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von XO zu einer Wellenlänge von 595 nm [Wolff, 1994].

Zusätzlich wird der Reaktionslösung noch Sorbitol zugesetzt, welches die Ausbeute von Fe^{3+} pro H_2O_2 steigert. Dadurch steigt der molare dekadische Extinktionskoeffizient von $4{,}5 \cdot 10^4$ auf $2{,}2 \cdot 10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$ und damit die Empfindlichkeit des Assays. Der verstärkende Effekt beruht, je nach Substrat (organisches Hydroperoxid oder H_2O_2) auf unterschiedlichen Mechanismen und soll hier für H_2O_2 beschrieben werden [Gay und Gebicki, 2000]:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-} \quad [1]$$

$$HO^{\bullet} + R_2CHOH \rightarrow H_2O + R_2C^{\bullet}OH \quad [2]$$

$$R_2C^{\bullet}OH + O_2 \rightarrow R_2C(OO^{\bullet})OH \quad [3]$$

$$R_2C(OO^{\bullet})OH \rightarrow R_2C{=}O + HO_2^{\bullet} \quad [4]$$

$$HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad [5]$$

Dabei repräsentiert R_2CHOH einen der vier sekundären Alkohole des Sorbitols, das durch ein Hydroxylradikal und O_2 zum Keton oxidiert wird [Formeln 2-4]. Das dabei entstehende $HO_2^{\bullet}$ dismutiert zu H_2O_2, welches dann eine Kettenreaktion [Formel 1] fortpflanzen kann [Gay und Gebicki, 2000].

3.7.10. zellfreie Prüfung auf antioxidative Wirksamkeit

Bei der Arbeit mit antioxidativ wirksamen Substanzen wie Polyphenolen ist es von Interesse, deren antioxidative Wirksamkeit einschätzen zu können. Dazu stehen eine ganze Reihe unterschiedlicher Tests zur Verfügung. Zu diesen Tests gehören u.a. [Prior et al., 2005]:

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
- TRAP (Radical-trapping Antioxidant Parameter)
- TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity)
- FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power)
- CUPRAC (Copper Reduction Assay)
- TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Assay)
- F-C (Folin-Ciocalteau-Assay)

Die Chemie dieser Assays beruht auf zwei unterschiedlichen Reaktionsmechanismen: Wasserstoff-Atom-Transfer (HAT) oder Elektronentransfer (ET; genauer PCET), auf deren Mechanismen in Abschnitt 3.4.3.1 genauer eingegangen wird. Auf Grund der Unterschiedlichkeit dieser Mechanismen wurde festgestellt, dass kein einzelner Assay eine Aussage über die gesamte antioxidative Wirksamkeit einer Substanz machen kann. Daher wurden, um eine möglichst umfassende Bewertung der untersuchten Substanzen zu ermöglichen, in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Testsysteme verwendet, TEAC und ORAC. Während der ORAC auf dem Prinzip des radical-quencings, also des Abfangens durch HAT beruht, liegt der Hauptmechanismus des TEAC-Assays bei der Reduktion durch PCET [Prior et al., 2005].

3.7.10.1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Der TEAC-Assay wurde erstmals 1993 von Miller und Rice-Evans zur Messung der antioxidativen Kapazität von Körperflüssigkeiten und Medikamentenlösungen vorgestellt und später von Re et al. optimiert [Miller et al., 1993; Re et al., 1999]. Er beruht auf der Entfärbung des stabilen Radikals von ABTS (2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure); Abbildung 3.43) durch Antioxidanzien.

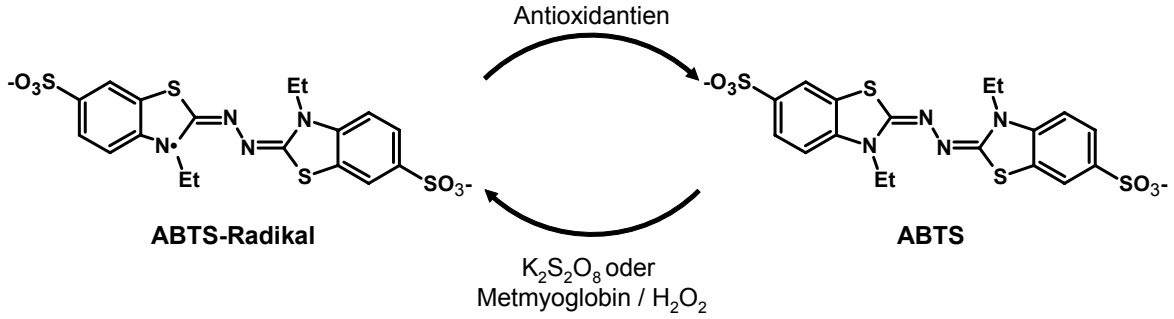


Abbildung 3.43: Prinzip des TEAC-Assays

Die Generierung des Radikals kann auf zwei Arten erfolgen. Miller et al. erzeugten Ferrylmyoglobin-Radikale aus Metmyoglobin und H_2O_2 in Gegenwart von ABTS, welches dadurch *in situ* zum farbigen Radikal oxidiert wurde [Miller und Rice-Evans, 1996]. Da die Generierung von $ABTS^{\bullet}$ und die Abfangreaktion durch Antioxidanzien jedoch gleichzeitig in einem Ansatz erfolgen, können nicht nur $ABTS^{\bullet}$ sondern auch die Ferrylmyoglobin-Radikale durch Antioxidanzien abgefangen werden, was zu einer Überschätzung der antioxidativen Kapazität führen kann [Prior et al., 2005].

Daher verwenden Re et al. ein Zweistufen-Protokoll: Zunächst erfolgt die Oxidation von ABTS durch Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$), um das bei Raumtemperatur über längere Zeit stabile Radikal $ABTS^{\bullet}$ zu generieren. Dieses ist ein blau-grünes Chromophor, mit

Absorptionsbanden bei 645, 734 und 815 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 415 nm [Re et al., 1999]. Erst nach dieser Aktivierung erfolgt die Reaktion von $ABTS^{\bullet}$ mit Antioxidanzien, welche eine Reduktion zu dem farblosen ABTS bewirken. Diese erfolgt wahrscheinlich nach einem ET-Mechanismus, also durch Abgabe eines Elektrons vom Antioxidans (z.B. Phenol) auf $ABTS^{\bullet}$ (siehe auch 3.7.10) [Campos und Lissi, 1997]:

$$ABTS^{\bullet+} + Ph\text{-}OH \rightarrow ABTS + Ph\text{-}O^{\bullet} + H^{+}$$

Da während des Messzeitraums sowohl schnelle als auch langsame Radikalabfangreaktionen stattfinden, wurde ein einheitlicher Messzeitraum von 6 min gewählt, um die einzelnen Antioxidanzien miteinander vergleichen zu können [Re et al., 1999].

3.7.10.2. Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC)

Der ORAC-Assay ist ein weiterer Test zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Substanzen und Lösungen, der auf den Arbeiten von Glazer beruht [Glazer, 1988]. Er wurde erstmals 1993 von Cao et al. vorgestellt und von Ou et al. optimiert [Cao et al., 1993; Ou et al., 2001]. Das Verfahren beruht auf der Oxidation eines Indikatormoleküls durch freie Radikale, die durch Antioxidanzien verhindert wird. Als Indikatormoleküle dienen Fluorophore, deren Oxidation mit dem Verlust ihrer Fluoreszenz einhergeht.

Als Indikator hat sich Fluorescein bewährt, das gegenüber dem von Glazer und Cao verwendeten Protein β-Phycoerythrin einige Vorteile aufweist: Im Gegensatz zu β-Phycoerythrin ist Fluorescein photostabil und zerfällt nicht nach Belichtung („photobleaching“). Außerdem kommt es nicht zur Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische Proteinbindung der Polyphenole ans β-Phycoerythrin [Ou et al., 2001].

Die Generierung der Radikale erfolgt durch AAPH, welches in wässriger Lösung konstant Peroxylradikale generiert (siehe 3.7.3.3). Diese werden durch Fluorescein über einen HAT-Mechanismus inaktiviert (siehe 3.7.10 und Abbildung 3.44). Das entstehende Fluorescein-Radikal reagiert weiter und bildet letztendlich ein nicht fluoreszierendes Endprodukt, was zu einem Abfallen der Fluoreszenzintensität der Probe führt.

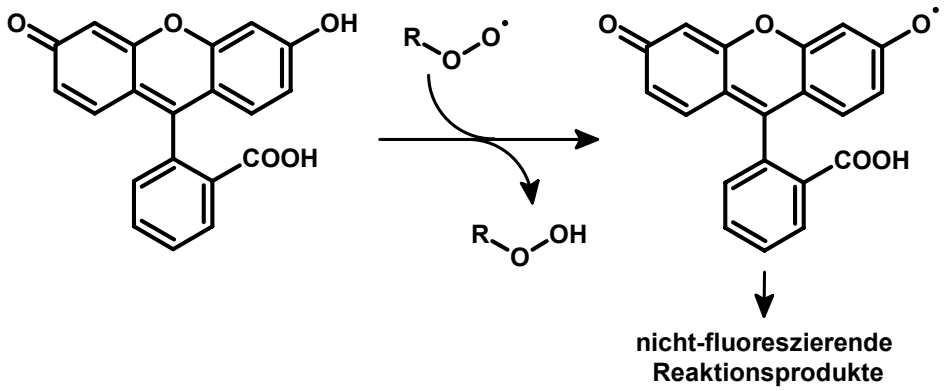


Abbildung 3.44: Inaktivierung der Peroxylradikale durch Fluorescein; nach [Ou et al., 2001], modifiziert

Die Zugabe von Antioxidanzien führt zu einer kompetitiven Reaktion mit Fluorescein um die Inaktivierung der Radikale. Die Abnahme der Fluoreszenz wird zeitlich herausgezögert (lag time), da zunächst das Antioxidans „aufgebraucht“ wird (siehe Abbildung 3.45) [Prior et al., 2005].

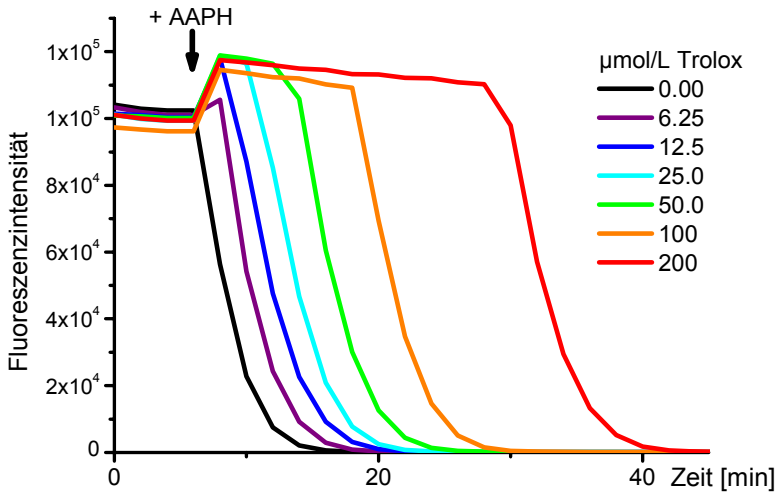


Abbildung 3.45: Abnahme der Fluoreszenz nach Oxidans-Zugabe (+AAPH) und konzentrationsabhängiger Erhalt durch das Antioxidans Trolox [eigene Messungen]

Zur Berechnung der antioxidativen Wirksamkeit werden die Integrale der Messkurven (area under curve, AUC) verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist die Anwendbarkeit auf schnell und langsam reagierende Antioxidanzien als auch auf komplexe Mischungen, wie z.B. Nahrungsmittel, die eine Reihe verschiedener Antioxidanzien (mit verschiedenen Reaktionskinetiken) enthalten [Huang et al., 2005].

3.7.11. Analytik der fermentierten Apfelsaftextrakte

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 3.4.2.5), unterliegen Polyphenole während der anaeroben Fermentation Abbau-, Umlagerungs- und Kondensationsreaktionen. Insbesondere bei längeren Fermentationszeiten muss damit gerechnet werden, dass die Ausgangsstrukturen nicht stabil sind, und neue Produkte entstehen, die auch eine biologische Wirksamkeit besitzen. Um diese zu identifizieren wurden die Fermentationsüberstände mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) aufgetrennt und die entstehenden Peaks mittels DAD (Dioden-Array Detektor) und ESI-MS (Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisationsquelle) identifiziert.

Die HPLC ist eine Methode, welche hochauflösende Trennungen innerhalb kurzer Zeit (Minuten bis 1 h) zulässt [Matissek und Steiner, 2006]. Wie alle chromatographischen Trennverfahren basiert sie darauf, dass die zu trennenden Substanzen über zwei Phasen verteilt werden. Eine dieser Phasen ist immobil (stationäre Phase, Material der HPLC-Säule), die andere ist beweglich (mobile Phase, Lösungs- oder Fliessmittel). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren der Reversed Phase- (RP)-HPLC wurde als stationäre Phase die unpolare Substanz Octadecylsilan (C18) verwendet, welches an die polaren OH-Gruppen der Kieselgel-Oberfläche substituiert ist. Als mobile Phase kommen bei der RP-HPLC relativ polare Solventien (Wasser, Methanol, Acetonitril) zum Einsatz; durch die Verwendung eines Lösungsmittelgradienten (polar → unpolar) erfolgt die Elution der an die stationäre Phase adsorbierten Polyphenole nach ihrer Polarität.

Flavonoide und (Poly)Phenole zeigen aufgrund ihrer aromatischen phenolischen Struktur charakteristische Absorptionsbanden im UV-Bereich, die photometrisch bzw. mittels UV/Vis-Detektion ermittelt werden können [Schieber et al., 2001]. Die Lage der Absorptionsbanden hängt dabei von der Natur des Elektronenübergangs ab [Hesse et al., 2002]; für sterische, induktive und mesomere Effekte (wie den Einbau der chromophoren Gruppe in ein größeres konjugiertes System) wird die Absorptionslage allerdings stark beeinflusst. So können funktionelle Gruppen schon bei der Detektion an Hand ihrer maximalen Absorptionswellenlänge (λ_{max}) identifiziert werden. Eine Übersicht über die Detektionswellenlänge der untersuchten Substanzen (als welche idealerweise λ_{max} gewählt wird) gibt Tabelle 3.9.

Tabelle 3.9: Detektionswellenlängen der untersuchten Polyphenole; nach [Schäfer, 2006; Schieber et al., 2001]

Detektionswellenlänge	untersuchte Polyphenole
210 nm	Phloroglucinol
280 nm	Dihydrochalcone, phenolische Säuren, Flavanole
320 nm	Hydroxyzimtsäuren
370 nm	Flavonole

Die Detektion wurde mittels DAD-Detektor durchgeführt, welcher eine rasche, simultane Aufnahme des gesamten Spektrums in wenigen Millisekunden erlaubt [Römpp, 2009], im Gegensatz zum UV/Vis-Detektor, bei dem immer nur eine Wellenlänge auf einmal detektiert werden kann.

Zur Identifizierung weiterer Substanzen kam das Verfahren der HPLC-ESI-MS zum Einsatz [Hesse et al., 2002]. Nach chromatographischer Trennung (HPLC) werden die Polyphenole in das Massenspektrometer geleitet. Dieses ist, nach der Ionisation der Analyten in der Lage, deren Masse zu detektieren. Die Ionisation erfolgte mittels ESI, welches eine Messung von Substanzen weitestgehend ohne Fragmentierung erlaubt. Die Substanzlösung wird zu geladenen Tröpfchen vernebelt, die unter Verdampfung des Solvens im Trockengas-Gegenstrom (N_2, 450 °C) kleiner werden, bis sie nur noch ein Substanzmolekül enthalten. Diese werden durch das angelegte elektrische Feld in den Analysator gelenkt, ein Quadrupol-Massenspektrometer. In diesem erfolgt eine Selektion nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis der Ionen; in Kombination mit der HPLC-Trennung kann jedem Zeitpunkt (Peak) des Chromatogramms ein Massenspektrum zugeordnet werden.

Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Vergleich von UV/Vis-Spektren, Retentionszeiten und Massen/Ladungs-Zahlen mit externen Referenzsubstanzen.

4. Ergebnisse und erste Diskussion

4.1. Antioxidative Wirksamkeit phenolischer Extrakte aus Äpfeln

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen *in vitro* geprüft; es wurde die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 verwendet, die ein gutes Modell für intestinale Epithelzellen darstellt und auf Grund ihrer fehlenden NQO1-Aktivität empfindlich auf Modifikationen durch Polyphenole reagiert. Außerdem können bei der Inkubation auftretende prooxidative Effekte der Polyphenole auf Grund des verwendeten Mediums der Caco-2 Zellen weitgehend ausgeschlossen werden (siehe Abschnitte 3.4.5.2 und 4.4).

Untersucht wurden verschiedene, von der Forschungsanstalt Geisenheim hergestellte Apfelsaftextrakte (AEs) und Apfelschalenextrakte (PE), die sich in ihrer Sortenauswahl bzw. ihrer technologischen Gewinnung unterscheiden. Die genaue Zusammensetzung ist in Abschnitt 3.6 beschrieben.

4.1.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC / ORAC)

Zur Erfassung der zellfreien antioxidativen Wirksamkeit wurde der ORAC-Assay zusätzlich zum TEAC-Assay etabliert. Da deren Reaktionen auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen (ORAC: Wasserstoff-Atom-Transfer; TEAC: überwiegend Elektronentransfer), erlaubt die Verwendung beider Assays eine umfassendere Beurteilung der radikalabfangenden Eigenschaften der Extrakte.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt; die TEAC-Werte von AE01 – AE04 (gemessen durch [Schäfer et al., 2006a]) wurden zusätzlich angegeben um einen Vergleich der Extrakte zu ermöglichen. Alle untersuchten Extrakte zeigten eine deutliche antioxidative Wirksamkeit mit Werten im Bereich von 4,5 – 6,9 mmol/L Trolox (ORAC) bzw. 3,4 – 6,5 mmol/L Trolox (TEAC), wobei die ORAC-Werte immer über den TEAC-Werten lagen. Einzige Ausnahme bildete AE06, der mit 6,5 mmol/L Trolox eine überragenden TEAC-Wert hatte; der in der Wirksamkeit folgende Extrakt war AE07 mit 5,3 mmol/L Trolox. Bei allen anderen Extrakten bewegten sich die TEAC-Werte im Bereich 3,4 – 4,7 mmol/L Trolox.

Beim ORAC verteilen sich, ähnlich wie beim TEAC, die meisten Werte auf einen schmalen Bereich (5,4 – 6,9 mmol/L Trolox), jedoch zeigten nicht AE06 und AE07, sondern AE04 und AE01 die höchste Wirksamkeit. Einzig AE06B war mit einem ORAC von 4,5 mmol/L Trolox etwas weniger aktiv.

Tabelle 4.1: Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (ORAC/TEAC) polyphenolreicher Extrakte aus Apfelsaft bzw. -schalen. MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten.

Extrakt	ORAC [mmol/L Trolox] [a]		TEAC [mmol/L Trolox] [a]	
AE01	6,6	± 0,8	3,4	± 0,1 [b]
AE02	6,7	± 0,2	3,7	± 0,0 [b]
AE03B	5,9	± 0,3	4,2	± 0,0 [b]
AE04	6,9	± 0,4	4,0	± 0,1 [b]
AE05	6,1	± 0,4	4,1	± 0,4
AE06	6,1	± 0,8	6,5	± 0,1
AE06B	4,5	± 0,3	3,4	± 0,1
AE07	6,3	± 0,6	5,3	± 0,5
PE	5,4	± 0,3	4,1	± 0,1
GS	5,8	± 0,8	4,7	± 0,2

[a] Konzentration einer Trolox-Lösung mit derselben antioxidativen Wirksamkeit wie eine 1mg/mL Lösung des Extraktes.
[b] nach [Schäfer et al., 2006a]

Die deutlichen Werte beider Assays belegen die Beteiligung der verschiedenen Reaktionsmechanismen für die antioxidative Wirksamkeit der Extrakte. Es ist zu erkennen, das ein hoher TEAC-Wert nicht zwangsläufig einen guten ORAC-Wert bedingt und vice versa; die den Assays zugrunde liegenden Mechanismen scheinen also unabhängig von einander zu sein. Tatsächlich zeigte die lineare Regression von ORAC- und TEAC-Werten der Extrakte keinen direkten Zusammenhang zwischen diesen beiden Markern; der Korrelationskoeffizient war R = 0,088. Auch eine Untersuchung verschiedener polyphenolhaltiger Getränke deutete an, dass, je nach verwendeter Methode, die Reihung der antioxidativen Kapazität zwischen verschiedenen Assays variiert [Seeram et al., 2008]. Prior et al. bestätigten ebenfalls, dass zwischen ORAC- und TEAC-Assay kein direkter Zusammenhang besteht [Prior et al., 2005].
Die unterschiedliche Reihung der antioxidativen Kapazität beider Methoden legte nahe, dass die Extrakt-Zusammensetzung einen deutlichen Einfluss auf den Reaktionsmechanismus der antioxidativen Wirksamkeit hat, bzw. dass die antioxidative Kapazität der Polyphenole auch auf verschiedenen Mechanismen beruht.

Korrelation zwischen AE-Zusammensetzung und antioxidativer Wirksamkeit

Um die Beteiligung der einzelnen Inhaltsstoffe auf die antioxidative Wirksamkeit der Extrakte abschätzen zu können, wurde eine lineare Regression zwischen den ORAC-/

TEAC-Werten und der Konzentration der Extrakt-Inhaltsstoffe durchgeführt. Ausgewählte Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 4.2 aufgeführt, die gesamten Ergebnisse der linearen Regression sind im Anhang zu finden.

Tabelle 4.2: Ausgewählte Korrelationskoeffizienten R der linearen Regression zwischen Extrakt-Zusammensetzung (Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7) und antioxidativer Kapazität der Extrakte (Tabelle 4.1).

Substanz(gruppe)	Korrelationskoeffizient R	
	ORAC	TEAC
(niedermolekulare) Polyphenole	0,886	-0,134
Flavanole	-0,303	0,680
Dihydrochalcone	0,680	-0,280
Hydroxyzimtsäuren	0,645	-0,125
Flavonole	-0,253	0,006
oligomere Procyanidine	0,074	0,707
Polyphenole + Procyanidine	0,647	0,479
Oligosaccharide	-0,846	-0,495

Für den ORAC-Assay wurde der höchste Korrelationskoeffizient für die Summe der niedermolekularen Polyphenole bestimmt, was für einen starken Einfluss dieser Gruppe auf die antioxidative Wirksamkeit (ORAC) spricht. Auch bei den Arbeiten anderer Gruppen konnte die Bedeutung der phenolischen Inhaltsstoffe von Früchten/Fruchtextrakten für deren antioxidative Kapazität (ORAC) gezeigt werden [Kedage et al., 2007; Luximon-Ramma et al., 2005; Mahattanatawee et al., 2006; Soobrattee et al., 2008]. Innerhalb der Gruppe niedermolekularer Polyphenole lieferten die Dihydrochalcone und Hydroxyzimtsäuren, die mit bis zu 35 bzw. 80 % der monomeren Polyphenole die mengenmäßig bedeutendsten Untergruppen darstellen, den höchsten Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit (ORAC), während zu den Flavonoiden (Flavanole und Flavonole) eine leicht inverse Korrelation bestand. Die Summe der oligomeren Procyanidine schien keinen Einfluss auf den Parameter ORAC zu haben, während bei den Oligosacchariden eine stark inverse Korrelation zu beobachten war.

Der Vergleich von Extrakt-Inhaltsstoffen und TEAC-Werten zeigte keine so deutlichen Korrelationen wie beim ORAC-Assay. Während die Bedeutung der niedermolekularen Polyphenole auf die antioxidativen Kapazität (TEAC) nicht sicher abgeschätzt werden konnte, zeigte sich eine starke Korrelation mit der Summe der oligomeren Procyanidine. Soobrattee et al. hatten für die Dimere Procyanidin B_1 und Procyanidin B_2 TEAC-Werte von 6,5 bzw. 7,6 mmol/L Trolox berichtet [Soobrattee et al., 2005], was ungefähr der Summe der TEAC-Werte ihrer Monomere Catechin und Epicatechin (mit 3,2 bzw. 3,6 mmol/L Trolox [Soobrattee et al., 2005]) entspricht (dies gilt allerdings nur, wenn die

antioxidative Kapazität der Substanzen in mmol/L angegeben wird, was unabhängig von der molekularen Masse ist). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die antioxidative Kapazität (TEAC) der in Apfelsaft vorkommenden Oligomere, die einen mittleren Polymerisierungsgrad von 6 haben [Hümmer et al., 2008], noch wesentlich höher ist. Nach bisherigem Kenntnisstand wurden keine TEAC-Werte oligomerer Procyanidine veröffentlicht, evtl. auf Grund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit oder ihrer Empfindlichkeit gegenüber Luftsauerstoff und Licht [Hümmer und Schreier, 2008]. Die Wichtigkeit der oligomeren Procyanidine für die antioxidative Kapazität (TEAC) der Extrakte wurde durch die deutliche Korrelation ihrer Mono- und Dimere, den Flavanolen, zu den TEAC-Werten belegt. Die Korrelation der TEAC-Werte mit der Summe der Quercetin-Glykoside, die allesamt als starke Antioxidanzien beschrieben sind [Schäfer et al., 2006a], betrug nur R=0,006. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die jeweiligen Flavonole zwar eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen, in den meisten Extrakten aber nur in geringer Menge (≤1,2 %) vorkommen. Lediglich die beiden Schalenextrakte (PE, GS) sowie AE03 enthielten größere Mengen (9,6 – 16 %).

Wie bei den ORAC-Ergebnissen zeigte auch der TEAC eine inverse Korrelation zur Menge der Oligosaccharide. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass die Menge antioxidativ wirksamer Polyphenole mit steigender Kohlenhydrat-Menge in den Extrakten abnimmt, was durch die positive Korrelation von ORAC/TEAC mit der Summe phenolischer Komponenten (monomere Polyphenole + oligomere Procyanidine) bestärkt wurde. Auch die Bindung von Polyphenolen an Saccharide, wie für Procyanidine und Hydroxyzimtsäuren beschrieben [Ferguson et al., 2005; Le Bourvellec et al., 2007], könnte eine Verringerung der antioxidativen Eigenschaften zur Folge haben. Sun-Waterhouse et al. fanden jedoch nur eine sehr kleine Verringerung der antioxidativen Wirksamkeit von Quercetin bei Anwesenheit von Pektin um nur 1,5 % [Sun-Waterhouse et al., 2008], was nicht für eine Inaktivierung der Polyphenole durch Kohlenhydrat-Bindung spricht.

Eine direkte antioxidative Wirksamkeit der Saccharide, wie bei [Stratil et al., 2007] beschrieben, kann wahrscheinlich vernachlässigt werden. Die in den Extrakten vorliegenden Kohlenhydrate sind zum überwiegenden Teil Oligo- und Polysaccharide [Mehrländer et al., 2002], so dass der Einfluss reduzierender Zucker als gering einzustufen ist.

4.1.2. Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels

Die Beeinflussung der zellulären antioxidativen Abwehr von Caco-2 Zellen durch 24h-Inkubation mit Apfelsaft-/Schalenextrakten wurde im DCF-Assay untersucht. Die Ergebnisse der AEs sind in Abbildung 4.1 gezeigt:

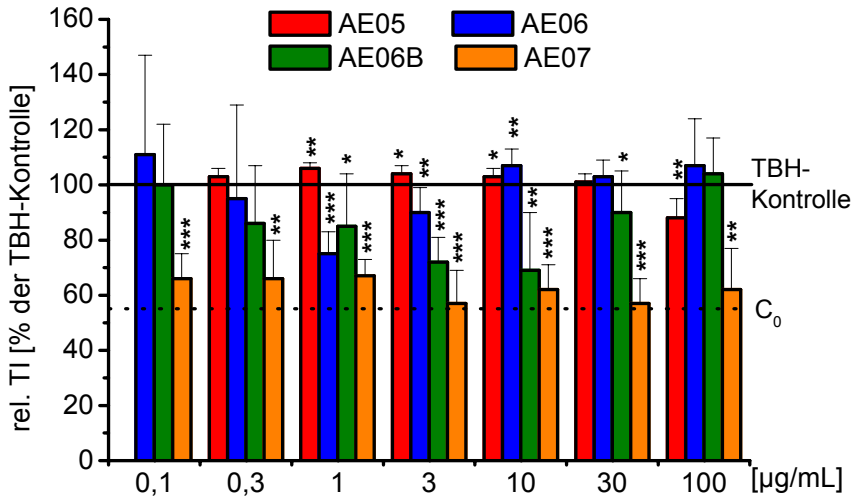


Abbildung 4.1: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Apfelsaftextrakten (AEs). MW + SD aus n=3-6 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur TBH-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Alle untersuchten AEs waren in der Lage, den zellulären, TBH-induzierten ROS-Level signifikant zu verringern, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Die beste Wirkung zeigte AE07, der über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1 – 100 µg/mL den ROS-Level auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle senkte. Damit war er als einziger untersuchter AE in der Lage, die durch TBH-Inkubation gebildeten intrazellulären ROS nahezu vollständig zu inaktivieren.

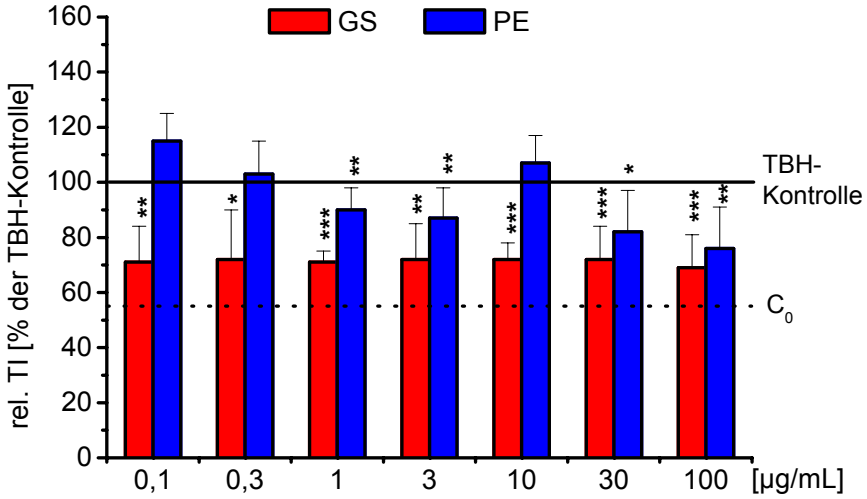


Abbildung 4.2: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Apfelschalenextrakten aus verschiedenen Äpfeln (PE) bzw. aus Granny Smith (GS). MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur TBH-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Ob diese nach 24h Inkubation beobachtete Wirkung auf einer direkten antioxidativen Wirkung des AE07 oder auf zellvermittelten Effekten beruht ist fraglich; S. Schäfer konnte zeigen, dass die nach 24h Inkubation auftretende Reduktion des ROS-Levels bei einer Inkubationszeit von 2h weniger ausgeprägt war, was auf eine starke Modulation der antioxidativen Zellabwehr bei längeren Inkubationszeiten schließen lässt [Schäfer, 2006]. Wie für andere AEs beschrieben [Schäfer et al., 2006a] zeigten die Extrakte AE06 und AE06B eine U-förmige Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Wirksamer Konzentrationsbereich und maximale Wirkstärke dieser Kurven unterschieden sich jedoch deutlich von einander. Während AE06 eine Wirksamkeit im Bereich 0,3 – 10 µg/mL mit einer maximalen Reduktion bei 1 µg/mL aufwies, war die effektive Breite von AE06B weiter gefasst (0,3 – 30 µg/mL), mit einer maximalen Reduktion bei 3 – 10 µg/mL. AE05 zeigte erst bei der höchsten untersuchten Konzentration von 100 µg/mL eine leichte Verringerung des ROS-Levels. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht, da wachstumshemmende Effekte der AEs unter diesen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden können [Veeriah et al., 2006].

Die Untersuchung der Schalenextrakte (Abbildung 4.2) zeigte, dass der Extrakt aus Granny Smith-Schalen (GS) eine signifikante Reduktion des ROS-Levels ab 0,1 µg/mL bewirkte. Ebenso wie AE07 senkte GS den ROS-Level auf das Niveau der Lösemittel-Kontrolle (C_0, ohne TBH-Behandlung). Auch der aus Apfelschalen verschiedener Sorten gewonnene Extrakt PE reduziere den zellulären ROS-Level signifikant. Die Wirksamkeit war jedoch weniger ausgeprägt als bei GS.

Es konnte keinem Extrakt-Inhaltsstoff eine direkte Beteiligung an der Reduktion des zellulären ROS-Levels zugeschrieben werden: die beiden Extrakte AE05 und AE07, die sich in ihrer Polyphenol-Zusammensetzung relativ ähnlich sind, zeigten stark unterschiedliche Ergebnisse. Ebenso waren bei AE07 und GS, beide effektive Senker des ROS-Levels, kaum Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung festzustellen. Auch [Schäfer, 2006], die die Extrakte AE01 – AE04 untersuchte, konnte keine Substanz als maßgeblich für die Reduktion des zellulären, TBH-induzierten ROS-Levels identifizieren. Die Untersuchung ausgewählter Apfelsaft-Polyphenole zeigte jedoch eine Reduktion des zellulären ROS-Levels in Caco-2 Zellen durch Que, ChA, CaA und Pt [Schäfer et al., 2006a].

4.1.3. Modulation des Glutathion-Spiegels

Auch die Modulation des wichtigsten zellulären Antioxidans Glutathion (GSH) [Meister und Anderson, 1983] durch Apfel-Extrakte wurde untersucht. Dazu wurde der Gesamt-Glutathion-Gehalt in Caco-2 Zellen gemessen; Abbildung 4.3 zeigt die Modulation des tGSH-Spiegels nach 24h Inkubation mit AEs. AE06 und AE07 führten in Konzentrationen

von ≥10 µg/mL zu einer Steigerung des tGSH-Spiegels; signifikante Effekte zeigten sich bei AE07 ab 30 µg/mL, mit AE06 erst bei 100 µg/mL. Weder AE05 noch AE06B waren im untersuchten Konzentrationsbereich (1 – 100 µg/mL) in der Lage, den zellulären GSH-Spiegel zu erhöhen. Die Inkubation mit AE06B einer konzentrationsabhängigen Depletion des tGSH-Spiegels ab >10 µg/mL.

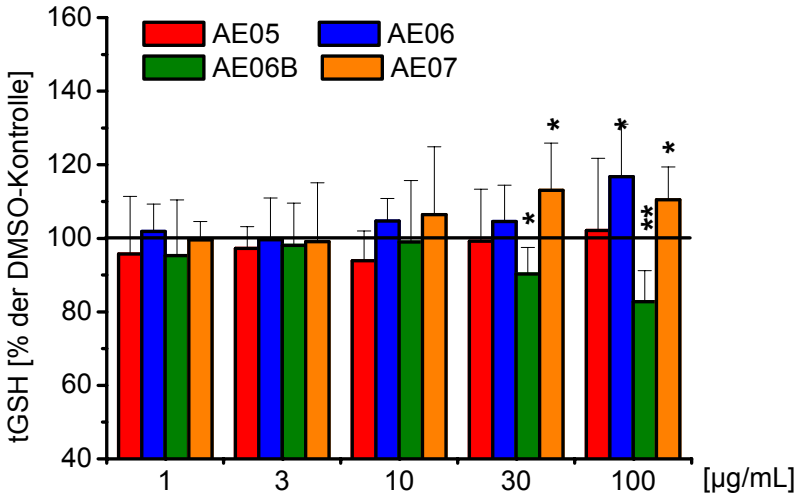


Abbildung 4.3: tGSH-Spiegel in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit AEs. MW + SD aus n=3-6 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur Lösungsmittel-Kontrolle (0,1 % DMSO): *p<0,05 **p<0,01

Dieser Effekt könnte durch die Bildung von GSH-Addukten mit Extrakt-Inhaltsstoffen zustande kommen, was für verschiedene Polyphenole (nach Oxidation ihrer *o*-Catecholgruppe) als spontaner Prozess dokumentiert ist [Moridani et al., 2001a; Moridani et al., 2001b]. Eine Verringerung der GSH-Synthese durch Extrakt-Inhaltsstoffe kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden; die GSH-Synthese ist zum größten Teil über die ARE-abhängige Expression der Enzyme γGCS und Glutathion-Synthase reguliert, die durch Polyphenole im Allgemeinen induziert werden [Masella et al., 2005; Scharf et al., 2003].

Es konnte nicht genau bestimmt werden, welche Substanz(en) für die beobachtete GSH-Depletion verantwortlich sein könnte(n), da AE06B, verglichen mit den anderen Extrakten von keinem Polyphenol eine besonders hohe Menge enthält; einziges herausragendes Merkmal seiner Zusammensetzung ist der große Anteil an Polysacchariden (38 %), für die jedoch in der Literatur keine Hinweise auf eine Modulation der GSH-Synthese oder der GSH-Adduktbildung zu finden sind. Des Weiteren fanden Barth et al. in Fütterungsstudien an Ratten keinen signifikanten Einfluss von Zellwand-Polysacchariden auf die Genexpression von γGCL (GSH-Synthese) bzw. GST-P und GST-M2 (GSH-Addukt-Bildung) in Kolon-Mukosa-Zellen [Barth et al., 2007; Barth et al., 2005]. Auch Glei et al.

konnten keinen Einfluss von Polysacchariden (unfermentierte Arabinoxylane) auf die Aktivität der GST in HT-29 Zellen feststellen [Glei et al., 2006], so dass ein Einfluss der in den Extrakten enthaltenen Kohlenhydrate auf den GSH-Spiegel der Caco-2 Zellen eher unwahrscheinlich ist.

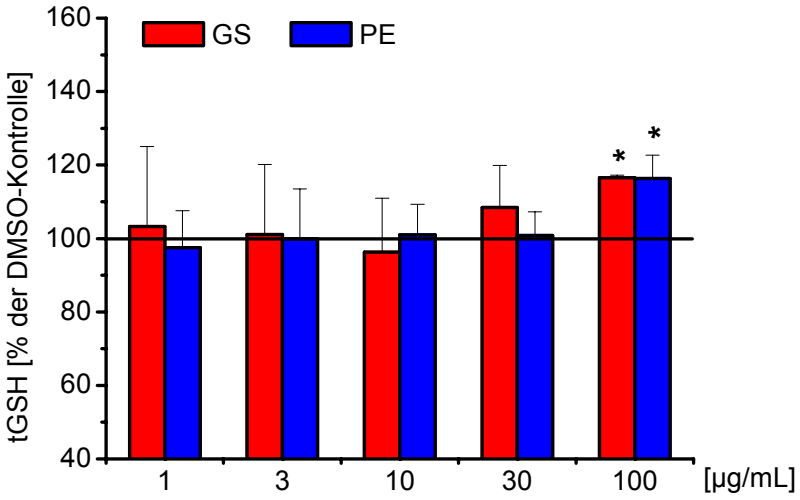


Abbildung 4.4: tGSH-Spiegel in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Apfelschalenextrakten. MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur Lösungsmittel-Kontrolle (0,1 % DMSO): *p<0,05

Die beobachtete Erhöhung durch AE06 und AE07 könnte auf deren hohen Gehalt an oligomeren Procyanidinen zurückzuführen sein: AE06 enthält 57 % und AE07 48,3 % dieser Verbindungen. Auch bei [Schäfer, 2006] wurde eine Induktion des tGSH-Spiegels durch die Procyanidin-reichen Extrakte AE02 (36 %) und AE03B (46 %) beobachtet. Inkubation mit Apfelschalenextrakten führte zu einer signifikanten Erhöhung des tGSH-Spiegels durch die beiden Extrakte GS und PE (Abbildung 4.4). Doch während PE den GSH-Level nur bei 100 µg/mL induzierte zeigte sich diese Erhöhung durch GS auch bei 30 µg/mL. Wie bei den oben dargestellten Apfelsaftextrakten sind auch hier die Procyanidin-Gehalte der beiden Extrakte relativ hoch (GS: 44 %; PE 43 %).

Da alle Extrakte, die einen hohen Anteil von Procyanidinen enthielten auch eine Erhöhung des GSH-Levels bewirkten, könnte ein Einfluss dieser Substanzen möglich sein. Dies wird bekräftigt durch die beobachtete starke Erhöhung des GSH-Spiegels (Faktor 4,9 – 13) von B16 Zellen (Melanomzellen) nach Inkubation mit oligomeren Procyanidinen (5 – 50 µg/mL; mittlerer Polymerisierungsgrad 3,3) [Kim und Yokozawa, 2009] bzw. durch Procyanidin B_4 in Herzzellen [Du et al., 2007]. Der beobachtete Effekt der Schalenextrakte könnte auch auf deren hohen Gehalt an Flavonolen zurückzuführen sein. Auch AE03B, der bei Schäfer et al. eine Erhöhung des tGSH-Spiegels bewirkte, enthielt größere Mengen dieser Verbindungen (ca. 11 %) [Schäfer et al., 2006a]. In Caco2-, HT-29- und

HepG2-Zellen konnte eine Steigerung des GSH-Gehaltes nach Inkubation mit Quercetin beobachtet werden [Schäfer et al., 2006a; Scharf et al., 2003].

4.1.4. Modulation ROS-induzierter DNA-Schäden

Die Modulation Menadion (Md)-induzierter DNA-Schäden durch Inkubation von Caco-2 Zellen mit Apfelsaft- und Schalenextrakten wurde mittels Comet Assay untersucht. Zur Unterscheidung zwischen Strangbrüchen und oxidativen DNA-Veränderungen wurden alle Proben zusätzlich einer Post-Inkubation mit dem Reparatur-Enzym FPG unterzogen (siehe Abschnitt 3.7.6). Die Ergebnisse des Comet Assay sind im Vergleich zur Md-behandelten Kontrolle (= 100 %) dargestellt, die absoluten Werte der Negativkontrolle (C_0) betrugen 1,0 % (- FPG) und 1,8 % (+ FPG), die der Md-Kontrolle lagen bei 5,2 % (- FPG) und 10,3 % (+ FPG).

Wie bei den anderen Markern veränderte die Inkubation mit AEs Md-induzierte DNA-Strangbrüche in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 4.5). Dabei zeigte sich die beste Wirksamkeit der Extrakte vor allem in niedrigeren Konzentrationen: Inkubation mit AE05 und AE06B in Konzentrationen von 1 – 10 µg/mL bzw. 1 – 30 µg/mL führte zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Schäden. Die schlechtere Wirksamkeit der Extrakte in höheren Konzentrationen beobachteten auch [Schäfer et al., 2006a], deren Extrakte eine U-förmige Konzentrations-Wirkungskurve aufwiesen. Auch durch AE06 (1 – 3 µg/mL) ließen sich Md-induzierte DNA-Schäden signifikant senken; höhere Konzentrationen (>3 µg/mL) zeigten einen signifikanten Anstieg (auch AE05 zeigte in der höchsten untersuchten Konzentration eine leichte Erhöhung der DNA-Schäden über die Kontrolle). AE07, der die besten Effekte bei der Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels und bei der Induktion des GSH-Spiegels zeigte, war hier am wenigsten wirksam. Lediglich bei 30 µg/mL war eine signifikante Reduktion Md-induzierter DNA-Strangbrüche zu beobachten.

Die Inkubation von Caco-2 Zellen mit Apfelschalenextrakten führte ebenfalls zu einer Verringerung von Md-induzierten Strangbrüchen. GS reduzierte die Strangbrüche über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 1 – 100 µg/mL, mit einem Wirkmaximum bei 3 µg/mL. Im Vergleich dazu war PE weniger effektiv, maximale Reduktion der Strangbrüche konnte bei 10 µg/mL beobachtet werden; der effektive Konzentrationsbereich umfasste 3 – 30 µg/mL. In der höchsten untersuchten Konzentration trat bei PE-Inkubation, ebenso wie bei AE05 und AE06, eine Steigerung der DNA-Schäden auf, die signifikant über die Md-Kontrolle hinausging.

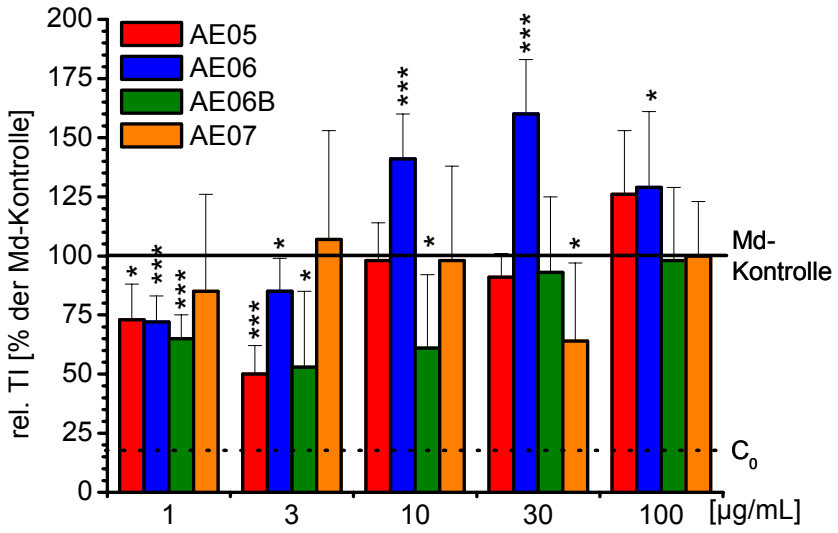


Abbildung 4.5: Modulation Md-induzierter DNA-Strangbrüche durch 24h Inkubation mit AEs. MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. C_0: Lösungsmittelkontrolle ohne Md. Signifikanter Unterschied zur Md-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

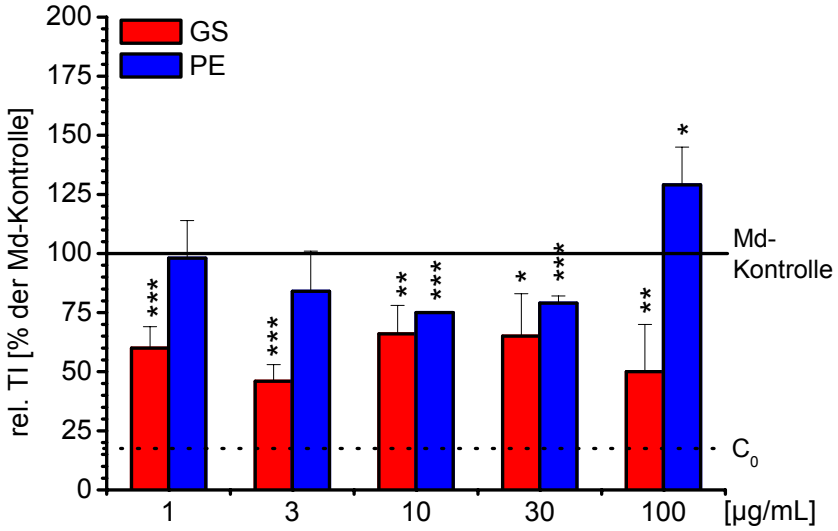


Abbildung 4.6: Modulation Md-induzierter DNA-Strangbrüche durch 24h Inkubation mit Apfelschalenextrakten. MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. C_0: Lösungsmittelkontrolle ohne Md. Signifikanter Unterschied zur Md-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Die starke Wirkung von PE und GS könnte an deren hohen Gehalten an Quercetin-Glykosiden liegen, die 9,6 bzw. 16 % der Extrakte ausmachen. Auch AE03 (12 % Quercetin-Glykoside) zeigte in Caco-2 Zellen eine signifikante Verringerung der Gesamt-DNA-Schäden [Schäfer, 2006]. Die protektive Wirkung von Quercetin und seinen

Glykosiden gegen oxidative DNA-Schäden wurde mehrfach belegt [Aherne und O'Brien, 2000; Schäfer et al., 2006a; Schäfer et al., 2006b]. Dies erklärt nicht die beobachteten Wirkungen der anderen AEs, deren Gehalt an Flavonolen deutlich geringer ist (<2 %); jedoch konnten Schäfer et al. zeigen, dass auch andere Apfelsaft-Polyphenole (Pt, Epi, CaA) Gesamt-DNA-Schäden konzentrationsabhängig verringern können [Schäfer et al., 2006a].

Neben den Md-induzierten DNA-Strangbrüchen wurde auch die Modulation der Gesamt-DNA-Schäden (Strangbrüche + oxidative DNA-Modifikationen), die durch zusätzliche Inkubation mit dem Reparaturenzym FPG erkannt werden können, untersucht.

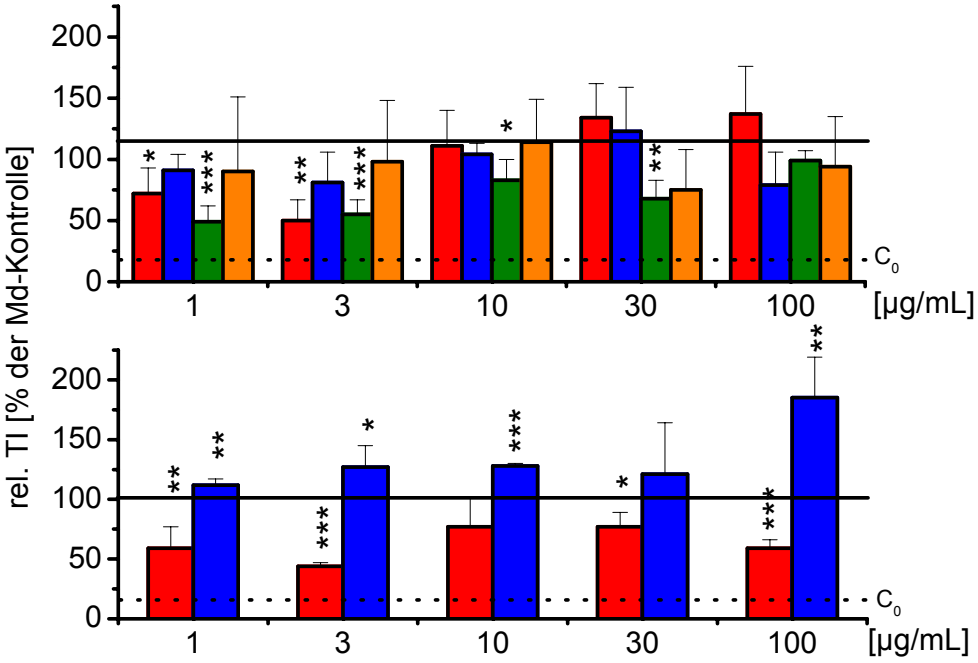


Abbildung 4.7: Modulation Md-induzierter Gesamt-DNA-Schäden durch 24h Inkubation mit AEs (oben) bzw. Apfelschalenextrakten (unten). MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. C_0: Lösungsmittelkontrolle ohne Md. Signifikanter Unterschied zur Md-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Die Ergebnisse (siehe Abbildung 4.7) zeigten, dass die Konzentrations-Wirkungskurven der Gesamt-Schäden nahezu deckungsgleich mit denen der DNA-Strangbrüche waren. Die beste Wirksamkeit zeigte wieder AE06B der, anders als bei den Versuchen ohne FPG, auch bei 100 µg/mL eine leichte (wenn auch nicht signifikante) Reduktion der Gesamt-Schäden bewirkte. Auch AE05 und AE06 waren vor allem in niedrigen Konzentrationen wirksam, während AE07 die geringste Wirksamkeit zeigte. Anders als bei den Versuchen ohne FPG war die prooxidative Wirksamkeit der AEs weniger ausgeprägt, wie sich an AE06 zeigt, dessen Werte die der Md-Kontrolle nicht mehr überstiegen. Bei den Schalenextrakten war GS besser wirksam als PE; die oben beobachtete Reduktion

der DNA-Strangbrüche war hier nicht mehr sichtbar, vielmehr kam es über den gesamten Konzentrationsbereich zu einem Anstieg der Schäden über das Maß der Md-Kontrolle hinaus, was für ein übermäßiges Ansteigen oxidativer DNA-Modifikationen durch PE-Inkubation spricht. Bei den anderen Extrakten lag deren Anteil an den Gesamt-DNA-Schäden immer bei ungefähr 50 %.

4.1.5. Modulation der SOD1-Expression

Die Modulation der Proteinexpression des antioxidativen Enzyms SOD1 in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit Apfelsaftinhaltsstoffen wurde mittels Western Blot durchgeführt. Dieses Isoenzym wurde gewählt, da es im Vergleich zu anderen Isoformen (siehe Abschnitt 3.3.1.3) in Caco-2 Zellen deutlich stärker exprimiert wird [Kameoka et al., 1999]. Da der SOD1 eine wichtige Aufgabe bei der zellulären antioxidativen Abwehr zukommt, könnte eine Modulation ihrer Expression durch phenolische Apfelsaftextrakte wertvolle Hinweise auf den Wirkmechanismus dieser Substanzen geben.

Die Modulation der Proteinexpression durch die Extrakte wurde nach 24h Inkubation an Caco-2 Zellen beobachtet. Die untersuchten Extrakte wurden auf Grund ihres hohen Anteils an Extrakt-Inhaltsstoffen ausgewählt, die Extrakte enthielten entweder größere Mengen an Quercetin-Glykosiden (AE03B, GS, PE), Dihydrochalconen (AE02, AE03B), Hydroxyzimtsäuren (AE01, AE02, AE07), oligomeren Procyanidinen (AE03B, AE07) bzw. Kombinationen daraus.

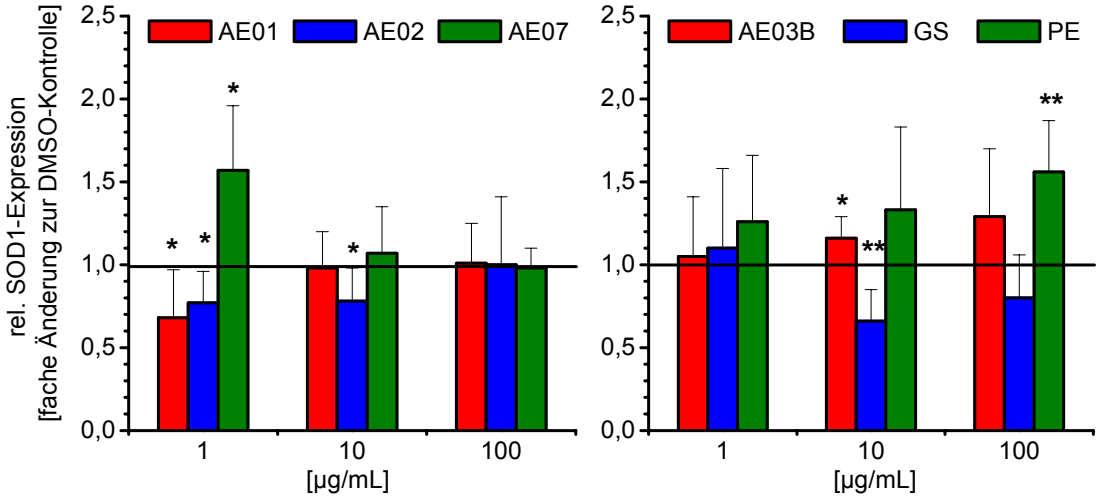


Abbildung 4.8: Modulation der SOD1-Expression in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Apfelsaft- (AE) bzw. Apfelschalenextrakten (GS, PE). MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur Lösemittelkontrolle (0,1 % DMSO): *p<0,05 **p<0,01

Die Ergebnisse (Abbildung 4.8) zeigten eine nur leichte Modulation der SOD1-Expression durch die verwendeten Extrakte; sie bewegen sich alle im Bereich der 0,5 – 1,5-fachen Expression der DMSO-Kontrolle. Auch [Kameoka et al., 1999] fanden keine signifikante Modulation der SOD-Protein-Expression in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit Flavon, Kaempferol oder Quercetin; ebenso [Ying et al., 2004], die die SOD1-Proteinexpression von Endothel-Zellen durch Polyphenole (Catechin-/Thearubigin-reiche Extrakte aus grünem bzw. schwarzem Tee) untersuchten. Analog zur Expression wurde auch die SOD-Aktivität in Caco-2 Zellen (die begleitend im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde) durch AEs kaum moduliert [Cullmann, 2009].

Ein Einfluss des Hydroxyzimtsäure-Gehaltes auf die Expression war nicht erkennbar, die Phenolsäure-reichen Extrakte AE01, 02 und 07 zeigten divergierende Ergebnisse: während nur 1 µg/mL AE07 eine signifikante Steigerung des zellulären SOD1-Gehaltes bewirkte, führte die gleiche Menge AE01 bzw. AE02 zu einer signifikanten Verringerung der Expression. Auch die Quercetin-Glykosid-reichen Extrakte (AE03B, GS, PE) verhielten sich unterschiedlich; der konzentrationsabhängigen Erhöhung durch AE03B und PE stand die signifikante Verringerung des SOD1-Gehaltes durch GS gegenüber, welcher von allen drei Extrakten die höchste Flavonol-Konzentration aufweist. Auch die SOD1-Expression nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit den Dihydrochalcon-reichen Extrakten AE02 und AE03B (9 bzw. 11 %) zeigte keine Gemeinsamkeiten. Die SOD-Aktivität wurde in Caco-2 Zellen [Cullmann, 2009] durch Flavonole und Hydroxyzimtsäuren induziert, durch Dihydrochalcone konzentrationsabhängig depletiert. Unter Berücksichtigung der vorhandenen Ergebnisse kann noch nicht abschließend gesagt werden, welche Extrakt-Inhaltstoffe für eine Induktion der SOD verantwortlich sein könnten; eventuell könnten synergistische Effekte eine Rolle spielen.

4.1.6. Antioxidative Wirksamkeit ausgesuchter Apfelsaft-Polyphenole

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgesuchte Leitsubstanzen der Apfelsaftextrakte mit neu etablierten Markern antioxidativer Wirksamkeit untersucht, um deren Beteiligung an der beobachteten Wirksamkeit von Apfel-Extrakten abzuschätzen.

4.1.6.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (ORAC)

Die antioxidative Wirksamkeit wurde mit dem neu etablierten ORAC-Assay zusätzlich zum TEAC-Assay gemessen, um den Einfluss der beiden wichtigsten antioxidativen Mechanismen in die Bewertung der Polyphenole einbeziehen zu können (siehe Abschnitt 3.7.10).

Tabelle 4.3: ORAC- und TEAC-Werte von Apfelsaft-Polyphenolen/Aglyka. MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten.

Substanz	ORAC [mmol/L Trolox] [a)]		TEAC [mmol/L Trolox] [a)]	
(-)-Epicatechin	3,86	± 0,19	3,2	± 0,2 [b)]
Phloretin	4,05	± 0,17	3,8	± 0,2 [b)]
Phloridzin	5,36	± 0,30	3,6	± 0,2 [b)]
Chlorogensäure	4,19	± 0,12	1,3	± 0,1 [b)]
Kaffeesäure	4,25	± 0,15	1,3	± 0,0 [b)]
p-Cumarsäure	4,55	± 0,18	2,9	± 0,5
Quercetin	6,91	± 0,61	4,8	± 0,1 [b)]
Rutin	5,51	± 0,09	3,7	± 0,1 [b)]

[a)] Konzentration (in mmol/L) einer Trolox-Lösung derselben antioxidativen Wirksamkeit wie eine 1millimolare Lösung der Testsubstanz

[b)] nach Schäfer et al. [Schäfer et al., 2006a]

Die Ergebnisse des ORAC-Assays zeigten eine deutliche antioxidative Kapazität aller untersuchten Polyphenole mit ORAC-Werten im Bereich von 3,9 – 6,9 mmol/L Trolox, wobei die antioxidative Kapazität in folgender Reihenfolge abnahm:

Que > Rut > Pz > CuA > CaA > ChA > Pt > Epi

Die höchsten ORAC-Werte erreichten die beiden Flavonole (Que, Rut), gefolgt von Pz und den Hydroxyzimtsäurederivaten (CuA, CaA, ChA); die kleinsten Werte lieferten Pt und Epi. Vergleicht man die ORAC-Werte mit denen aus anderen Studien, so zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung zu den Literaturdaten [Davalos et al., 2004; Ou et al., 2001]. Der Vergleich mit den von Schäfer et al. ermittelten TEAC-Werten [Schäfer et al., 2006a] zeigte, mit Ausnahme von Pt und Epi, die selbe Reihenfolge wie bei den ORAC-Werten:

Que > Pt > Rut > Pz > Epi > CuA > CaA ≈ ChA

Im Gegensatz zu den Apfelsaftextrakten zeigte sich bei den Einzelsubstanzen ein leichter Zusammenhang zwischen ORAC- und TEAC-Werten (R = 0,658), auch wenn beide Assays auf unterschiedlichen Mechanismen basieren. Jedoch können die Ergebnisse der Einzelsubstanzen nicht direkt auf die Extrakte übertragen werden, da bei den Extrakten synergistische und antagonistische Effekte der Polyphenole eine Rolle spielen können, was für Lebensmittelinhaltsstoffe beschrieben ist [de Kok et al., 2008; Schäfer et al., 2006b].

4.1.6.2. Modulation der SOD1-Expression

Die Modulation der SOD1-Proteinexpression in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit Apfelsaftinhaltsstoffen wurde mittels Western Blot durchgeführt. SOD1 wurde gewählt, da sie im Vergleich anderen Isoformen in Caco-2 Zellen deutlich stärker exprimiert wird [Kameoka et al., 1999].

Die stärkste Expression wurde durch das Dihydrochalcon Phloretin (Pt) erzielt, wobei niedrige Konzentrationen eine stärkere Expression der SOD1 bewirkten (Abbildung 4.9, rechts). Die Inkubation mit seinem Glucosid Phloridzin (Pz) zeigte mit einer Erhöhung auf die 1,4-fache Expression einen ebenfalls deutlichen Effekt. Auch Yang et al. beobachteten eine Erhöhung der SOD-Aktivität nach Inkubation von Rattenleber-Homogenat mit Pz [Wu et al., 2004].

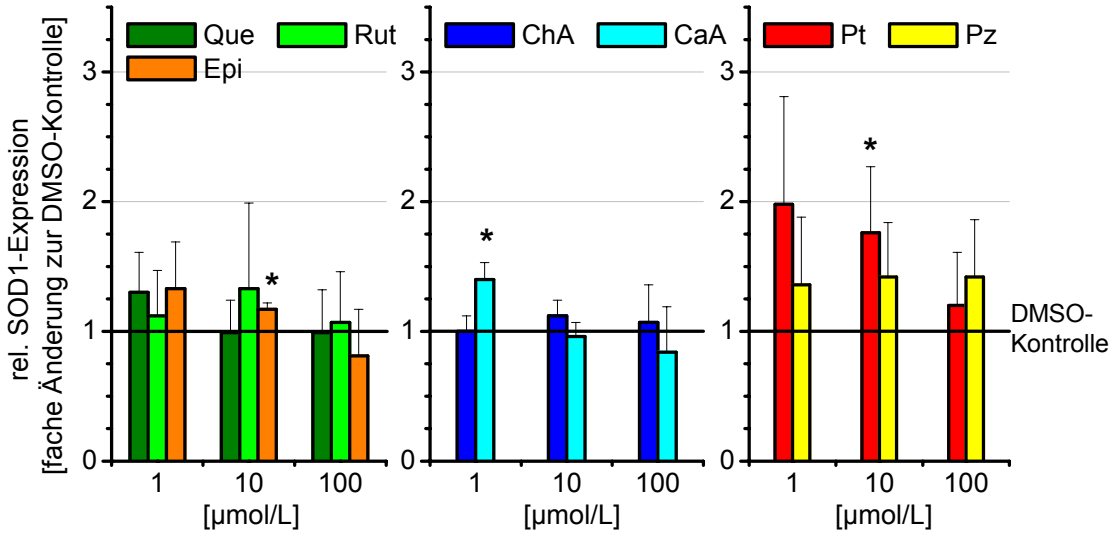


Abbildung 4.9: Modulation der SOD1-Expression in Caco-2 Zellen nach 24h-Inkubation mit Polyphenolen/Aglyka. MW + SD aus n=3-6 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur DMSO-Kontrolle: *p<0,05

Die Flavonoide (Que, Rut, Epi; Abbildung 4.9 links) erhöhten die SOD1-Konzentration leicht; 1 µmol/L führte zu einer ca. 1,3-fachen Expression, während bei höheren Konzentrationen keine Induktion der SOD1 beobachtet wurde. Dies konnten auch Kameoka et al. sehen, die nach Inkubation von 100 µmol/L Que keine signifikanten Effekte auf die Cu/Zn-SOD feststellen konnten [Kameoka et al., 1999]. Während ChA keine Änderung der Expression bewirkte, zeigte sich bei CaA (1 µmol/L) eine signifikante Erhöhung der Expression um den Faktor 1,4. Die Ergebnisse deuten eine leichte Induktion der SOD1-Expression durch Apfelsaft-Polyphenole v.a. in niedrigen Konzentrationen (1 – 10 µmol/L) an.

Ähnliches fanden auch Ying et al. nach Inkubation von Endothel-Zellen mit Polyphenolgemischen aus grünem und schwarzem Tee, die vor allem Procyanidine bzw. Thearubigine enthielten. Hier bewirkte der thearubiginreiche Extrakt aus schwarzem Tee eine leichte Steigerung der SOD-Expression, die bei steigenden Konzentrationen wieder abnahm; eine Induktion durch den Flavanol- und Procyanidin-reichen Extrakt aus grünem Tee konnte nicht gezeigt werden [Ying et al., 2004].

4.1.7. Zusammenfassung zur Wirksamkeit phenolischer Apfel-Extrakte und ausgewählter Polyphenole

Alle untersuchten Extrakte zeigten alle eine protektive Wirksamkeit gegen oxidative Zellschäden; dabei waren deutliche Unterschiede zwischen der Wirksamkeit zu erkennen.
Die zellfreie antioxidative Kapazität war bei allen Extrakten stark ausgeprägt, mit Werten von 4,5 – 6,9 mmol/L Trolox (ORAC) und 3,4 – 6,5 mmol/L (TEAC). Durch Korrelationsberechnungen wurde versucht, die für die antioxidative Wirksamkeit der Extrakte verantwortlichen Inhaltsstoffe bzw. Stoffgruppen zu ermitteln. Hier zeigte sich, dass der TEAC-Wert der Extrakte vor allem vom Gehalt an oligomeren Procyanidinen und Flavanolen abhängt, während der ORAC vor allem durch die Gesamtmenge der Polyphenole (ohne Procyanidine) beeinflusst wurde. Es konnte gezeigt werden, dass auch die mengenmäßig größten Polyphenol-Gruppen (Hydroxyzimtsäuren und Dihydrochalcone) einen gewissen Einfluss auf diesen Marker ausüben.
Die Untersuchung der antioxidativen Kapazität ausgewählter Leitsubstanzen zeigte für alle Polyphenole eine deutliche antioxidative Wirksamkeit (ORAC) im Bereich von 3,1 – 5,9 mmol/L Trolox. Schäfer et al. fanden für diese Substanzen TEAC-Werte im Bereich 1,3 – 4,8 mmol/L Trolox [Schäfer et al., 2006a]. In beiden Assays wiesen die Flavonole die höchsten Werte auf. Die Hydroxyzimtsäurederivate zeigten im ORAC-Assay eine bessere Wirksamkeit als beim TEAC, während Epicatechin und Phloretin im Vergleich zu den anderen untersuchten Polyphenolen im TEAC-Assay bessere Ergebnisse lieferten. Die bei den Apfel-Extrakten nicht vorhandene Korrelation zwischen TEAC- und ORAC-Werten war hier deutlich zu erkennen.
Der TBH-induzierte ROS-Level in Caco-2 Zellen wurde durch die Extrakte unterschiedlich verringert. Während AE07 und der Schalenextrakt GS über die gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (0,3 – 100 µg/mL) eine signifikante Abnahme bewirkten, war AE05 kaum wirksam. Auch oxidative DNA-Schäden wurden durch GS am besten verringert, gefolgt von PE und dem Tresterextrakt AE06B. Die AEs zeigten die geringste Wirksamkeit, hier zeigte sich sogar eine Zunahme der DNA-Strangbrüche durch AE06.

Der tGSH-Spiegel wurde durch Inkubation mit den Extrakten nur mäßig moduliert; lediglich in den höchsten Konzentrationen der Extrakte AE07, GS und PE zeigten sich teilweise signifikante Effekte, die auf deren hohen Anteil an oligomeren Procyanidinen zurückgeführt werden könnten, deren induzierende Wirkung des GSH-Spiegels dokumentiert ist [Du et al., 2007; Kim und Yokozawa, 2009]. Die gute Wirksamkeit der beiden Apfelschalenextrakte GS und PE könnte auch auf deren hohen Gehalt an Quercetin-Glykosiden zurückzuführen sein, der weit über dem der untersuchten AEs lag. Eine ähnliche Zusammensetzung wie die Schalenextrakte zeigte auch der von Schäfer et al. untersuchte Tresterextrakt AE03B mit einem Flavonol-Anteil von 11,6 % [Olk et al., 2006-2009, pers. Mitteilung], der unter den selben Bedingungen sowohl eine Reduktion des zellulären ROS-Levels als auch der Md-induzierten Gesamt-DNA-Schäden bewirkte [Schäfer et al., 2006a]. Das Aglykon Quercetin ist auf Grund seiner hohen antioxidativen Kapazität gut untersucht und führt in Caco-2 Zellen zu einer Zunahme des tGSH-Spiegels sowie einer Reduktion von ROS-Level und DNA-Schäden [Aherne und O'Brien, 2000; Schäfer et al., 2006a].

Die Expression des antioxidativen Enzyms SOD1 wurde vor allen Dingen durch Dihydrochalcone (Pt und Pz) induziert. Auch Flavonoide (Que, Rut, Epi) steigerten die SOD1-Expression, wenn auch nicht in dem Maße wie Pt oder Pz. Für alle Substanzen wurde eine induzierende Wirkung vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich gefunden. Die Apfelextrakte bewirkten allenfalls eine mäßige Erhöhung der SOD1-Konzentration, ein Einfluss bestimmter polyphenolischer Inhaltsstoffe war nicht zu erkennen.

4.2. Charakterisierung und antioxidative Wirksamkeit intestinaler Polyphenol-Abbauprodukte in fermentierten AEs

Um den Einfluss des intestinalen Metabolismus auf die antioxidative Wirksamkeit der AEs *in vivo* besser abschätzen zu können wurden in der Arbeitsgruppe Pool-Zobel an der Friedrich Schiller-Universität Jena zwei AEs einer anaeroben Fermentation mit Darmbakterien unterzogen.

Die Fermentationsdauer betrug 24h, zusätzlich wurde ein Teil der AEs nur für 6h fermentiert, um die Bildung von Zwischenprodukten zu prüfen. Für jede Fermentationsdauer wurde eine Kontrolle (FS Blank, ohne AE fermentiert) mitgeführt, um den Einfluss fäkaler Bestandteile abschätzen zu können. Die Prüfung auf phenolische Extrakt-Inhaltsstoffe (Tabelle 4.4, durchgeführt von Bastian Knaup, Universität Würzburg) ergab, dass bereits nach 6h über 99,5 % der in den AEs enthaltenen Polyphenole abgebaut waren. Bei der 24h dauernden Fermentation lag der Abbau der Apfelsaft-

Polyphenole sogar bei über 99,9 %. In den Kontrollen, die ohne AE fermentiert wurden (F-Blank) konnten weder nach 6h noch nach 24h Fermentation Polyphenole identifiziert werden [Knaup und Schreier, 2006, pers. Mitteilung].

Tabelle 4.4: Phenolische Inhaltsstoffe der fermentierten AEs (F-AEs) nach 6h bzw. 24h Fermentationsdauer. Vergleichend sind die Werte der unfermentierten AE03 und AE04 angegeben. Alle Werte in mg/g, bei Verwendung von 10 mg AE/mL für die Fermentation. [Bellion, 2006; Knaup und Schreier, 2006, pers. Mitteilung]

	AE03	F-AE03		AE04	F-AE04	
		6 h	24 h		6 h	24 h
Procyanidin B1	6,2	0,14	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Catechin	2,7	0,01	0,04	n.n.	0,01	n.n.
Procyanidin B2	18,4	0,06	0,02	12,1	n.n.	n.n.
Epicatechin	17,7	0,02	n.n.	12,5	n.n.	n.n.
Phloretin-2-xyloglucosid	31,7	0,29	0,04	68,9	0,08	n.n.
Phloridzin	78,9	0,10	n.n.	48,0	0,01	0,001
Chlorogensäure	19,2	n.n.	n.n.	183,2	0,05	n.n.
Kaffeesäure	4,0	n.n.	n.n.	7,5	0,03	0,001
3-Cumaroylchinasäure	3,0	n.n.	n.n.	9,4	0,02	n.n.
4-Cumaroylchinasäure	5,0	n.n.	n.n.	66,0	n.n.	n.n.
5-Cumaroylchinasäure	3,8	n.n.	n.n.	39,8	n.n.	n.n.
p-Cumarsäure	4,2	n.n.	n.n.	2,6	n.n.	n.n.
Quercetin-3-rutinosid	49,1	0,51	n.n.	4,5	n.n.	n.n.
Quercetin-3-galactosid	8,1	n.n.	n.n.	1,8	n.n.	n.n.
Quercetin-3-glucosid	12,3	0,11	n.n.	1,5	n.n.	n.n.
Quercetin-3-xylosid	18,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Quercetin-3-arabinosid	3,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Quercetin-3-rhamnosid	25,1	0,25	0,003	4,3	n.n.	n.n.
Summe Polyphenole	311,0	1,48	0,10	478,2	0,196	0,002

n.n. nicht nachweisbar

Die entstandenen wässrigen Fermentationsüberstände der AEs (F-AEs) wurden im Rahmen einer Diplomarbeit [Bellion, 2006], analog zu den unfermentierten AEs, mit Markern antioxidativer Wirksamkeit und oxidativer Zellschädigung untersucht. Trotz des weitgehenden Abbaus der Extraktinhaltsstoffe zeigten sowohl die 6h als auch die 24h fermentierten F-AEs eine deutliche antioxidative Wirksamkeit (>2 mmol/L Trolox) im TEAC-Assay. Auch der zelluläre, TBH-induzierte ROS-Level von Caco-2 Zellen konnte

durch Inkubation mit den F-AEs in Konzentrationen ≥0,05 % (entsprechend 5 µg AE/mL) signifikant gesenkt werden [Bellion, 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurden die F-AEs mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS auf die Anwesenheit phenolischer Abbauprodukte untersucht, da bekannt ist, dass Flavonoide und andere Polyphenole als Substrat der mikrobiellen Darmflora dienen [Rechner et al., 2004] und durch diese abgebaut werden können. Um die Beteiligung phenolischer Abbauprodukte an der antioxidativen Wirksamkeit der F-AEs zu klären wurden die identifizierten Abbauprodukte in Caco-2 Zellen auf ihre Fähigkeit zur Verringerung oxidativer Zellschäden geprüft.

4.2.1. Charakterisierung phenolischer Abbauprodukte

Die Ergebnisse zeigten für beide F-AEs eine deutliche Abnahme der Ausgangsverbindungen und das Auftreten von Abbauprodukten bereits nach 6h Fermentation. Nach 24h Fermentation waren, wenn überhaupt, praktisch nur noch Abbauprodukte identifizierbar.

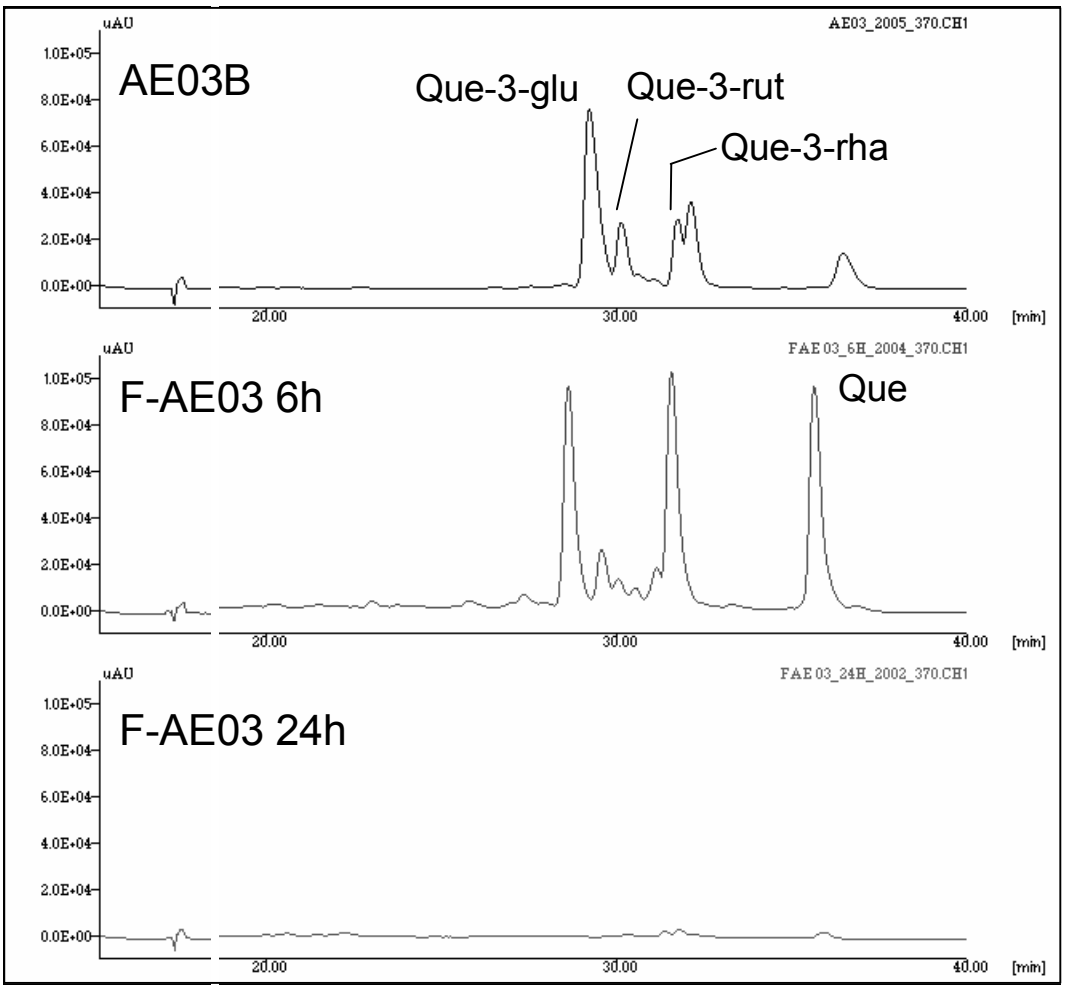


Abbildung 4.10: HPLC-Chromatogramm (370 nm) von AE03B (oben), F-AE03 6h (Mitte) und F-AE03 24h (unten), mit Zuordnung der (mittels externer Standards) identifizierten Peaks.

Abbildung 4.10 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm von AE03B, F-AE03 6h (nach 6h Fermentation) und F-AE03 24h (nach 24h Fermentation) bei 370 nm, der charakteristischen Absorptions-Wellenlänge der Flavonol-Struktur (siehe Abbildung 3.13, Seite 43). Gut zu erkennen sind die Peaks der jeweiligen Quercetin-Glykoside in AE03B (Abbildung 4.10 oben). Nach 6h Fermentation (F-AE03 6h, Abbildung 4.10 Mitte) waren diese Peaks nicht mehr zu sehen, dafür zeigte das Chromatogramm einen neuen Peak bei einer späteren Retentionszeit, der als Quercetin identifiziert werden konnte. Die anderen Signale zwischen 28 – 32 min konnten auf Grund fehlender Standards nicht sicher zugeordnet werden. In F-AE03 24h (Abbildung 4.10 unten) waren bei einer Wellenlänge von 370 nm fast keine Peaks mehr zu sehen, d.h. dass für diese Absorption notwendige Strukturelement (Flavonol-Struktur) war zu dieser Zeit nahezu vollständig abgebaut. Auch bei den anderen Apfelsaft-Polyphenolen konnte ein ähnlicher Abbau beobachtet werden. Neben den Aglyka Quercetin (Que) und Phloretin (Pt) konnten vor allem phenolische Säuren wie Dihydrokaffeesäure (DHCaA), 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DHPAA) oder 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure (4HPPA) sowie Phloroglucinol (PG) identifiziert werden. Die Entstehung der Abbauprodukte ist in Abschnitt 3.4.2.5 ausführlich dargestellt.

Die Konzentration von fünf Abbauprodukten konnte mittels HPLC-DAD quantifiziert werden (siehe Tabelle 4.5). Es dominierten DHCaA und 4HPPA, gefolgt von PG; Que und DHPAA wurden nur in kleineren Mengen gefunden. Obwohl die Konzentration von ChA in AE03 relativ gering ist (19,2 mg/g), fanden sich in F-AE03 recht hohe Mengen an 4HPPA, die im selben Bereich lagen wie die in F-AE04. Da dieser wesentlich mehr ChA enthielt (183 mg/g), stammte die entstandene 4HPPA in F-AE03 wahrscheinlich aus dem Abbau von Phloretinglykosiden, welche sich in AE03 und AE04 in ähnlicher Menge fanden (110,6 bzw. 116,9 mg/g). Die nachgewiesenen Substanzen reflektierten das Polyphenol-Muster der jeweiligen AEs recht gut. So wurden z.B. nur in F-AE03 Abbauprodukte von Quercetinglykosiden (wie Que und DHPAA) identifiziert, die im AE03 im Vergleich zu AE04 in besonders hoher Konzentration enthalten waren. Im F-AE04 dagegen fanden sich größere Mengen von DHCaA, die wahrscheinlich aus Chlorogensäure, dem Hauptbestandteil des AE04, gebildet wurde. PG, welches als Abbauprodukt von Flavonoiden und Dihydrochalconen beschrieben ist [Rechner et al., 2004; Schäfer, 2006], konnte in allen F-AEs identifiziert werden.

Tabelle 4.5: Quantifizierung der Abbauprodukte in F-AE03 und F-AE04 mittels HPLC-DAD; Angaben in mg/g unfermentierter AE; n.n. nicht nachweisbar

		F-AE03		F-AE04	
		6h	24h	6h	24h
Phloroglucinol	PG	5,2	9,9	8,7	<1,25
Dihydrokaffeesäure	DHCaA	6,4	12,0	39,3	76,4
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	4HPPA	28,9	53,6	20,9	42,5
Quercetin	Que	1,8	n.n.	n.n.	n.n.
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure	DHPAA	0,8	0,9	n.n.	n.n.

Die Ergebnisse der HPLC-ESI-MS Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein der bereits zuvor identifizierten Ausgangssubstanzen (Tabelle 4.4 [Knaup und Schreier, 2006, pers. Mitteilung]) sowie der mittels HPLC-DAD nachgewiesenen Abbauprodukte (Tabelle 4.5). Des Weiteren konnten in den F-AEs noch weitere phenolische Substanzen nachgewiesen werden, die als Abbauprodukte von Apfelsaft-Polyphenolen gelten (Tabelle 4.6). In allen F-AEs fanden sich die Säuren 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA, Protocatechusäure), 3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure (3HPPA) und 3-Phenylpropionsäure (PPA).

3HPPA und PPA sind bekannte Abbauprodukte, die aus dem Abbau von Hydroxyzimtsäuren wie DHCaA [Rechner et al., 2002] oder von Flavonoiden [Labib et al., 2004] entstehen. DHBA konnte dagegen in *in vitro*-Fermentationsexperimenten noch nicht nachgewiesen werden; es wurde bisher lediglich als Metabolit im Urin [Olthof et al., 2003] bzw. in Fäzeswasser [Jenner et al., 2005] beobachtet. Für DHBA sind antioxidative [Tseng et al., 1996] und wachstumshemmende Effekte [Mori et al., 1999] beschrieben. Im Gegensatz zu den oben genannten Substanzen fand sich 4-Methylcatechol (4MC) nur nach einer Fermentationsdauer von 24h, nicht aber nach 6h. Dies deutet darauf hin, dass 4MC erst als sekundäres Abbauprodukt entsteht. Das Auftreten von 4MC beim intestinalen Abbau von Flavonoiden wurde von Labib et al. an einem Fermentationsmodell gezeigt, welches Mikroorganismen des Schweine-Blinddarms zur Fermentation verwendet [Labib et al., 2004], aber bisher nicht in einem Modell mit humanen Darmbakterien.

Tabelle 4.6: Abbauprodukte von AE-Inhaltsstoffen in F-AE03 und F-AE04, identifiziert mittels HPLC-ESI-MS. + identifiziert; - nicht identifiziert. RT: Retentionszeit; m/z: Masse-Ladungsverhältnis der detektierten Ionen.

Substanz	RT	m/z	F-AE03		F-AE04	
	[min]	$[M-H]^-$	6h	24h	6h	24h
Que [a)]	38,9	301	+	-	-	-
CaA	18,8	179	-	-	+	-
CuA	23,3	163	-	-	+	-
Pt	39,9	273	+	-	+	-
Cat	15,7	289	+	-	-	-
Epi	20,3	289	+	-	-	-
PG	06,3	125	+	+	+	+
4MC	17,2	123	-	+	-	+
3,4DHBA	11,3	153	+	+	+	+
3,4DHPAA	11,7	168	+	+	-	-
PPA	30,6	149	+	+	+	+
4HPPA	19,7	165	+	+	+	+
3HPPA	21,9	165	+	+	+	+
DHCaA	15,2	181	+	+	+	+

[a)] Die Erklärung der Abkürzungen findet sich im Text bzw. auf Seite 4. Strukturformeln sind in Abschnitt 3.4.2.5 gezeigt.

4.2.2. Antioxidative Wirksamkeit phenolischer Abbauprodukte

Um die Beteiligung phenolischer Abbauprodukte an der antioxidativen Wirksamkeit der F-AEs zu klären wurden die identifizierten Abbauprodukte in Caco-2 Zellen auf ihre Fähigkeit zur Verringerung oxidativer Zellschäden geprüft.

4.2.2.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC)

Die zellfreie antioxidative Kapazität wurde mittels TEAC-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 dargestellt; zum Vergleich wurden die TEAC-Werte der AE-Inhaltsstoffe in die Tabelle mit aufgenommen.

Fast alle untersuchten Abbauprodukte hatten eine deutliche antioxidative Kapazität im Bereich von 1,0 – 4,8 mmol/L Trolox. Dabei wiesen die beiden Aglyka Quercetin und Phloretin mit 4,8 bzw. 3,7 mmol/L Trolox die höchsten TEAC-Werte auf. Die während des Abbaus entstehenden Hydroxyphenylpropionsäuren zeigten, ähnlich wie ihre Vorläufersubstanzen ChA und CaA eine eher moderate Wirkung im Bereich 1,1 – 1,3 mmol/L Trolox. Einzige Ausnahmen bildeten die 4-hydroxylierten Substanzen CuA und

4HPPA, deren TEAC mit 2,9 bzw. 2,7 mmol/L Trolox deutlich über dem der anderen lag. Die untersuchten Catechole (DHPAA, DHBA, 4MC) hatten bis auf DHPAA (3,2 mmol/L Trolox) eine geringe antioxidative Kapazität um 1 mmol/L Trolox.

Tabelle 4.7: TEAC-Werte von Polyphenol-Abbauprodukten. MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Die TEAC-Werte der Ausgangssubstanzen / Aglyka sind zum Vergleich mit angegeben.

Substanz		TEAC [mmol/L Trolox] [a]
Rutin	Rut	3,7 ± 0,1 [b]
Phloridzin	Pz	3,6 ± 0,4 [b]
Chlorogensäure	ChA	1,1 ± 0,3 [b]
Kaffeesäure	CaA	1,2 ± 0,2 [b]
p-Cumarsäure	CuA	2,9 ± 0,3
Quercetin	Que	4,8 ± 0,1 [b]
Phloretin	Pt	3,7 ± 0,4 [b]
Dihydrokaffeesäure	DHCaA	1,2 ± 0,2
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	4HPPA	2,7 ± 0,8
3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure	3HPPA	1,3 ± 0,2
3-Phenylpropionsäure	PPA	0,0 ± 0,0
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure	DHPAA	3,2 ± 0,4
3,4-Dihydroxybenzoesäure	DHBA	1,1 ± 0,1
4-Methylcatechol	4MC	1,3 ± 0,2
Phloroglucinol	PG	2,1 ± 0,2
(-)-Chinasäure	QiA	0,0 ± 0,0

a) Konzentration (in mmol/L) einer Trolox-Lösung derselben antioxidativen Wirksamkeit wie eine 1millimolare Lösung der Testsubstanz
b) nach [Schäfer et al., 2006a]

Interessant ist der relativ deutliche TEAC-Wert von PG mit 2,1 mmol/L Trolox. PG (1,3,5-Trihydroxybenzol) ist ausschließlich in *meta*-Position hydroxyliert und kann daher nicht, wie die *o*-Catechole, entstehende Phenolat-Anionen durch Wasserstoff-Brückenbindung der benachbarten Hydroxylgruppe stabilisieren [Amorati et al., 2007]. Die TEAC-Werte der Abbauprodukte stimmen recht gut mit Literaturangaben überein, die jedoch mit anderen Methoden generiert wurden; lediglich für 4HPPA und DHPAA wurden etwas geringere Werte berichtet [Nenadis et al., 2004; Pietta et al., 2000; Rice-Evans et al., 1996]. Die beiden Verbindungen PPA und QiA zeigten als einzige der untersuchten Substanzen keine

radikalabfangende Wirkung was auf das Fehlen einer Phenol-Struktur bei beiden Substanzen zurückgeführt wird, welches als entscheidendes Strukturelement der antioxidativen Wirksamkeit der Polyphenole angesehen wird [Rice-Evans et al., 1996].

Durch den ersten Schritt des intestinalen Abbaus, der Hydrolyse der glykosidischen Bindungen, kommt es zunächst zu einem Anstieg der antioxidativen Wirksamkeit. So lässt die freie 3-Hydroxygruppe von Quercetin, im Vergleich zu Rutin, eine bessere Mesomeriestabilisierung des Radikals zu, was zu einem höheren TEAC-Wert für Quercetin führt; das gleiche gilt für Phloretin und Phloridzin. Die Verseifung der Chlorogensäure führt zu einer minimalen Erhöhung der antioxidativen Kapazität, die jedoch nicht signifikant ist.

Im nächsten Schritt beginnt mit der Zerstörung der Flavonoid-Grundstruktur der eigentliche Abbau, der von einer Verringerung der antioxidativen Wirksamkeit begleitet ist, da die beim Abfangen von ROS entstehenden radikalischen Strukturen nicht mehr über das gesamte Flavonoid-Gerüst delokalisiert werden können: die entstehenden Abbauprodukte DHPAA, 3HPAA, DHBA, HVA und PG wiesen alle eine niedrigere antioxidative Kapazität auf als ihr Vorläufer Quercetin. Diese Abnahme konnte auch beim Abbau von Phloretin beobachtet werden: Abbauprodukte waren hier PG und 4HPPA.

Der Abbau der Phenolcarbonsäuren verläuft vor allen Dingen über die Dehydroxylierung des aromatischen Rings; bei den Hydroxyzimtsäuren ist diesem Ablauf die Sättigung der Doppelbindung (von CaA zu DHCaA) vorangestellt, was aber keinen signifikanten Unterschied in der antioxidativen Kapazität machte. Die Dehydroxylierung führte meist zur Verringerung der antioxidativen Kapazität der Substanzen, wie bei [Rice-Evans et al., 1996] beschrieben. Einzige Ausnahme bildeten die 4-hydroxylieren Phenylpropionsäuren wie CuA und 4HPPA, deren antioxidative Kapazität die der anderen Propion- und Zimtsäuren weit übertraf. Dieses Phänomen ist in der Literatur beschrieben [Nenadis et al., 2004; Rice-Evans et al., 1996]; eine Erklärung gibt es bis dato jedoch nicht.

Abgesehen von dieser Ausnahme zeigten alle Substanzen im Laufe ihres intestinalen Abbaus eine deutliche, jedoch geringere, antioxidative Kapazität als ihre Ursprungssubstanzen; erst durch Verlust der Phenol-Gruppe sank der TEAC auf Null.

4.2.2.2. Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels

Die Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels durch Polyphenol-Abbauprodukte in Caco-2 Zellen ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

Die untersuchten Phenylpropionsäuren DHCaA, 3HPPA und 4HPPA, die sich nur in Anzahl und Position der Hydroxylgruppen unterscheiden, wiesen alle eine moderate Wirksamkeit im Bereich 30 – 100 µmol/L auf, die in der Reihenfolge DHCaA > 4HPPA > 3HPPA abnahm (die Strukturen sind in Abschnitt 3.4.2.5, Seite 50, dargestellt). Die nicht

hydroxylierte PPA zeigte eine ähnliche Wirksamkeit wie DHCaA. Die untersuchten Catechole (DHPAA, DHBA, 4MC) waren alle in der Lage, den TBH-induzierten ROS-Level signifikant abzusenken. Dabei war DHPAA nur in den höchsten Konzentrationen aktiv (30 – 100 µg/mL), während bei DHBA eine U-förmige Konzentrations-Wirkungskurve beobachtet werden konnte, die ihr Minimum bei 3 µmol/L hatte. DHBA, oder Protocatechusäure, ist als gutes Antioxidans bekannt, welches in der Lage ist, TBH-vermittelte Zellschäden zu verringern [Tseng et al., 1996]. Die stärkste Verringerung aller untersuchten Abbauprodukte zeigte die Inkubation mit 4MC mit einer nahezu linearen Abnahme des ROS-Levels, die in den höchsten Konzentrationen (≥30 µmol/L) sogar weit unter dem physiologischen Bereich der Zellen (= C_0) lag. QiA, die bei der Verseifung von ChA freigesetzt wird, reduzierte den ROS-Level in Konzentrationen >30 µmol/L signifikant, während PG, das beim Abbau von Quercetin und Phloretin entsteht eine signifikante Abnahme schon ab 10 µmol/L bewirkte, in Übereinstimmung mit Literaturdaten [Kang et al., 2006].

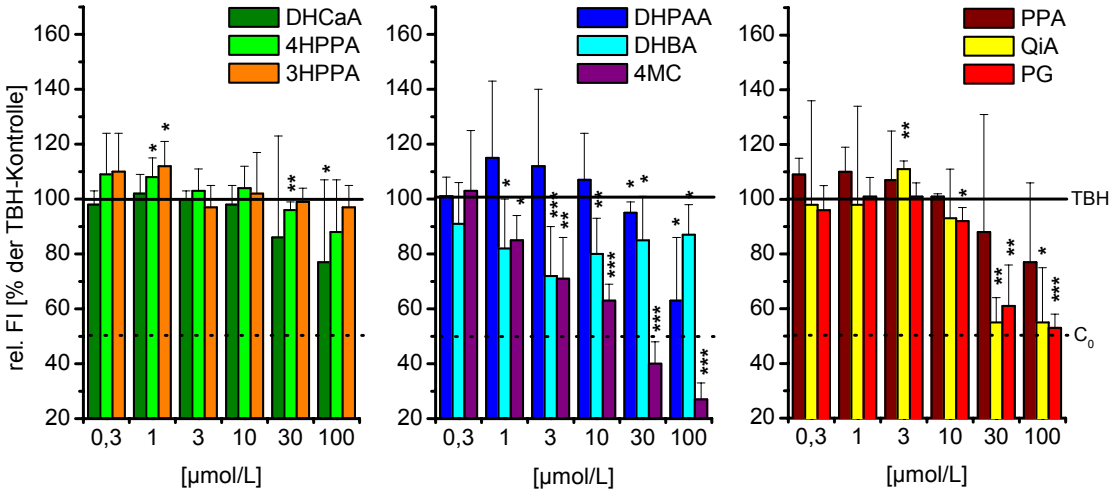


Abbildung 4.11: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Abbauprodukten von Apfel-Polyphenolen. MW + SD aus n=3-6 unabhängigen Experimenten. C_0: Lösemittelkontrolle ohne TBH. Signifikante Änderung zur TBH-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Die beobachtete Wirkung von 4MC in höheren Konzentrationen (≥30 µmol/L) könnte durch zytotoxische Effekte dieser Substanz bedingt sein, deren LD_{50}-Wert in B16 Maus-Melanom- und anderen Tumorzelllinien auf ca. 100 – 250 µmol/L abgeschätzt wurde [Morita et al., 2003], durch die fehlende NQO1-Aktivität in Caco-2 Zellen [Karczewski et al., 1999] aber wesentlich niedriger sein könnte. Zwar sollte durch die Berechnung des FI-Wertes ein Einfluss der Zellzahl weitgehend vermieden werden, aber FI-Werte, die unter C_0 liegen legen nahe, dass bei diesen Messungen zu wenige Zellen vorhanden waren.

Bei einer zu niedrigen Zellzahl lässt sich die Fluoreszenz nicht mehr zuverlässig messen, was zu solchen Artefakten führen kann (ähnlich Effekte wurden auch durch hohe Konzentrationen an Que und Pt in Caco-2 Zellen beobachtet [Schäfer, 2006]).

4.2.3. Zusammenfassung der Charakterisierung und antioxidativen Wirksamkeit phenolischer Abbauprodukte

Mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS konnte der Abbau der AE-Polyphenole durch anaerobe Darmbakterien beobachtet werden. Die nachgewiesenen Abbauprodukte in den F-AEs reflektierten das Polyphenol-Muster der jeweiligen AEs. Neben den Aglyka der Flavonol- und Dihydrochalcon-Glykoside wurden vor allen Dingen phenolische Säuren detektiert. Diese entsprachen im Allgemeinen der in Abbildung 4.12 dargestellten Form einer Phenylcarbonsäure mit 0 – 2 Hydroxylgruppen und einer aliphatischen Kette von 0 (Benzoesäure), 1 (Phenylessigsäure) oder 2 (Phenylpropionsäure) C-Atomen Länge.

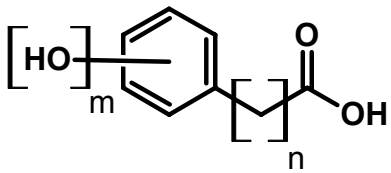


Abbildung 4.12: Allgemeine Strukturformel der Phenolcarbonsäuren, die u.a. beim intestinalen Abbau von Polyphenolen entstehen. m = 0-2; n=0-2

Die in den F-AEs identifizierten Abbauprodukte entsprachen weitestgehend den in der Literatur beschriebenen Substanzen, die beim Polyphenol-Abbau im Darm entstehen. Die Konzentration der fünf in dieser Arbeit quantifizierten Abbauprodukte lag in einem Bereich, der auch von ihren Ausgangssubstanzen in den AEs erreicht wird (ca. 1 - <100 mg/g). Eine Beteiligung der Abbauprodukte an der antioxidativen Wirksamkeit der F-AEs musste daher näher untersucht werden.

Die untersuchten Abbauprodukte wurden alle in mit humanen Darmbakterien anaerob fermentierten AEs identifiziert. Die Prüfung auf antioxidative Wirksamkeit erfolgte sowohl zellfrei (TEAC-Assay) als auch in Caco-2 Zellen (DCF-Assay).
Fast alle getesteten Abbauprodukte zeigten eine deutliche zellfreie antioxidative Kapazität im Bereich von 1 – 3 mmol/L Trolox, abgesehen von den Aglyka Que und Pt sowie den Substanzen ohne Phenol-Gruppe, da diese als essentiell zum Abfangen von Radikalen erachtet wird [Rice-Evans et al., 1996]. Verglichen mit ihren Ausgangsverbindungen war die Wirksamkeit der Abbauprodukte etwas geringer als die der jeweiligen Ausgangsverbindungen. Einzige Ausnahme waren die 4-Hydroxyphenylpropionsäuren,

deren TEAC-Werte deutlich höher lagen als die der 3,4-dihydroxylierten Analoga. Der TBH-induzierte ROS-Level wurde u.a. durch Substanzen mit Catechol-Struktur reduziert; alle Phenylpropionsäuren waren nur mäßig wirksam.

Die zellfreie antioxidative Wirksamkeit der F-AEs war mit 2,1 – 3,0 mmol/L Trolox schwächer als die von AE03B und AE04 (4,2 bzw. 4,0 mmol/L Trolox), was sich durch Umwandlung der AE-Polyphenole in Abbauprodukte mit geringerer antioxidativer Kapazität erklären lässt. Die identifizierten Abbauprodukte, die zum Teil eine deutliche Verringerung des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen bewirkten, sind wahrscheinlich auch für die antioxidative Wirksamkeit der F-AEs verantwortlich.

4.3. Antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaft-Trub

Trüber Apfelsaft ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt, da ihm, im Vergleich zu seinem klaren Pendant, eine bessere protektive Wirkung zugeschrieben wurde. So wurde die Anzahl abberanter Krypt-Foci (als Vorstufe neoplastischer Läsionen) in 1,2-Dimethylhydrazin-initiierten Ratten durch trüben, nicht aber durch klaren Apfelsaft verringert [Barth et al., 2005]. Der beobachtete Unterschied in der Wirkung wurde auf den Trub zurückgeführt, da der Gehalt an monomeren Polyphenolen in den beiden Säften ähnlich war. *In vitro* fanden Oszmianski et al. in trübem Apfelsaft eine höhere antioxidative Kapazität als in klarem (DPPH-Assay) [Oszmianski et al., 2007].

Um die Auswirkungen des intestinalen Metabolismus auf die antioxidative Wirksamkeit des Trubs im *in vitro*-Modell überprüfen zu können, wurde an der Friedrich Schiller-Universität Jena, analog zur Fermentation der AEs (Abschnitt 4.2), isolierter Trub aus dem Saft AS07 einer 24h dauernden anaeroben Fermentation mit Darmbakterien unterzogen. Dies war außerdem notwendig, da der Trub auf Grund seines hohen Molekulargewichtes kein Substrat für Darmzellen darstellt.

Während bei F-AE03 und F-AE04 eine anaerobe Inkubation mit humanen Fäzes durchgeführt wurde kam zur Fermentation des Trubs ein verfeinertes Modell zum Einsatz, bei dem in aufeinander folgenden Schritten die gesamte Magen-Darm-Passage simuliert wurde: der Behandlung mit Amylase folgte eine Inkubation in Salzsäure. Nach Neutralisierung des pH-Wertes wurden dem Ansatz Gallensäuren zugesetzt und zur Simulation der Absorption im Dünndarms einer Dialyse unterzogen. Das verbleibende Retentat wurde dann schließlich für 24h anaerob mit Darmbakterien aus humanen Fäzes inkubiert [Miene und Glei, 2009, pers. Mitteilung].

In der vorliegenden Arbeit wurde der so erhaltene wässrige Fermentationsüberstand (F-Trub) auf seine Fähigkeit zur Verringerung oxidativer Zellschäden getestet. Um mögliche

Einflüsse fäkaler Bestandteile abzuschätzen wurde zusätzlich eine Kontrolle mitgeführt, bei der die Fermentation ohne Zugabe von Trub durchgeführt wurde (F-Blank).

4.3.1. Zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC / ORAC)

Die antioxidative Wirksamkeit von F-Trub und F-Blank wurde mittels TEAC- und ORAC-Assay ermittelt und ist in Tabelle 4.8 dargestellt.

Während die antioxidative Kapazität (TEAC) bei beiden Proben gleich Null war, zeigten sowohl der F-Trub als auch die Kontrolle einen deutlichen ORAC-Wert, der beim F-Blank sogar noch etwas höher war.

Tabelle 4.8: Zellfreie antioxidative Kapazität (ORAC und TEAC) des fermentieren Trubs (F-Trub) und der Kontrolle (F-Blank). Werte in mmol/L Trolox. MW + SD aus n=2 (TEAC) bzw. n=3 (ORAC) unabhängigen Experimenten.

	ORAC [mmol/L Trolox] [a)]	**TEAC** [mmol/L Trolox] [a)]
F-Trub	8,2 ± 0,6	0,0 ± 0,0
F-Blank	8,9 ± 0,6	0,0 ± 0,0

[a)] Konzentration einer Trolox-Lösung (in mmol/L) mit derselben antioxidativen Wirksamkeit wie der Fermentationsüberstand (hergestellt aus 10 mg Trub pro mL Fermentationsansatz).

Die Werte von 8,2 bzw. 8,9 mmol/L Trolox können jedoch nicht direkt auf die antioxidative Wirksamkeit der AEs übertragen werden, da es sich hier um die absoluten Werte des wässrigen Überstandes handelt, während die ORAC-/TEAC-Werte der AEs auf eine Lösung der Konzentration 1 mg/mL normiert sind. Im geringen Unterschied zwischen F-Trub und F-Blank wird jedoch deutlich, dass die fermentierten Trubbestandteile keine antioxidative Kapazität besitzen und dass die beobachtete antioxidative Wirksamkeit des F-Trubs im ORAC-Assay vor allen Dingen auf fäkale Bestandteile zurückzuführen ist.

4.3.2. Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels

Der TBH-induzierte ROS-Level in Caco-2 Zellen wurde durch 24h Inkubation mit F-Trub in Konzentrationen von 0,001 – 1 % (entsprechend 0,1 – 100 µg/mL Trub im Medium), nicht moduliert (Abbildung 4.13). Auch F-Blank zeigte hier keine signifikante Wirkung.

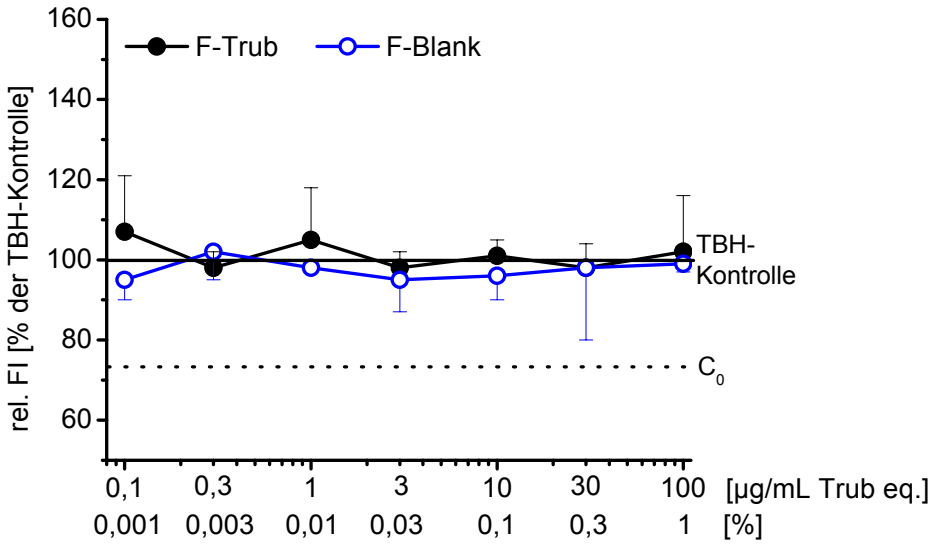


Abbildung 4.13: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit F-Trub und F-Blank. MW + SD aus n=3 unabhängigen Experimenten. C_0: Lösungsmittelkontrolle ohne TBH.

4.3.3. Modulation des Glutathion-Spiegels

Der tGSH-Spiegel von Caco-2 Zellen wurde durch 24h Inkubation mit F-Trub und F-Blank konzentrationsabhängig depletiert (Abbildung 4.14).

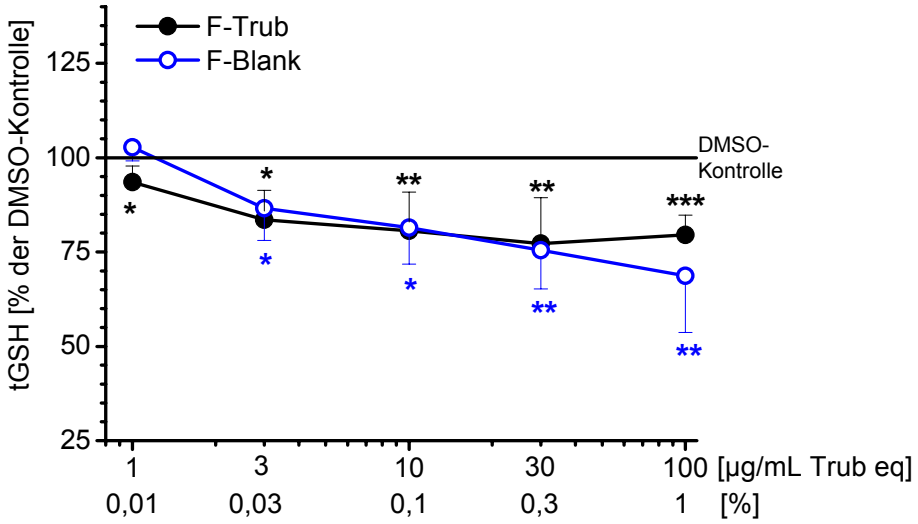


Abbildung 4.14: tGSH-Spiegel in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit F-Trub und F-Blank. MW + SD aus n=3-4 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur Lösungsmittel-Kontrolle (0,1 % DMSO): *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Diese Reduktion, die über den untersuchten Konzentrationsbereich (0,01 – 1 %, entsprechend 1 – 100 µg Trub/mL) verlief, war beim F-Trub schon ab 0,01 % signifikant;

bei F-Blank erst ab 0,03 %. In höheren Konzentrationen war die Abnahme des zellulären tGSH-Spiegels in Caco-2 Zellen durch F-Trub und F-Blank gleich; erst bei der höchsten untersuchten Konzentration (1 %) zeigte sich wieder ein Unterschied. Der beobachtete Wiederanstieg des tGSH-Spiegels durch 1 % F-Trub lag immer noch unter der Lösemittelkontrolle und war nicht signifikant unterschiedlich zum Messwert von F-Blank. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Depletion des tGSH-Levels in Caco-2 Zellen auf fäkalen Bestandteilen des Fermentationsansatzes und nicht auf Wirkstoffen des Trubs beruht. Eine ähnliche Depletion wurde auch bei fermentierten Apfelsaftextrakten und deren fermentierte Kontrollen beschrieben ([Bellion, 2006] und Abschnitt 4.2). Die Abnahme des tGSH-Spiegels könnte durch die Bildung von GSH-Addukten mit Komponenten der Fermentationsüberstände bedingt sein; dies wurde schon für Polyphenole beschrieben [Moridani et al., 2001b], ist aber auch für andere Substanzen möglich, da die GSH-Adduktbildung einen üblichen zellulären Detoxifizierungsmechanismus der Zelle darstellt und eine renale Ausscheidung als Mercaptursäure ermöglicht [Eisenbrand und Metzler, 2005].

4.3.4. Modulation ROS-induzierter DNA-Schäden

Die Md-induzierten DNA-Schäden (dargestellt in Abbildung 4.15 als Gesamt-DNA-Schäden nach FPG-Behandlung) in Caco-2 Zellen konnten durch 24h Inkubation mit Fermentationsüberstanden von Trub bzw. Kontrolle nur in den niedrigsten Konzentrationen (0,01 und 0,03 %) leicht signifikant gesenkt werden. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den Inkubationen mit F-Trub und F-Blank.

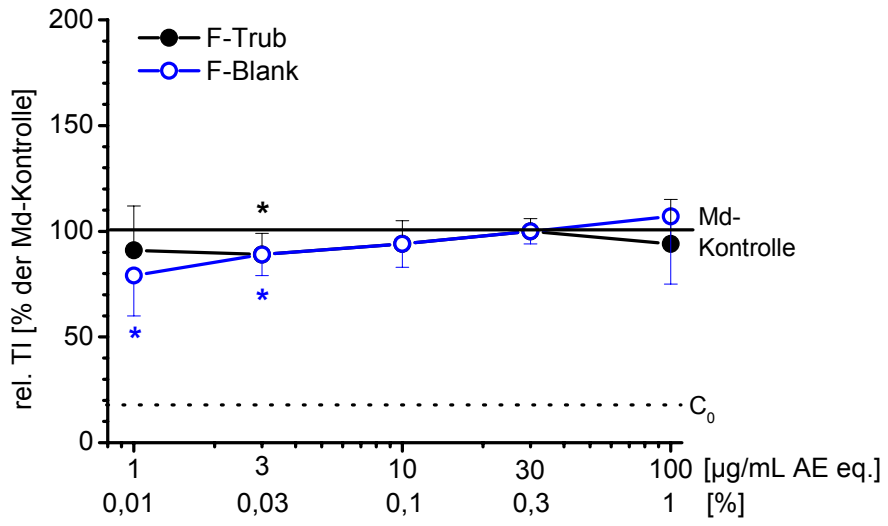


Abbildung 4.15: Modulation Md-induzierter Gesamt-DNA-Schäden durch 24h Inkubation mit F-Trub und F-Blank. MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. C_0: Lösungsmittelkontrolle (H_2O) ohne Md. Signifikanter Unterschied zur Md-Kontrolle: *p<0,05

4.3.5. Zusammenfassung der Wirksamkeit des fermentierten Trubs

Verschiedene Studien zeigten, dass trübe, verglichen mit klaren Apfelsäften, eine deutlich bessere antioxidative/protektive Wirksamkeit aufweisen [Barth et al., 2005; Oszmianski et al., 2007]. Dieser Effekt wird oligo- und polymeren Procyanidinen zugeschrieben, die einen Anteil von >60 % des Trubs ausmachen können [Gerhäuser, 2008].

In Anlehnung an die *in vivo*-Situation und um die Inhaltsstoffe des Trubs auf Grund ihres hohen Molekulargewichtes für die verwendeten Caco-2 Zellen nutzbar zu machen wurde isolierter Trub aus dem Apfelsaft AS07 in einem Modell des menschlichen Gastrointestinaltraktes fermentiert (F-Trub). Zusätzlich wurde eine Kontrolle (F-Blank) mitgeführt, um den Einfluss fäkaler Bestandteile des Fermentationssystems abschätzen zu können.

F-Trub und F-Blank zeigten bei den meisten untersuchten Markern eine nur geringe Wirksamkeit: die zellfreie antioxidative Kapazität (TEAC/ORAC) war sehr klein, weder der TBH-induzierte ROS-Level noch Md-induzierte DNA-Schäden konnten durch F-Trub reduziert werden. Der tGSH-Spiegel wurde durch Inkubation mit F-Trub konzentrationsabhängig verringert, was wahrscheinlich einer GSH-Adduktbildung von fäkalen Bestandteilen zuzuschreiben ist.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeigte sich - wenn überhaupt - eine minimale antioxidative Wirksamkeit des F-Trubs in Caco-2 Zellen, die die beobachteten *in vivo*-Ergebnisse nicht erklären können. Da die Modulation der untersuchten Parameter auch durch den F-Blank verursacht wurde kann ein Einfluss der fermentierten Trubbestandteile ausgeschlossen werden. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch die Projektpartner der Friedrich Schiller-Universität Jena, die die Modulation der Genexpression protektiver Phase I- und Phase II-Enzyme durch F-Trub und F-Blank in humanen Kolonzellen untersuchten [Miene und Glei, 2009, pers. Mitteilung]. Die Analytik der monomeren Polyphenole in den Fermentationsüberständen, die von H. Bergmann (AG Richling, TU Kaiserslautern) mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS durchgeführt wurde zeigt nahezu ein identisches Bild von F-Trub und F-Blank: in beiden Fermentationsüberständen konnten praktisch keine Polyphenole nachgewiesen werden [Bergmann und Richling, 2009, pers. Mitteilung], was die fehlende Wirkung von F-Trub erklärt.

4.4. Prooxidative Effekte von Polyphenolen und AEs

Es ist bekannt, dass polyphenolische Substanzen neben ihrer starken antioxidativen Wirksamkeit auch ROS generieren können (siehe Abschnitt 3.4.5.2, Seite 64). Daher war es notwendig, die prooxidativen Eigenschaften der zu untersuchenden Apfelsaft-Polyphenole, deren intestinaler Abbauprodukte sowie der verwendeten polyphenolischen Apfelsaftextrakte (AE) während der Inkubation im Zellkulturmedium zu erfassen. Die Auswirkung artifiziell gebildeter ROS auf zelluläre Marker wurde ebenfalls getestet.
Ziel dieser Untersuchungen war die Abschätzung der Übertragbarkeit des *in vitro*-Modells auf die *in vivo*-Situation, da diese prooxidativen Effekte im Menschen bislang nicht nachgewiesen werden konnten [Halliwell, 2008].

4.4.1. Einfluss des Zellkultur-Mediums

Um die Auswirkung verschiedener Zellkulturmedien und deren Bestandteile auf die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Polyphenole zu untersuchen wurden Kaffeesäure (CaA) und AE07 ausgewählt, da sich beide in Vorversuchen als starke H_2O_2-Bildner erwiesen hatten (siehe auch Abschnitte 4.4.2 und 4.4.3). Die Inkubation erfolgte, wie für die untersuchten Endpunkte üblich, für 24h im Brutschrank (37°C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2).
Untersucht wurden die Zellkulturmedien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sowie DMEM/F12, eine 1:1 Mischung aus DMEM mit Ham's Nutrition Mix F12. Diese beiden Medien sind in der Zellkultur weit verbreitet und werden in unserer Arbeitsgruppe zur Kultivierung der beiden Darmkrebs-Zelllinien HT-29 bzw. Caco-2 verwendet. Sie wurden zusätzlich, entsprechend dem gängigen Protokoll zur Substanzinkubation mit 5 % bzw. 10 % fötalem Kälberserum (FKS) sowie den Antibiotika Penicillin/Streptomycin supplementiert (siehe auch Abschnitt 7.2.1).
Die Ergebnisse (Abbildung 4.16) zeigten eine deutliche Bildung von H_2O_2 durch CaA (100 µmol/L) und AE07 (100 µg/mL) in DMEM, aber nicht in DMEM/F12. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Long et al. überein, die nach zweistündiger Inkubation von EGCG in reinem F12 keine H_2O_2-Bildung feststellen konnten, wohl aber nach Inkubation in DMEM [Long et al., 2007]. Da sich dies nur auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Medien zurückführen lässt, wurden im Folgenden überprüft, welche Inhaltsstoffe in DMEM diese starke H_2O_2-Bildung fördern.

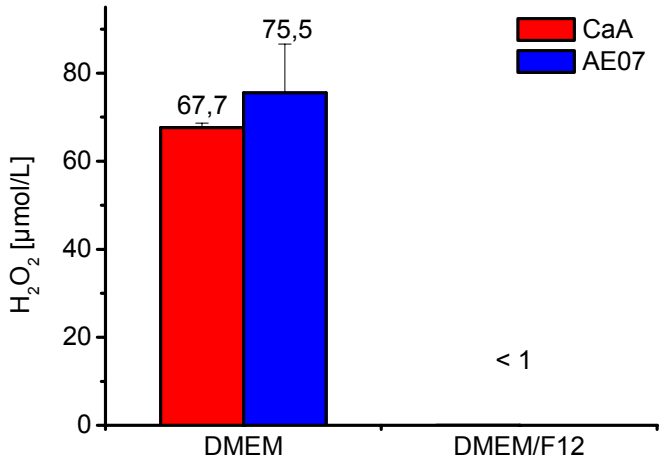


Abbildung 4.16: H_2O_2-Konzentration in DMEM- und DMEM/F12-Zellkultur-Medium nach 24h-Inkubation von Kaffeesäure (CaA, 100 µmol/L) und AE07 (100 µg/mL); Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) aus n = 3-5 unabhängigen Versuchen

Einfluss der verschiedenen Medienbestandteile

Dazu wurden, nach Spezifikationen des Herstellers und der angegebenen Literatur [Barnes und Sato, 1980; Dulbecco und Freeman, 1959; Invitrogen], einzelne Inhaltsstoffe ausgewählt. Neben physiologisch essentiellen Salzen waren dies Puffer sowie das redox-aktive Fe(III). Die genaue Konzentration der Substanzen ist in Tabelle 4.9 angegeben, die H_2O_2-Konzentration nach 24 h Inkubation mit 100 µmol/L CaA sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

Alle untersuchten Medienkomponenten, mit Ausnahme der $NaHCO_3$-Lösungen, generierten kaum H_2O_2 (<2 µmol/L), während in wässriger Bicarbonat-Lösung eine deutliche und von der verwendeten $NaHCO_3$-Konzentration abhängige H_2O_2-Bildung zu beobachten war. So konnte nach 24h-Inkubation in 44 mmol/L $NaHCO_3$ (entsprechend der Konzentration in DMEM) ca. 48 µmol/L H_2O_2 gemessen werden, während es bei Verwendung von 14 mmol/L $NaHCO_3$ (entsprechend DMEM/F12) nur 9,5 µmol/L H_2O_2 waren. Dies erklärt zum Teil die stark unterschiedliche H_2O_2-Konzentration, die nach Polyphenol-Inkubation in beiden Medien beobachtet wurde (Abbildung 4.16).

Das in den Medien vorhandene $NaHCO_3$ bildet mit der CO_2-Atmosphäre im Brutschrank einen Kohlensäure-Bicarbonat-Puffer:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$$

$$H_2CO_3 \rightleftarrows HCO_3^- + H^+$$

Dieses Puffersystem, welches im Blut für einen konstanten pH-Wert von ca. 7,4 sorgt [Römpp, 2009], soll auch den pH-Wert des Mediums im physiologischen Bereich halten. Anders als DMEM verwendet DMEM/F12 zusätzlich zum Hydrogencarbonat noch das

Zwitterion HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure), dessen Pufferbereich auch bei 7,0 – 8,0 liegt [Römpp, 2009], aber nicht vom CO_2-Gehalt im Brutschrank abhängt. Der Zusatz von HEPES zur Vermeidung der H_2O_2-Bildung im Medium wurde durch Arbeiten von Wee et al. bestätigt [Wee et al., 2003].

Tabelle 4.9: Ausgewählte Inhaltsstoffe von DMEM und DMEM/F12; nach [Barnes und Sato, 1980; Dulbecco und Freeman, 1959; Invitrogen]. Untersuchte Substanzen sind fett markiert.

Substanz	Konzentration in DMEM [mmol/L]	Konzentration in DMEM/F12 [mmol/L]
Fe^{3+} a)	**0,000248**	0,000124
$CaCl_2$	**1,8**	1,05
NaH_2PO_4	**0,916**	0,453
KCl	**5,33**	4,16
NaCl	**110,34**	120,61
$NaHCO_3$	**44,05**	**14,29**
$MgSO_4$	**0,813**	0,407
HEPES	---	**12,92**

a) hier als $FeCl_3$; im Medium als $Fe(NO_3)_3$

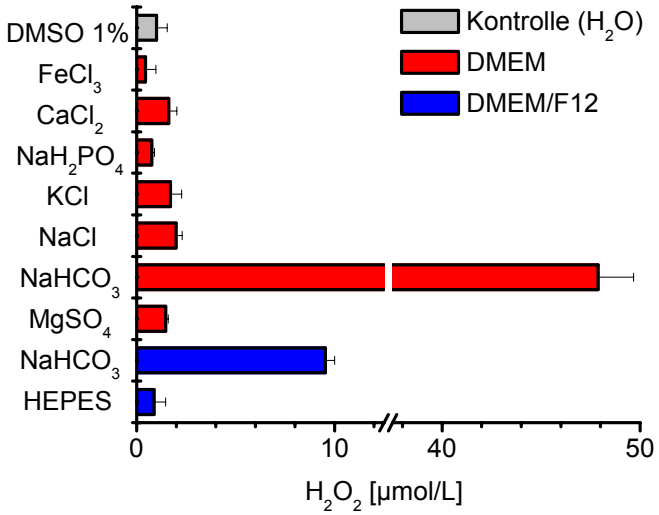


Abbildung 4.17: H_2O_2-Konzentration nach 24h-Inkubation wässriger Lösungen verschiedener Mediumbestandteile mit CaA (100 µg/mL); MW und SD aus n = 3-5 unabhängigen Versuchen

Dies deutet darauf hin, dass der pH-Wert des Mediums eine wichtige Rolle bei der Generierung von H_2O_2 durch Polyphenole spielen könnte.

Inkubation von CaA in einer Lösung von **Fe(III)**, welches als Redox-aktives Metall-Ion die Bildung von ROS fördern könnte, führte dagegen nicht zu erhöhten H_2O_2-Konzentrationen

(Abbildung 4.17). Dies entspricht den Ergebnissen von Lapidot et al., die bei Inkubation von Gallussäure (50 µmol/L) in DMEM ebenfalls keinen Einfluss einer Fe(III)-Supplementierung (25 µmol/L) auf die H_2O_2-Bildung feststellen konnten [Lapidot et al., 2002].

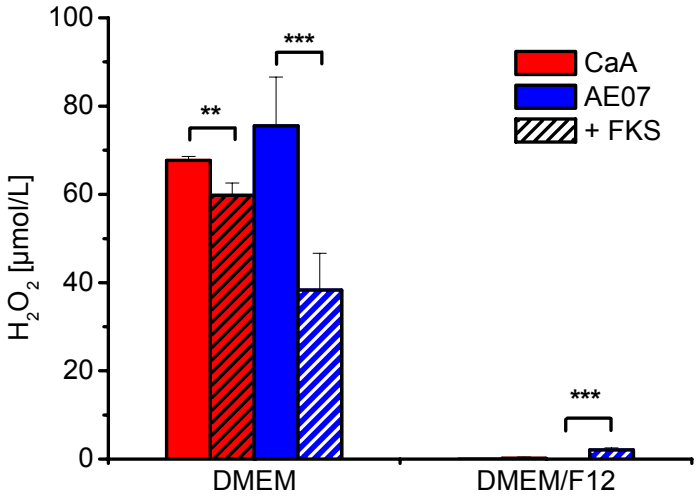


Abbildung 4.18: H_2O_2-Konzentration nach 24h-Inkubation von CaA (100 µmol/L) und AE07 (100 µg/mL) in DMEM und DMEM/F12 bei Zusatz von 5 bzw. 10 % FKS. MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Versuchen. Signifikanter Unterschied ± FKS: ** p<0.01 *** p<0.001

Auch der Einfluss von **FKS** auf die prooxidativen Eigenschaften von Polyphenolen wurde untersucht. Dazu wurden Inkubationen von CaA und AE07 in DMEM und DMEM/F12 ohne und mit 5 % bzw. 10 % FKS-Zusatz durchgeführt. Wie Abbildung 4.18 belegt, wird durch Zusatz von 5 % FKS zu DMEM die polyphenol-bedingte H_2O_2-Bildung signifikant verringert. Die leichte Erhöhung der H_2O_2-Konzentration durch FKS-Zugabe in DMEM/F12 ist zwar statistisch signifikant, kann aber auf Grund der größeren Messungenauigkeit im Bereich der Nachweisgrenze (1 µmol/L) als nicht relevant erachtet werden. Falls im FKS antioxidative Enzyme vorhanden sind könnten diese entstehendes H_2O_2 abbauen, was dessen verringerte Konzentration in FKS-haltigem Medium erklären könnte [Lapidot et al., 2002]. Zusätzlich wurden Stabilitätsuntersuchungen von H_2O_2 in verschiedenen Medien, jeweils mit und ohne FKS, durchgeführt (siehe Abbildung 4.21). Es zeigte sich, dass bei FKS-supplementiertem Medium sogar etwas weniger H_2O_2 abgebaut wurde als in Medium ohne FKS. Daraus kann geschlossen werden, dass evtl. vorhandene antioxidativ wirksame Enzyme im FKS keinen Einfluss auf die H_2O_2-Konzentration im Medium haben. Somit wäre die geringere H_2O_2-Konzentration in FKS-supplementiertem DMEM eher auf eine partielle Inaktivierung der Polyphenole durch Bindung an FKS-Proteine zu erklären [Dangles et al., 1999; Rawel et al., 2006].

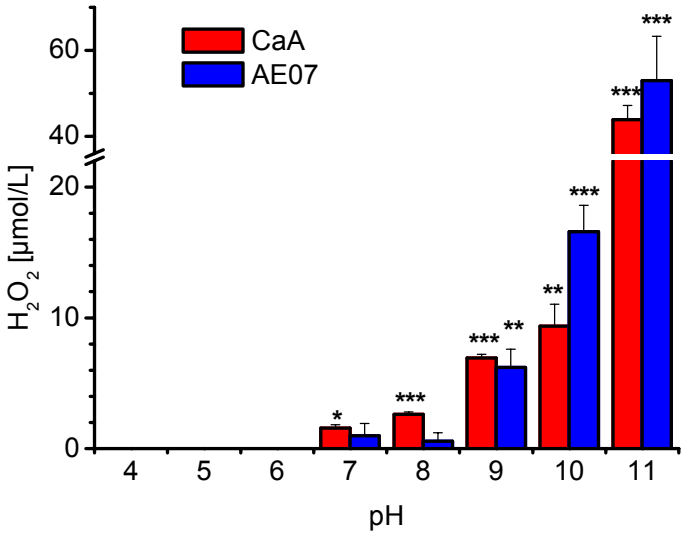


Abbildung 4.19: H_2O_2-Konzentration in PBS, pH 4-11, nach 24h-Inkubation mit CaA (100 µmol/L) bzw. AE07 (100 µg/mL). MW + SD aus n=4-5 unabhängigen Versuchen; Signifikanter Unterschied zur Lösungsmittel-Kontrolle: * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

Einfluss des pH-Wertes

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Generierung von H_2O_2 in den Zellkultur-Medien zu bestimmen, wurde zunächst deren pH-Wert unter Inkubationsbedingungen gemessen. Dabei zeigte sich, dass der pH-Wert von DMEM/F12 nach 24h im Brutschrank mit 7,2 pH-Einheiten deutlich unter dem von DMEM (pH 7,6) lag. Eine zusätzliche Messung des pH-Wertes über die Dauer von 24h zeigte ein erwartungsgemäßes Absinken des pH-Wertes über 24h von 7,9 auf 7,6 bei DMEM und von 7,5 auf 7,2 bei DMEM/F12 (Abbildung siehe Anhang), was auf eine Gleichgewichtsreaktion zwischen CO_2 und HCO_3^- zurückzuführen ist: durch den Übergang von CO_2 aus der Inkubator-Atmosphäre ins Medium kommt es zu vermehrten Bildung von Kohlensäure und damit zur Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung $HCO_3^- + H^+$, was mit einem Absinken des pH-Wertes verbunden ist.

Um die pH-Abhängigkeit der polyphenol-bedingten H_2O_2-Bildung näher zu untersuchen wurden CaA und AE07 in PBS inkubiert, welches zuvor auf pH-Werte im Bereich 4 – 11 eingestellt worden war. Wie in Abbildung 4.19 dargestellt, verlief die Bildung von H_2O_2 pH-abhängig, wobei erst ab pH 7 überhaupt H_2O_2 detektiert werden konnte. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Wee et al. überein, die ebenfalls eine gesteigerte H_2O_2-Bildung durch Quercetin bei pH >7,4 beobachtet haben; ebenso diskutieren sie den Einsatz von HEPES zur Verminderung der H_2O_2-Bildung durch Absenken des pH-Wertes [Wee et al., 2003].

Dieser Versuch bestätigte die Vermutung, dass die prooxidativen Eigenschaften der Polyphenole durch einen basischen pH-Wert unterstützt bzw. erst ermöglicht werden. Die dadurch vorliegen Phenolat-Anionen sind im Vergleich zu den protonierten Phenolen

besser in der Lage ein Elektron abzugeben, was sich in einer erhöhten Reaktivität bei pH ≥7 zeigt [Amorati et al., 2006; Mukai et al., 2005]. Da die prooxidativen als auch die antioxidativen Effekte vermutlich auf ähnlichen Mechanismen beruhen (Bildung eines Phenolat-Anions; siehe Abschnitte 3.4.3.1 und 3.4.5.2), wird auch die antioxidative Wirksamkeit bei basischem pH-Wert gesteigert [Amorati et al., 2006].

Einfluss der Inkubationsdauer

Während der vierundzwanzigstündigen Inkubation von AE07 und CaA in DMEM wurden nach 1, 3 und 6h Proben entnommen, um Informationen über die Zeitabhängigkeit der H_2O_2-Bildung zu erhalten.

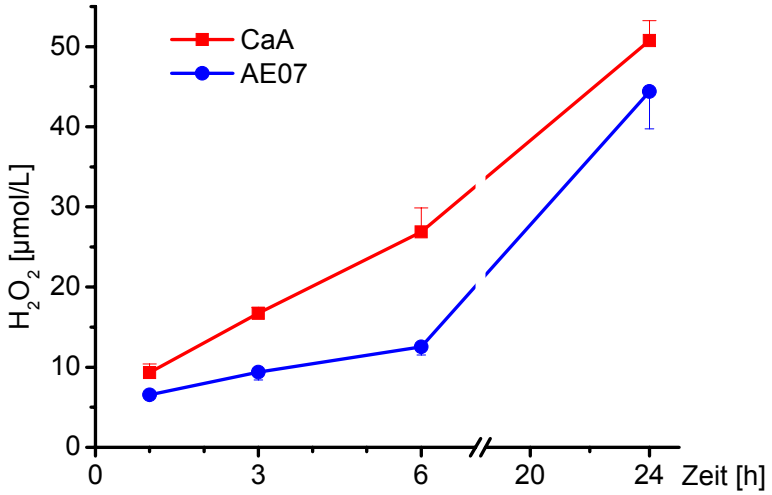


Abbildung 4.20: H_2O_2-Konzentration in DMEM nach Inkubation mit CaA (100 µmol/L) bzw. AE07 (100 µg/mL) zu den Zeitpunkten 1, 3, 6 und 24h. MW + SD aus n=4-6 unabhängigen Versuchen

Wie erwartet stieg die H_2O_2-Konzentration im Medium über 24h nahezu linear an (Abbildung 4.20). Eine lineare Regression der Messwerte ergab ein Bestimmtheitsmaß von R^2 = 0,955 für CaA und von R^2 = 0,997 für AE07.

Stabilität von H_2O_2 im Medium

Neben der Bildung von H_2O_2 durch Polyphenole (Expositionsmenge) spielt auch dessen Stabilität im Medium (Expositionsdauer) eine entscheidende Rolle für eventuell auftretende adverse Effekte auf Zellen. Zur Untersuchung der Stabilität von H_2O_2 in den verschiedenen Medien wurden diese mit 100 µmol/L H_2O_2 versetzt und im Brutschrank inkubiert. Nach 24h wurde das verbliebene H_2O_2 quantifiziert.

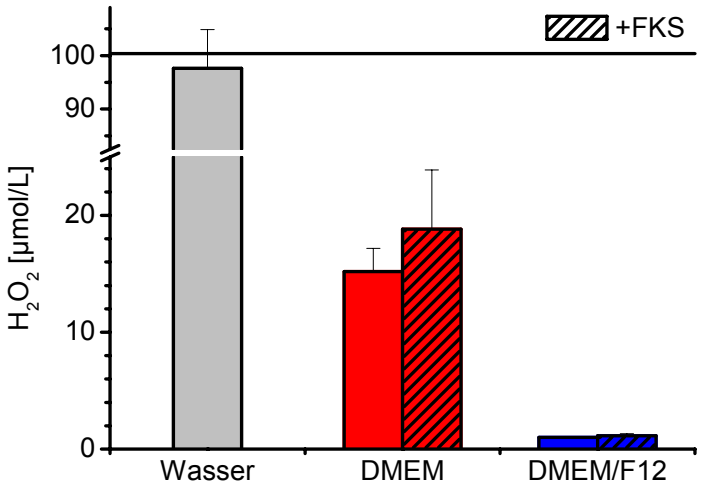


Abbildung 4.21: H_2O_2-Konzentration nach 24h-Inkubation von 100 µmol/L H_2O_2 in Wasser, DMEM oder DMEM/F12. MW + SD aus n=3-6 unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 4.21 zu sehen ist, war das zugesetzte H_2O_2 in Wasser nahezu stabil, während es in beiden Medien einem starken Abbau unterworfen war. Nach der 24h-Inkubation konnten in DMEM noch 15 µmol/L, in DMEM/F12 sogar nur noch Spuren von H_2O_2 detektiert werden.

Die Supplementierung mit 5 bzw. 10 % FKS führte dazu, dass etwas weniger H_2O_2 abgebaut wurde als ohne FKS, was den Schluss zulässt, dass der oben postulierte Einfluss von FKS auf die H_2O_2-Konzentration nach Polyphenol-Inkubation eher auf eine Hemmung der H_2O_2-Bildung als auf einen aktiven Abbau des H_2O_2 zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die höheren H_2O_2-Konzentrationen in DMEM, im Vergleich zu DMEM/F12, auf dem höheren pH-Wert des Mediums beruhen, wodurch die prooxidativen Effekte der Polyphenole deutlich gesteigert werden. Ein weiterer Faktor der nicht außer Acht gelassen werden darf, ist der Abbau von entstandenem H_2O_2, der in DMEM/F12 wesentlich besser verläuft als in DMEM.

4.4.2. Prooxidative Effekte der AEs

Die weiteren Untersuchungen zur prooxidativen Wirksamkeit von AEs und ihren Inhaltsstoffen (siehe Abschnitt 4.4.3) wurden in DMEM + 5 % FKS durchgeführt, da sich in DMEM/F12 kein H_2O_2 detektieren ließ und der Zusatz von FKS den gängigen Protokollen von Zellpflege und Inkubation entspricht. Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die Inkubation über 24h im Brutschrank bei 37°C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2.

Dazu wurden die bis dato im Netzwerk zugänglichen Apfelsaftextrakte AE01 – AE07 (zur Herstellung und Zusammensetzung der Extrakte siehe Abschnitt 3.6) in Konzentrationen von 1 – 300 µg/mL inkubiert.

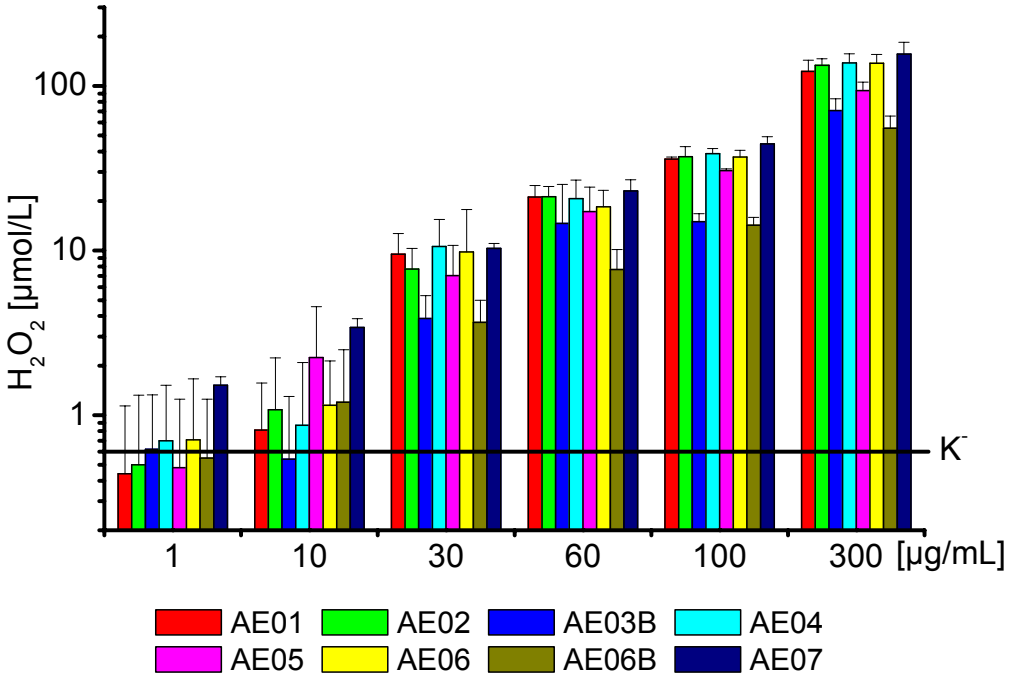


Abbildung 4.22: H_2O_2-Konzentration in DMEM +5 %FKS nach 24h Inkubation mit polyphenolreichen Apfelsaft-Extrakten AE01 – AE07. K^-: Lösemittelkontrolle (1 % DMSO); MW + SD aus n=3-6 unabhängigen Versuchen.

In Konzentrationen ≥30 µg/mL verursachten alle untersuchten AEs eine ausgeprägte H_2O_2-Bildung, einige (AE05, AE07) zeigten auch schon bei niedrigeren Konzentrationen deutliche Wirksamkeit (Abbildung 4.22). Die H_2O_2-Bildung hängt linear von der eingesetzten AE-Konzentration ab; die berechneten Bestimmtheitsmaße der linearen Regression lagen für alle AEs bei R^2 >0,980 (Ergebnisse der linearen Regression siehe Anhang). Neben der Konzentrationsabhängigkeit wurde auch eine klare Zeitabhängigkeit der H_2O_2-Bildung über 24h beobachtet (AE07: R^2 = 0,997; siehe Abbildung 4.20).

Korrelation zwischen Zusammensetzung und H_2O_2-Bildung

Wie in Abbildung 4.22 zu erkennen ist, unterschieden sich die einzelnen AEs in ihrer Fähigkeit, H_2O_2 zu generieren. Vor allem die beiden Tresterextrakte AE03B und AE06B produzierten deutlich weniger H_2O_2 als die Extrakte aus den Säften. Da alle anderen Parameter der Messung gleich gehalten wurden, muss dieser Unterschied auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der Extrakte beruhen. Wie in Tabelle 3.6 dargestellt enthalten die AEs eine ganze Reihe verschiedener Polyphenole sowie oligomere

Procyanidine und Oligosaccharide. Um einen möglichen Einfluss dieser Inhaltsstoffe an der H_2O_2-Bildung zu bestimmen wurde die gebildete H_2O_2-Menge (nach Inkubation von 100 µg/mL AE) gegen die Konzentration der einzelnen Inhaltsstoffe der AEs aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt, um die Bedeutung einzelner Extrakt-Komponenten abzuschätzen. In Tabelle 4.10 finden sich ausgewählte Korrelationskoeffizienten; sämtliche berechneten R-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 4.10: Ausgewählte Korrelationskoeffizienten R der linearen Regression zwischen AE-bedingter H_2O_2-Bildung (100 µg/mL AE, 24h, DMEM +5 % FKS) und deren Gehalt an Inhaltsstoffen.

Substanz(gruppe)	R
∑ Polyphenole	0,707
∑ Flavanole	-0,098
∑ Dihydrochalcone	0,163
Phloretin-2-xyloglucosid	0,725
Phloridzin	-0,468
∑ Hydroxyzimtsäuren	0,776
Chlorogensäure	0,758
∑ Flavonole	-0,590
Quercetin-3-galactosid	-0,754
Quercetin-3-xylosid	-0,641
∑ Procyanidine	0,044
∑ Oligosaccharide	-0,842
∑ Polyphenole + Procyanidine	0,563

Die Berechnungen zeigten, dass die niedermolekularen Polyphenole (R = 0,707) wahrscheinlich an der Bildung von H_2O_2 durch AE-Inkubation beteiligt sind, die oligomeren Procyanidine (R = 0,044) dagegen wahrscheinlich keinen Einfluss ausüben. Die in den AEs enthaltenen Zucker-Oligomere zeigten eine negative Korrelation (R = -0,842), was bedeutet, dass die AEs umso weniger H_2O_2 generieren desto mehr Oligosaccharide sie enthalten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Extrakte mit mehr Oligosacchariden weniger Polyphenole enthalten. Teilt man die Gruppe der Polyphenole weiter auf so findet sich die stärkste direkte Korrelation für die Hydroxyzimtsäuren (R = 0,776) mit ihrer Leitsubstanz Chlorogensäure (R = 0,758). Dem entsprechend generierten die beiden Tresterextrakte AE03B und AE06B, welche die niedrigsten Gehalte an Hydroxyzimtsäuren enthalten, auch am wenigsten H_2O_2. Die Summe der Dihydrochalcone (R = 0,163) schien keinen Beitrag zur H_2O_2-Bildung zu liefern, obwohl für Phloretin-2-xyloglucosid, welches in Gehalten bis zu 6,9 % in den AEs

vorkommt (und bis zu 70 % der enthaltenen Dihydrochalcone ausmacht) eine starke Korrelation errechnet wurde; dem gegenüber steht aber die deutliche inverse Korrelation zur Phloretin-Konzentration, was die Beteiligung der Dihydrochalcone in der Summe aufhebt. Dies zeigt, dass Regressionsrechnungen einen Hinweis auf prooxidativ wirksame Substanzen geben können, die aber durch direkte Untersuchungen zur H_2O_2-Bildung einzelner Inhaltsstoffe zu überprüfen sind. Flavan-3-ole (mono-, di- und trimere Catechine) trugen ebenfalls nicht zur H_2O_2-Bildung der AEs bei; der Betrag der R-Werte war bei allen <0,300. Quercetin-Glykoside zeigten, ebenso wie die Summe der Oligosaccharide, eine inverse Korrelation zur H_2O_2-Menge (R = -0,590), was auf einen leichten protektiven Effekt hindeuten könnte. Alle anderen Substanzen hatten keine deutliche Korrelation (R <0,600).

Es zeigt sich also, dass die AEs nicht nur gute Antioxidanzien sind (siehe Abschnitt 4.1.1) sondern, unter geeigneten Inkubationsbedingungen, auch große Mengen an H_2O_2 produzieren können. Dieser Effekt ist abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Extrakts, wobei Extrakte mit hohen Hydroxyzimtsäure- und niedrigen Flavonol- und Oligosaccharid-Gehalten besonders potente H_2O_2-Bildner zu sein scheinen.

4.4.3. Prooxidative Effekte ausgewählter Apfelsaft-Polyphenole

Um den auf mathematischen Modellen beruhenden Zusammenhang zwischen H_2O_2-Bildung und AE-Zusammensetzung zu verifizieren, wurden neben den oben vorgestellten AEs auch Leitsubstanzen der verschiedenen Polyphenol-Klassen auf ihre prooxidative Wirksamkeit untersucht. Um eine Aussage über die Aktivität der Polyphenole in Beziehung auf ihre Struktur herstellen zu können (**Struktur-Wirkungs-Beziehung**) wurden neben den Apfelsaft-Polyphenolen auch ausgewählte intestinale Abbauprodukte untersucht.

Die Ergebnisse (H_2O_2-Konzentration) der untersuchten Apfelsaft-Inhaltsstoffe sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Es ist zu sehen, dass nach Inkubation von 100 µmol/L der jeweiligen Polyphenole für 24h die untersuchten Dihydrochalcone Phloretin (Pt), Phloridzin (Pz) und Phloretin-2'-O-xyloglucosid (Pxg) keine signifikanten Mengen an H_2O_2 (verglichen mit der Lösungsmittel-Kontrolle) gebildet hatten. Das Quercetin-Glykosid Rutin (Rut, Quercetin-3-O-glucorhamnosid) generierte eine kleine, jedoch schon signifikante Menge an H_2O_2, während durch Inkubation mit dem Aglykon Quercetin (Que) deutlich mehr H_2O_2 produziert wurde. Eine weitere Steigerung wurde bei Inkubation mit (-)-Epicatechin (Epi) beobachtet. Das meiste H_2O_2 bildeten die beiden Hydroxyzimtsäuren Chlorogensäure (ChA) und Kaffeesäure (CaA); *p*-Cumarsäure (CuA) hingegen produzierte, wie die Dihydrochalcone, keine signifikanten Mengen. Bei Inkubation von 10 µmol/L konnte eine signifikante H_2O_2-Produktion lediglich durch Que, ChA und CaA

beobachtet werden während Polyphenole der Konzentration 1 µmol/L keine signifikanten Mengen produzierten.

Tabelle 4.11: H_2O_2-Konzentration (in µmol/L) in DMEM +5 % FKS nach 24h-Inkubation mit ausgewählten Apfelsaft-Polyphenolen/Aglyka (Konzentration: 1, 10 oder 100 µmol/L). MW aus n=3-6 unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration:	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Kontrolle (1 % DMSO)		<1	<1	<1
Phloretin-2'-O-glucosid (Phloridzin)	Pz	1,7	1,8	1,9
Phloretin-2'-O-xyloglucosid	Pxg			1,7
Phloretin	Pt	1,8	2,0	2,4
Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin)	Rut	1,4	1,4	4,8
Quercetin	Que	1,6	2,6	20,9
(-)-Epicatechin	Epi	<1	1,5	32,3
5-Kaffeeoylchinasäure (Chlorogensäure)	ChA	1,7	2,8	32,5
Kaffeesäure	CaA	1,4	3,6	50,7
p-Cumarsäure	CuA			<1

Die H_2O_2-Generierung wurde durch die Ergebnisse anderer Gruppen bestätigt, die eine signifikante Bildung durch Inkubation von Polyphenolen (u.a. Que, CaA, Epi, EGCG, Gallussäure) in DMEM-Zellkulturmedium zeigen konnten, allerdings mit einem anderen Assay [Lapidot et al., 2002; Lee et al., 2005; Long et al., 2000; Wee et al., 2003].

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene H_2O_2-Generierung durch Polyphenole stieg, ebenso wie bei den AEs, linear zur verwendeten Konzentration mit einem Bestimmtheitsmaß von R^2 >0,98; auch eine zeitabhängige Bildung von H_2O_2 durch Polyphenole wurde bei AE07 (Abschnitt 4.4.1), CaA und ChA (Abbildung 4.23) beobachtet. Bei Inkubation mit Que war keine zeitabhängige Zunahme von H_2O_2 im Medium feststellbar; vielmehr blieb der H_2O_2-Level in den ersten sechs Stunden weitgehend konstant und fiel nach 24h Inkubation sogar leicht ab. Auch bei Lapidot et al. zeigte eine Inkubation mit CaA eine lineare Zunahme der H_2O_2-Konzentration über >2h, während mit Que schon nach 1h die maximale H_2O_2-Konzentration erreicht wurde [Lapidot et al., 2002].

Da die Generierung von H_2O_2 – mechanistisch gesehen – zumeist auf der Oxidation der Polyphenole beruht (siehe Abbildung 3.25), wird dies auch in Stabilitätsuntersuchungen widergespiegelt. So zeigte Que, verglichen mit ChA und CaA, eine deutlich niedrigere Stabilität in DMEM, die mit der stärkeren H_2O_2-Konzentration zusammenhängen könnte [Boulton et al., 1999; Roques et al., 2002; Schäfer et al., 2006a]. Des Weiteren wurde eine verringerte Stabilität von CaA, ChA und Gallussäure bei hohen pH-Werten berichtet, die

für die pH-abhängige Oxidation der Polyphenole (wahrscheinlich unter ROS-Bildung) spricht [Friedman und Jurgens, 2000].

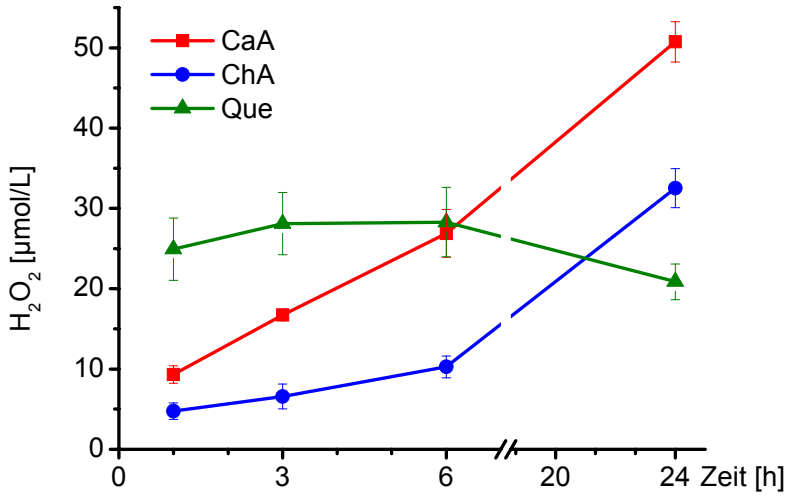


Abbildung 4.23: H_2O_2-Konzentration in DMEM nach Inkubation mit CaA, ChA oder Que zu den Zeitpunkten 1, 3, 6 und 24h. MW + SD aus n=3-4 unabhängigen Versuchen

Die Untersuchung der intestinalen Abbauprodukte zeigte, dass von den untersuchten Substanzen nur Dihydrokaffeesäure (DHCaA), 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DHPAA) und 4-Methylcatechol (4MC) starke H_2O_2-Bildner waren (Tabelle 4.12); 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA) produzierte nur geringe Mengen an H_2O_2.

Tabelle 4.12: H_2O_2-Konzentration (in µmol/L) in DMEM +5 % FKS nach 24h-Inkubation mit Polyphenol-Abbauprodukten (100 µmol/L). MW aus n=3-4 unabhängigen Versuchen.

		H_2O_2 [µmol/L]
3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure	3HPPA	<1
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	4HPPA	<1
Dihydrokaffeesäure	DHCaA	89,0
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure	DHPAA	83,7
3,4-Dihydroxybenzoesäure	DHBA	3,8
4-Methylcatechol	4MC	95,0
(-)-Chinasäure	QiA	<1

Zusammengefasst zeigen die Versuche mit Polyphenolen und ihren Abbauprodukten, dass nur Substanzen die eine 3,4-Dihydroxyphenyl- oder *ortho*-Catechol-Struktur besitzen, zur H_2O_2-Bildung befähigt sind. Von den untersuchten Substanzen waren dies Rut, Que, Epi, ChA, CaA, DHPAA, DHCaA und 4MC. Substanzen ohne Phenylgruppe (wie (-)-Chinasäure) oder Stoffe die nur einen monohydroxylierten Phenylring (wie CuA, 3-

und 4HPPA) oder eine *meta*-Catechol-Struktur (2,4-Dihydroxyphenylgruppe, z.B. Pt, Pz, Pxg) aufweisen waren dagegen zur H_2O_2-Bildung nicht in der Lage. Auch Miura et al. erkannten die Notwendigkeit einer *o*-Catechol- oder Pyrogallol-Gruppe für die Bildung von H_2O_2 in wässriger Lösung [Miura et al., 1998]. Eine Sonderstellung unter den untersuchten Substanzen nahm die 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA) ein, die trotz *o*-Catechol-Struktur nur geringste Mengen an H_2O_2 produzierte. Dies könnte auf der direkt am aromatischen Ring sitzenden Carboxylgruppe beruhen, die auf Grund ihres nukleophilen Charakters die Bindungsdissoziationsenergie der phenolischen Hydroxylgruppe in *para*-Position erhöht und damit eine Oxidation der Catechol-Struktur erschwert [Brigati et al., 2002].

Beim Vergleich der verschiedenen Phenolsäuren ließen sich, neben der Notwendigkeit der *o*-Catechol-Gruppe, noch weitere Strukturmerkmale finden, die einen Einfluss auf die prooxidative Wirksamkeit haben: während die Länge der Seitenkette mit Ausnahme der C1-Kette von DHBA keinen Einfluss auf die H_2O_2-Bildung zu haben schien (DHBA << DHPAA $\approx$ DHCaA) wurde durch Einführen einer konjugierten Doppelbindung in die Seitenkette die H_2O_2-Bildung verringert (CaA < DHCaA). Auch die Inaktivierung der Carboxylgruppe durch Veresterung mit QiA setzte die prooxidative Wirksamkeit der Kaffeesäure herab (ChA < CaA).

4.4.4. Zusatz antioxidativer Enzyme

Durch Supplementierung des Zellkultur-Mediums mit antioxidativ wirksamen Enzymen könnten eventuell auftretende Artefakte in zellbasierten Assays vermieden werden, da diese Enzyme gebildete ROS effizient inaktivieren. Es wurden Substanzen, die sich als H_2O_2-Bildner erwiesen hatten vergleichend mit und ohne Zusatz von Katalase (KAT) bzw. Superoxid-Dismutase (SOD) inkubiert und nach 24h der H_2O_2-Gehalt des Mediums gemessen. Diese Enzyme wurden ausgewählt weil ihre Substrate H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$ in der Literatur als mögliche Produkte der Polyphenol-Oxidation in wässriger Lösung diskutiert werden [Amorati et al., 2006; Metodiewa et al., 1999] und sie (anders als z.B. GPx) keine zusätzlichen Cofaktoren benötigen.

Katalase (CAT)

Durch Zugabe von CAT (100 U/mL) ins Medium konnte die H_2O_2-Konzentration bei 24h-Inkubation mit Polyphenolen effizient vermindert werden. Für alle untersuchten Polyphenole (Rut, Que, ChA, CaA; je 1 – 100 µmol/L) führte die Coinkubation mit CAT zu H_2O_2-Konzentrationen <1µmol/L.

Dieser Effekt, der durch Arbeiten anderer Gruppen bestätigt wurde [Halliwell, 2008; Kern et al., 2007; Lapidot et al., 2002] lässt den Schluss zu, dass die mit dem FOX1-Assay detektierbaren ROS zum überwiegenden Teil H_2O_2 sind. Diese Beobachtung könnte auch auf der relativ hohen Stabilität von H_2O_2 im Vergleich zu anderen ROS beruhen (vgl. Tabelle 3.2) so dass andere ROS gebildet aber auf Grund ihres schnellen Zerfalls nicht detektiert werden können.

Superoxid-Dismutase

Wurde der Inkubationsansatz (Medium + Polyphenol / AE) statt mit CAT mit 100 U/mL SOD supplementiert zeigten sich je nach Substanz unterschiedliche Ergebnisse (siehe Abbildung 4.24). Bei AE07 und Que wurde die H_2O_2-Konzentration durch SOD-Zugabe deutlich signifikant verringert (Absenkung auf 8 bzw. 12 µmol/L), wenn auch nicht so effektiv wie durch CAT. Bei den beiden Hydroxyzimtsäurederivaten ChA und CaA bewirkte die Inkubation in Anwesenheit von SOD dagegen eine Erhöhung der extrazellulären H_2O_2-Konzentration auf 150 % bzw. 113 % des Wertes ohne SOD-Zusatz.

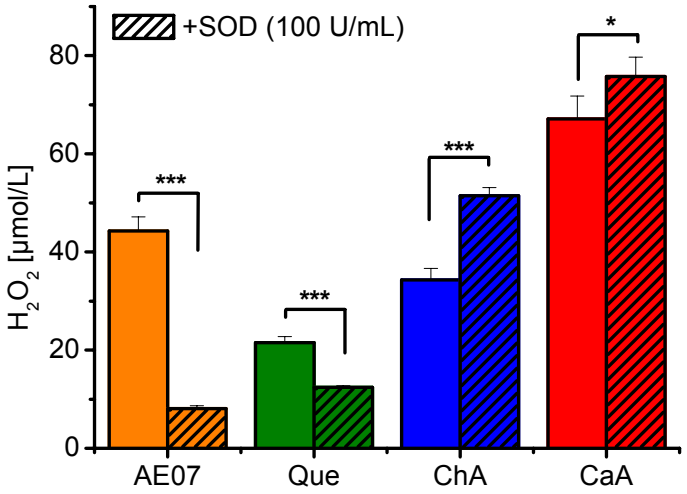


Abbildung 4.24: H_2O_2-Konzentration in DMEM nach 24h Inkubation mit AE07 (100 µg/mL), Que, ChA und CaA (je 100 µmol/L) mit/ohne SOD (100 U/mL). MW + SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung mit/ohne SOD: *p<0,05 ***p<0,001

Die substanzabhängige Modulation des H_2O_2-Levels durch SOD bestätigt die Anwesenheit von $O_2^{\bullet-}$ während der Autoxidation der inkubierten Polyphenole, was auch in anderen Studien diskutiert wurde [Duarte et al., 2004; Hodnick et al., 1988; Murakami et al., 2007]. Die beobachtete Erhöhung der H_2O_2-Konzentration lässt sich aus dem Reaktionsmechanismus von $O_2^{\bullet-}$ ableiten: Polyphenole sind in der Lage, O_2 zu $O_2^{\bullet-}$ zu reduzieren, welches dann durch SOD zu H_2O_2 reduziert wird. So kann auch $O_2^{\bullet-}$, das

sonst evtl. während der Inkubation zerfallen wäre, zur gemessenen H_2O_2-Konzentration beitragen und diese erhöhen [Murakami et al., 2007]. Die Verringerung des H_2O_2-Gehaltes im Medium durch SOD-Zugabe könnte durch ein Abfangen von schon vorhandenem $O_2^{\bullet-}$ bedingt sein, welches dann nicht mehr als Oxidationsmittel für Polyphenole zur Verfügung steht. Dadurch wird die Bildung des wesentlich reaktiveren Semichinons verhindert welches, im Gegensatz zum Hydrochinon, in der Lage ist O_2 zu reduzieren [Baez et al., 1995].

Fasst man die Ergebnisse zur Modulation des extrazellulären H_2O_2-Gehaltes durch Supplementierung mit den antioxidativen Enzymen SOD und CAT zusammen so zeigt sich, dass zur Minimierung von H_2O_2 im Medium eindeutig CAT das Enzym der Wahl ist, da es die H_2O_2-Konzentration bei allen Substanzinkubationen auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle reduzierte. SOD dagegen zeigte eine substanzabhängige Reduktion oder Erhöhung des H_2O_2-Level, und ist somit als Supplement ungeeignet.

4.4.5. Einfluss von extrazellulärem H_2O_2 auf zelluläre Marker

Da die bisher vorgestellten Ergebnisse einer Beurteilung der prooxidativen Wirkung von Polyphenolen *in vivo* dienen sollen wurde dieser Effekt im Folgenden im zellulären System getestet. Dazu wurden Zellen der Linie HT-29 entsprechend dem Standardprotokoll in Petrischalen ausgesät, für 24h anwachsen gelassen und dann 24h mit Polyphenolen inkubiert.

4.4.5.1. H_2O_2-Konzentration im Medium

Durch Anwesenheit von HT-29 Zellen wurde der H_2O_2-Gehalt im Zellkulturmedium für alle vier untersuchten Substanzen (Que, Rut, ChA und CaA; je 1 – 100 µmol/L) auf das Niveau der Lösemittelkontrolle (1 % DMSO) verringert. Dies könnte auf einen Abbau entstehender ROS durch antioxidative Enzyme der Zellen zurückzuführen sein [Lapidot et al., 2002]. Vermutlich trägt auch die Verringerung des Medium-pH-Wertes durch saure Metabolisierungsprodukte der Zellen (z.B. Lactat) zum beobachteten Effekt bei, da ein saurer pH-Wert (wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben) die Bildung von H_2O_2 im Medium verhindert [Wee et al., 2003].

Des Weiteren wurde der Einfluss von extrazellulärem H_2O_2 auf tGSH-Gehalt und TBH-induzierten ROS-Level von HT-29 Zellen ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit Quercetin (1 – 300 µmol/L bzw. 0,3 – 100 µmol/L) inkubiert, dessen deutliche Wirkung auf beide Marker bekannt ist [Schäfer et al., 2006a]. Um den Einfluss des H_2O_2 im Medium auf die Marker abschätzen zu können wurden die Inkubationen vergleichend mit und ohne Zugabe von 100 U/mL CAT durchgeführt.

4.4.5.2. Glutathion

Die Inkubation von HT-29 Zellen mit Que in Konzentrationen von 10 – 100 µmol/L führte zu einer signifikanten Steigerung des Gesamt-Glutathionspiegels (tGSH = GSH + GSSG) (Abbildung 4.25).

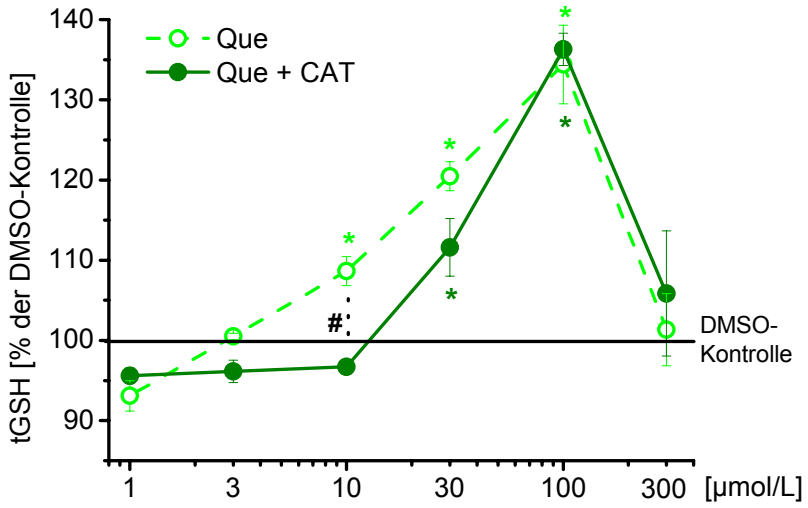


Abbildung 4.25: tGSH-Spiegel in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit Quercetin mit/ohne Katalase (CAT; 100 U/mL). MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Versuchen. Signifikanter Unterschied zur Lösemittelkontrolle (DMSO): *p<0,05 . Signifikanter Unterschied mit/ohne CAT: #p<0,05

Auch bei der Inkubation mit CAT zeigte sich der konzentrationsabhängige Anstieg der tGSH-Konzentration, der jedoch erst bei einer höheren Konzentration begann, was bei 10 µmol/L Que zu einem signifikanten Unterschied der Inkubation ± CAT führte. Dies belegt, dass der tGSH-Spiegel bei Inkubation von Que ohne CAT (= mit extrazellulärem H_2O_2) effektiver induziert wird als in Abwesenheit von extrazellulärem H_2O_2 welches, zumindest in moderaten Konzentrationen, die GSH-Synthese induzieren kann.

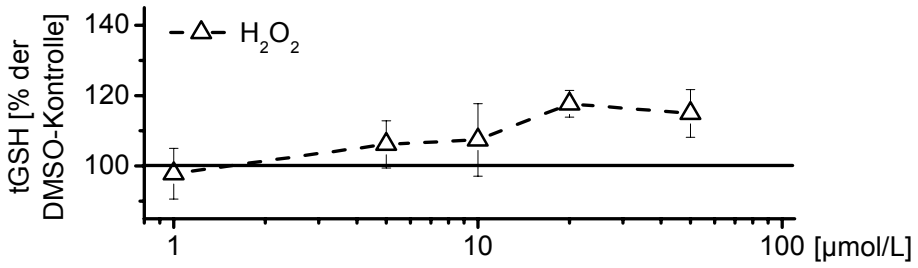


Abbildung 4.26: tGSH-Spiegel in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit H_2O_2. MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Versuchen.

Zusätzlich wurde eine Inkubation mit H_2O_2 an Stelle von Que durchgeführt, welches auch in der Lage war, den GSH-Spiegel in HT-29 Zellen konzentrationsabhängig zu erhöhen (Abbildung 4.26).

Eine ähnliche Erhöhung des GSH-Gehaltes von Epithelzellen nach moderater H_2O_2-Exposition wurde ebenfalls von Day & Suzuki beschrieben [Day und Suzuki, 2005] und könnte auf einer Induktion des ARE beruhen, welches die Genexpression der beiden an der GSH-Synthese beteiligten Enzyme γ-Glutamylcystein-Ligase (γGCL) und GSH-Synthase reguliert und durch H_2O_2 aktiviert werden kann [Lee-Hilz et al., 2006].

Bei 300 µmol/L Que fiel der GSH-Spiegel wieder auf das Niveau der Lösemittelkontrolle; vermutlich als cytotoxische Reaktion der Zellen auf die hohe Quercetin-Konzentration [Agullo et al., 1994; Schäfer, 2006]. Wurde statt Que ein stärkerer H_2O_2-Bildner wie CaA verwendet, zeigte sich kein signifikanter Unterschied einer Inkubation mit/ohne CAT (siehe Anhang). Allerdings ist bei dieser Substanz auch die induzierende Wirkung auf den GSH-Spiegel nicht so groß wie bei Que [Schäfer, 2006]. Deshalb kann angenommen werden, dass sich die stimulierende Wirkung des H_2O_2 entweder nur bei Substanzen auswirkt, die in der Lage sind den GSH-Spiegel stark zu erhöhen oder dass die günstigen Effekte die durch moderate H_2O_2-Mengen ausgelöst werden, bei zu hohen H_2O_2-Konzentration (wie z.B. bei 300 µmol/L Que oder CaA) wieder verschwinden; eine wachstumshemmende Wirkung durch extrazelluläres H_2O_2 wurde in keinem Versuch beobachtet.

4.4.5.3. Zellulärer ROS-Level

Der TBH-induzierte, zelluläre ROS-Level wurde durch Inkubation mit Que (0,3 – 100 µmol/L) konzentrationsabhängig vermindert, wobei sich bei Inkubation mit/ohne CAT keine signifikanten Unterschiede zeigten (Abbildung 4.27 oben). Daher kann vermutet werden, dass die Reduktion des zellulären ROS-Levels eher auf der antioxidativen Wirkung des Que beruht als auf der von generiertem H_2O_2. Wurde stattdessen nur mit H_2O_2 inkubiert, zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Depletion des TBH-induzierten ROS-Levels im Bereich 0,3 – 100 µmol/L (Abbildung 4.27 unten).

H_2O_2 ist zwar eine reaktive Sauerstoff-Spezies, aber es ist zu reaktionsträge um die Sonde DCFH zu oxidieren (siehe Tabelle 3.8). Außerdem werden die Zellen nach der H_2O_2-Inkubation mit PBS gewaschen, so dass eine Oxidation des Markers DCFH durch extrazelluläres H_2O_2 nicht wahrscheinlich ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Inkubation mit moderaten Mengen H_2O_2 induzierend auf die antioxidative Abwehr der Zellen wirken könnte, eventuell über Induktion des ARE [Lee-Hilz et al., 2006; Wijeratne et al., 2005].

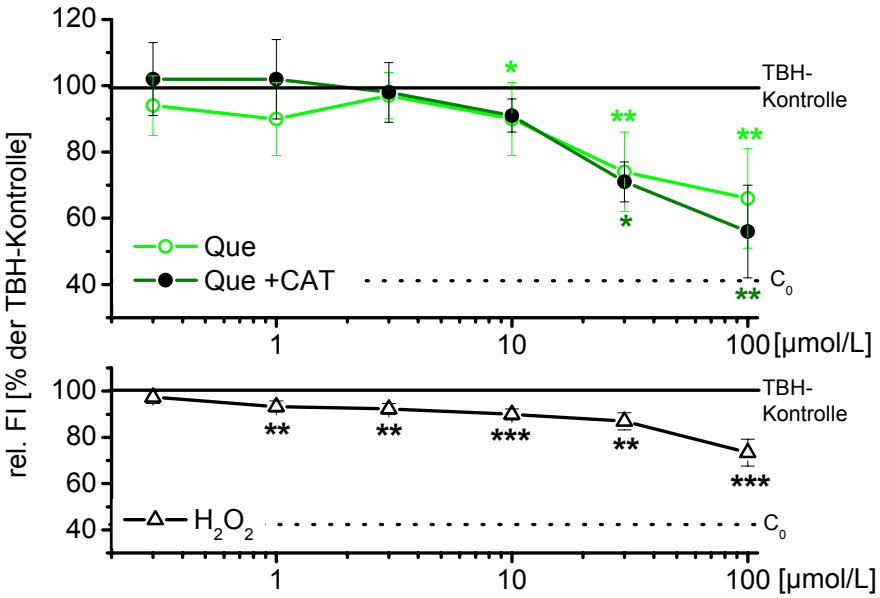


Abbildung 4.27: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29 Zellen nach 24h Inkubation mit 0,3 – 100 µmol/L Que (± CAT 100 U/mL) bzw. 0,3 – 100 µmol/L H_2O_2. MW ± SD aus n=3-4 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur TBH-Kontrolle: *p<0,05 **p<0,01

Wie beim tGSH-Level zeigte sich auch hier kein Unterschied einer Inkubation von HT-29 Zellen mit ChA und CaA mit/ohne CAT (Abbildung siehe Anhang).

4.4.6. Zusammenfassung der prooxidativen Wirkung von Polyphenolen

Apfelsaft-Polyphenole waren in der Lage, während ihrer Inkubation in Zellkultur-Medium H_2O_2 zu bilden. Als notwendige Strukturvoraussetzung für diese prooxidative Wirksamkeit konnte die *o*-Catechol-Struktur (3,4-Dihydroxyphenylgruppe) identifiziert werden. Die H_2O_2-Bildung variierte substanzspezifisch und stieg zumeist linear mit Inkubationsdauer und Konzentration. Unter den untersuchten Apfelsaft-Polyphenolen bildeten die Hydroxyzimtsäuren ChA und CaA das meiste H_2O_2, gefolgt von den Flavonoiden Epi, Que und Rut, welches hier nur schwach wirksam war. Die Dihydrochalcone (Pt, Pz, Pxg) bildeten keine signifikanten Mengen an H_2O_2, entsprechend ihrer fehlenden *o*-Catechol-Gruppe. Auch die polyphenolreichen AEs produzierten unter Inkubationsbedingungen H_2O_2. Wie bei den Einzelsubstanzen stieg die gebildete H_2O_2-Menge mit Inkubationszeit und AE-Konzentration nahezu linear an. Als wesentliche AE-Inhaltsstoffe für die H_2O_2-Bildung wurden Hydroxyzimtsäuren identifiziert, während die Quercetin-Glykoside invers

mit dem gebildeten H_2O_2 korrelieren, ebenso wie die enthaltene Menge an Oligosacchariden.

Die entstehende H_2O_2-Menge war dabei stark vom verwendeten Medium abhängig: während in DMEM eine starke H_2O_2-Bildung beobachtet werden konnte, war die Konzentration in DMEM/F12 nicht messbar. Dabei hing die H_2O_2-Bildung stark vom pH-Wert des Mediums ab, da ein hoher pH-Wert (durch leichtere Deprotonierung zum Phenolat-Anion) die prooxidative Wirkung der Polyphenole fördert. Auch der Abbau von vorhandenem H_2O_2 variierte in den Medien; dieser war in DMEM/F12 wesentlich effektiver als in DMEM.

Durch Supplementierung des Mediums mit 100 U/mL CAT konnte entstandenes H_2O_2 vollständig abgebaut werden. Eine substanzabhängige Modulation der H_2O_2-Konzentration wurde dagegen durch Zugabe von SOD erreicht, was für eine Beteiligung von Superoxidradikal-Anionen an der Autoxidation der Polyphenole spricht.

Der Einfluss des extrazellulären H_2O_2 auf zelluläre Marker wurde durch vergleichende Inkubation von Polyphenolen ±CAT untersucht. Dabei zeigte sich, dass moderate Mengen an H_2O_2 die induzierende Wirkung von Polyphenolen auf den zellulären GSH-Spiegel unterstützten, während bei Substanzen die keinen Einfluss auf den GSH-Spiegel haben (wie CaA, ChA), keine H_2O_2-spezifische Modulation des tGSH-Spiegels festgestellt wurde. Dies könnte ein substanzspezifischer Effekt sein, oder durch die gebildeten größeren H_2O_2-Mengen bedingt. Auch der zelluläre, TBH-induzierte ROS-Level wurde durch extrazellulär gebildetes H_2O_2 nicht signifikant beeinflusst.

Zusammengefasst zeigte sich eine deutliche prooxidative Wirkung von Polyphenolen mit *o*-Catechol-Gruppe im zellfreien System. Bei Anwesenheit von Zellen war kein H_2O_2 mehr detektierbar, dieses wurde wahrscheinlich von den Zellen inaktiviert. Die zellulären Assays wurden durch Polyphenol-generierte ROS nur minimal beeinflusst; bei fast allen untersuchten Substanzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit/ohne extrazelluläres H_2O_2. Einzig der durch Quercetin bewirkte Anstieg des tGSH-Spiegels fand in Anwesenheit von H_2O_2 schon bei kleineren Konzentrationen statt als ohne H_2O_2.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die *in vitro* beobachtete artifizielle ROS-Generierung durch Polyphenole wahrscheinlich keine negativen Auswirkungen auf Darmzellen hat. Auch die Evaluation verschiedener *in vivo*-Studien durch Halliwell et al. ergab keine Hinweise auf eine systemische prooxidative Wirkung von mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenolen [Halliwell et al., 2005].

5. Diskussion und Ausblick

Die protektive Wirkung von Äpfeln und Apfel-Produkten auf die Genese von Darmkrebs und entzündlichen Darmerkrankungen wurde durch mehrere epidemiologische Studien belegt [Deneo-Pellegrini et al., 1996; Gallus et al., 2005; Michels et al., 2006]. Auf Grund der komplexen Zusammensetzung dieser Nahrungsmittel und seiner Wechselwirkungen im menschlichen Körper ist allerdings schwer zu erfassen, welche Inhaltsstoffe für diese Wirksamkeit verantwortlich sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das antioxidative Potenzial verschiedener phenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe und -extrakte mittels Markern oxidativer Zellschädigung und Zellantwort in der humanen Kolonzelllinie Caco-2 zu charakterisieren um zu ergründen, welche Bestandteile ein präventives Potential auf die Genese von Darmerkrankungen haben. Die Einbeziehung des intestinalen Metabolismus durch Untersuchung fermentierter Apfelsaftinhaltsstoffe und intestinaler Abbauprodukte sollte eine Abschätzung der *in vivo*-Situation erlauben.

Von der Forschungsanstalt Geisenheim wurden dazu **polyphenolreiche Extrakte aus Apfelbestandteilen** bereitgestellt, die zum größten Teil aus gemischten Mostäpfeln gewonnen wurden (AE05, AE06, AE07). Die Polyphenol-Fraktion der Extrakte bestand zum größten Teil aus Hydroxyzimtsäuren (v.a. Chlorogensäure und 4-Cumaroylchinasäure) und oligomeren Procyanidinen; des Weiteren waren auch Dihydrochalcone und Flavonoide (Flavanole und Flavonole) enthalten.

Neben der Sortenauswahl wurden auch verschiedene technologische Aspekte der Extraktherstellung variiert, um das Polyphenolprofil der Säfte zu variieren und die Ausbeute an Polyphenolen zu steigern. Dazu wurde in die Untersuchungen noch ein Extrakt aus Tresterextraktionssaft (AE06B, Freisetzung von Polyphenolen durch enzymatischen Aufschluss des Tresters) mit einbezogen. Außerdem wurden zwei Extrakte untersucht, die ausschließlich aus Apfelschalen extrahiert wurden (GS aus Granny Smith-Schalen und PE aus den Schalen verschiedener Tafeläpfel). Da die antioxidativ äußerst wirksamen Flavonole (Quercetin-Glykoside) zum größten Teil in der Apfelschale lokalisiert sind, könnte deren Extraktion zu Produkten mit außerordentlich hoher Wirksamkeit führen. Diese beiden Extrakte hatten, im Gegensatz zu den AEs, einen sehr hohen Flavonol-Gehalt. Der untersuchte Konzentrationsbereich der Extrakte lag mit 1 – 100 µg/mL in einem Bereich, der nach Aufnahme von Apfelsaft im Darm erreicht werden kann [Kahle et al., 2007; Kahle et al., 2005b].

Die Wirksamkeit der in dieser Arbeit untersuchten Extrakte unterschied sich deutlich voneinander und ist in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Wirksamkeit von Apfelsaft- und Schalenextrakten. Angegeben sind der antioxidativ wirksame Konzentration(sbereich) [µg/mL] sowie die maximale Wirkstärke. Ausnahme ORAC/TEAC, die in [mM Trolox] angegeben sind.

Endpunkt		AE05	AE06	AE06B	AE07	GS	PE
TEAC [mM Trolox] [a)]		4,1	6,5	3,4	5,3	4,1	4,7
ORAC [mM Trolox] [a)]		6,1	6,1	4,5	6,3	5,8	5,4
tGSH-	oC [b)]	---	100	--- [d)]	30-100	100	100
Spiegel	WS [c)]		+11		+12	+16	+16
ROS-	oC [b)]	100	1	10	0,3-100	1-100	100
Level	WS [c)]	-12	-25	-31	-38	-29	-24
DNA-	oC [b)]	3	1	3	30	3	10-30
Schäden	WS [c)]	-50	-27	-47	-36	-54	-23

[a)] Konzentration einer Trolox-Lösung (in mmol/L) mit der gleichen antioxidativen Wirksamkeit wie eine Extraktlösung der Konzentration 1 mg/mL
[b)] oC: Konzentrationsbereich mit optimaler Wirkstärke, angegeben in [µg/mL]
[c)] WS: Wirkstärke: gibt an, um wie viel Prozent der Endpunkt im Vergleich zur (Oxidans)-Kontrolle moduliert wurde.
[d)] GSH-Depletion um 17% bei 100 µg/mL
---: kein Effekt

Zusätzlich zu dem bei [Schäfer, 2006] verwendeten TEAC-Assay zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität wurde in dieser Arbeit zusätzlich der ORAC-Assay etabliert, der auf einem anderen Reaktionsmechanismus beruht. Während der ORAC-Assay vor allen Dingen die Fähigkeit zum HAT misst, werden über den TEAC überwiegend ET-Prozesse bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.3.1, Seite 55). Die Ergebnisse der beiden Assays ergeben somit ein breiteres Bild der antioxidativen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen. Alle Extrakte zeigten eine deutliche antioxidative Wirksamkeit in beiden Systemen, wobei die Assays auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsmechanismen wie erwartet unterschiedliche Werte zeigten - die höchsten Werte lieferten AE076 und AE07. Die Korrelation der ORAC/TEAC-Ergebnisse zeigte, dass beide Methoden untereinander nicht korrelierten; dies beweist die Beteiligung beider Mechanismen an der radikalabfangenden Wirksamkeit der Extrakte. Der tGSH-Spiegel von Caco-2 Zellen wurde am besten durch Inkubation mit Schalenextrakten (GS, PE) bzw. AE07 gesteigert. GS und AE07 bewirkten auch die effektivste Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels, während oxidative DNA-Schäden am besten durch GS, AE05 und AE06B reduziert wurden. Obwohl AE07 und GS in vielen Endpunkten gute Ergebnisse erzielten war kein direkter Zusammenhang zwischen antioxidativer Wirkung und protektiver Wirkung im zellulären System erkennbar. Die Ergebnisse zur Verringerung oxidativer Zellschäden durch Apfelsaftextrakte/-Inhaltsstoffe sprechen dafür, dass nach 24h Inkubationszeit weniger radikalabfangende

sondern vielmehr zellvermittelte Mechanismen bei der protektiven Wirksamkeit der Extrakte vor oxidativen Zellschäden eine Rolle spielen.

Die Bedeutung der Modulation zellulärer Mechanismen durch Polyphenole wurde auch schon früher im Rahmen des BMBF-Netzwerkprojektes beobachtet: S. Schäfer konnte zeigen, dass die Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen nach 2h Inkubation mit AEs weniger ausgeprägt war als nach 24h [Schäfer, 2006]. Dies unterstreicht die Bedeutung der zellulären antioxidativen Abwehr bei der protektiven Wirksamkeit der Polyphenole. Da die direkte antioxidative Kapazität der AEs nach einer Inkubationsdauer von 24h, bedingt durch Abbaureaktionen, keinen größeren Anteil an der Wirksamkeit mehr hat ist eine Modulation der zellulären antioxidativen Abwehr als bedeutender anzusehen. Dies zeigte sich auch in der beobachteten Modulation der SOD1-Protein-Expression in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit Apfelsaft- und Schalenextrakten sowie die Veränderungen der Aktivität von SOD, CAT sowie GPx, deren Hauptaufgabe die Detoxifizierung reaktiver Sauerstoff-Spezies ist [Cullmann, 2009; Digles, 2008]. Weitere *in vitro*-Studien mit Apfelsaftextrakten innerhalb des Netzwerkes stützen die beobachtete Veränderung der zellulären Abwehr durch polyphenolische Extrakte aus Apfelsaft: die Behandlung von HT-29 oder LT-97 Zellen mit AEs führte zur Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme des Phase I und II-Metabolismus (v.a. CYP, UGT, GST und SULT) [Pool-Zobel et al., 2005; Veeriah et al., 2006; Veeriah et al., 2008].

Es ist erkennbar, dass die Apfelsaftextrakte in der Lage sind, oxidative Zellschäden zu reduzieren, wozu unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Die direkte antioxidative Kapazität der Polyphenole ist vor allen Dingen ein Kurzzeiteffekt, der ROS im Darmlumen inaktivieren könnte. Durch Induktion der zellulären Abwehr könnte dagegen ein nachhaltiger Schutz der Darmzellen vor oxidativem Stress erreicht werden, was entscheidend zur protektiven Wirkung von Apfelsaft und anderen Apfelprodukten vor ROS-assoziierten Erkrankungen wie Darmkrebs oder entzündlichen Darmerkrankungen beitragen könnte. Daneben ist auch eine wachstumshemmende Wirksamkeit von Apfelsaftextrakten/-inhaltsstoffen auf Darmkrebszellen bekannt [Fridrich et al., 2007; Kern et al., 2005; Veeriah et al., 2006], welche ebenfalls zum Schutz vor Darmkrebs durch Apfelsaftkonsum beitragen könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Apfelsaft- und Schalenextrakte stellen ein Gemisch verschiedener Inhaltsstoffe dar, die sich in die Hauptkomponenten (monomere) Polyphenole, (oligomere) Procyanidine und Oligo-/Polysaccharide auftrennen lassen. Während die niedermolekularen Polyphenole gut charakterisiert sind und sich in die Untergruppen Flavanole, Dihydrochalcone, Hydroxyzimtsäuren und Flavonole unterteilen lassen (von denen in jeder Gruppe mehrere Einzelsubstanzen identifiziert sind), kann die

genaue Zusammensetzung der Oligosaccharide und Procyanidine nicht angegeben werden, so dass diese jeweils nur als Summe erfasst wurden.

Zur Identifizierung von Substanzen, die zur antioxidativen Kapazität der Extrakte beitragen, wurde eine lineare Regression zwischen ORAC/TEAC-Werten und der Menge der Inhaltsstoffe durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die zellfreie antioxidative Wirksamkeit (ORAC) der Extrakte von der Gesamtmenge der Polyphenole determiniert wird, während die Ergebnisse des TEAC-Assay vor allem vom Procyanidin-Gehalt der Extrakte abhängt. Es wird vermutet, dass die antioxidative Kapazität dieser oligomeren Catechine annähernd linear von deren Polymerisierungsgrad abhängt, da die TEAC-Werte von Procyanidin B_1 und B_2 nahezu der Summe ihrer Monomere entsprechen [Soobrattee et al., 2005]. Die berechneten Korrelationen zwischen der Konzentration einzelner Extrakt-Inhaltsstoffe/Polyphenol-Gruppen und antioxidativer Wirkung stimmen mit Arbeiten anderer Gruppen überein [Kedage et al., 2007; Luximon-Ramma et al., 2005; Mahattanatawee et al., 2006; Soobrattee et al., 2008].

Ein Vergleich der zellulären Endpunkte mit der Konzentration einzelner Extrakt-Inhaltsstoffe legte nahe, dass vor allen Dingen zwei Gruppen von Polyphenolen für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten: Quercetin-Glykoside und oligomere Procyanidine. Die Quercetin-Glykoside und vor allem ihr Aglykon Quercetin sind auf Grund ihrer hohen antioxidativen Kapazität gut untersuchte Substanzen mit einem hohen Potential zur Verringerung oxidativer Zellschäden. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Apfelschalenextrakte enthielten besonders hohe Mengen dieser Verbindungen, zeigten eine gute antioxidative Kapazität und reduzierten die Marker oxidativer Zellschädigung deutlich. Ähnliche Effekte konnten auch Schäfer et al. mit Quercetin und dem Tresterextrakt AE03B nachweisen [Schäfer et al., 2006a]. Quercetin bewirkt außerdem eine Verringerung oxidativer DNA-Schäden, [Aherne und O'Brien, 2000; Schäfer et al., 2006a] eine Induktion von GSH-Spiegel (bedingt durch Erhöhung der γGCL-Aktivität [Scharf et al., 2003]) und antioxidativen Enzymen [Nagata et al., 1999].

Auch Procyanidine zeigten in mehreren Studien protektive Effekte, sind aber auf Grund ihrer begrenzten Stabilität [Hümmer und Schreier, 2008] schwerer zu untersuchen, so dass meistens nicht Reinstoffe sondern procyanidin-angereicherte Lebensmittel bzw. Extrakte untersucht wurden. *In vitro*-Versuche zeigten eine hohe antioxidative Kapazität [Kim und Yokozawa, 2009; Oszmianski et al., 2007; Soobrattee et al., 2005], Induktion antioxidativer Enzyme [Du et al., 2007] und Erhöhung des GSH-Spiegels [Kim und Yokozawa, 2009]. Die Reduktion von ACF im Kolon von DMH-initiierten Ratten speziell durch trüben Apfelsaft wurde dem Gehalt des verwendeten Apfelsaftes an Procyanidinen (im Trub) zugeschrieben [Barth et al., 2005]. Eine wichtige Rolle spielen dabei auch Größe/Polymerisierungsgrad der Procyanidine, da festgestellt wurde, dass höhere

Oligomere mit >3 Flavanol-Einheiten von Zellen nicht mehr aufgenommen werden und damit keine Wirkung haben dürften [Rasmussen et al., 2005]. Es könnte jedoch möglich sein, dass niedermolekulare Verbindungen durch Bindung an Trubbestandteile stabilisiert werden, was einen effektiveren Transport ins Kolon ermöglichen könnte [Barth et al., 2007]. Im Gegensatz dazu beobachteten Pierini et al. eine Apoptose-Induktion in Ösophageal-Karzinom-Zellen nur bei höheren Procyanidin-Oligomeren (>2), während die mono- und dimeren Catechine bei diesem Endpunkt keine Wirkung hatten [Pierini et al., 2008]. Diese kontroversen Ergebnisse zeigen, dass Untersuchungen zur Wirkung oligomerer Procyanidine in Zukunft intensiviert werden müssen, da bislang kaum Informationen zur Wirkung dieser Verbindungsklasse vorliegen.

Ein Problem bei der Untersuchung komplexer Mischungen ist das Auftreten synergistischer oder antagonistischer Effekte, deren Untersuchung bei der Vielzahl identifizierter Inhaltsstoffe aber einen immensen Probenaufwand erfordern würde. Synergistische Effekte von Lebensmittelinhaltsstoffen auf die Prävention von Krebs sind bekannt, eine Übersicht gibt [de Kok et al., 2008].

Die Ergebnisse der Extrakte zeigen, dass sich die Wirksamkeit einer Mischung verschiedenster Inhaltsstoffe nur bedingt auf einzelne Substanzen zurückführen lässt. Dies berücksichtigten auch Schäfer et al., die verschiedene **Einzelstoffe** alleine bzw. in Kombination untersucht hatten, was der Identifizierung wirksamer Strukturen dienen sollte [Schäfer et al., 2006a; Schäfer et al., 2006b].

In der vorliegenden Arbeit wurde die antioxidative Kapazität der Leitsubstanzen der verschiedenen Polyphenol-Gruppen mit dem neu etablierten ORAC-Assay bestimmt. Der Vergleich mit den Werten von [Schäfer et al., 2006a] zeigt, dass die Reihung der Substanzen nach Wirksamkeit bei beiden Assays ähnlich war: Flavonole zeigten die höchsten Werte, die untersuchten Hydroxyzimtsäuren waren weniger wirksam. Ausnahmen waren Phloretin und (-)-Epicatechin, die im Vergleich zu den anderen Substanzen im ORAC-Assay die niedrigste und im TEAC-Assay eine mittlere bis hohe Wirksamkeit aufwiesen. Diese Unterschiede erklären auch die unterschiedliche Wirksamkeit der Apfelsaft-Extrakte.

Des Weiteren wurde mit der Erfassung der SOD1-Expression in Caco-2 Zellen ein Marker etabliert, der eine direkte Aussage über die zelluläre antioxidative Abwehr erlaubt. Die Ergebnisse zeigten, dass die größte Induktion der SOD1 durch Dihydrochalcone und Flavonoide verursacht wurde, während die Hydroxyzimtsäuren nahezu keine Wirkung zeigten. Übereinstimmend bewirkte auch die Inkubation besonders Phenolsäure-reicher AEs keine deutliche Steigerung der SOD1-Inkubation, während die beobachtete Induktion der SOD1-Expression durch AE03B, AE07 und PE keinem Inhaltsstoff eindeutig zuzuordnen war.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen, dass polyphenolreiche Extrakte aus Apfelprodukten eine deutliche antioxidative Kapazität besitzen, die von der Zusammensetzung der Extrakte abhängt. Die nachgewiesenen protektiven Effekte auf Darmzellen *in vitro* gründen sich, vor allem nach längerer Inkubationszeit, auf eine Induktion der zellulären Abwehr.

Aufbauend auf den bereits gewonnenen Erkenntnissen zur antioxidativen Wirksamkeit der Apfelsaftextrakte *in vitro* wurde die **Auswirkung des intestinalen Metabolismus/Polyphenol-Abbaus** im Gastrointestinaltrakt auf die Wirksamkeit von Apfelsaft-Extrakten geprüft. Untersucht wurden zwei AEs, welche anaerob mit humanen Fäzes inkubiert wurden (durchgeführt von AG Pool-Zobel an der Friedrich Schiller-Universität Jena). Die Inkubation humaner Darmzellen mit den entsprechenden Fermentationsüberständen sollte in Annäherung an die *in vivo*-Situation einen besseren Einblick auf die präventive Wirkung von Apfelsäften im Darm erlauben.
Die Prüfung dieser **fermentierten Apfelsaftextrakte** auf protektive Wirksamkeit gegen oxidative Zellschäden hatte eine deutliche, im Vergleich zu den Ausgangsextrakten jedoch abgeschwächte Wirkung gezeigt [Bellion, 2006]. Die Quantifizierung der in den AEs enthalten Polyphenole (durchgeführt von Projektpartnern der Universität Würzburg) ergab, dass der Gehalt der ursprünglichen Polyphenole durch die Fermentation um über 99 % verringert wurde [Knaup und Schreier, 2006, pers. Mitteilung]. Dies führt zur Vermutung, dass die während der Fermentation entstehenden Abbauprodukte der Polyphenole vermutlich ebenfalls eine deutliche antioxidative Wirksamkeit aufweisen; dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Abbauprodukte der Extrakt-Polyphenole mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS identifiziert und zum Teil auch quantifiziert. In den fermentierten Apfelsaftextrakten F-AE03 und F-AE04 (hergestellt aus AE03B und AE04) konnten, neben den Aglyka Quercetin und Phloretin, verschiedene Hydroxyphenolcarbonsäuren als Hauptabbauprodukte identifiziert werden, z.B. Dihydrokaffeesäure, 3-(3- und 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure, 3-Phenylpropionsäure, 3,4-Dihydroxyessigsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Außerdem waren noch Chinasäure, Phloroglucinol und, spezifisch in den 24h fermentierten F-AEs, 4-Methylcatechol nachweisbar. Die mittels externer Standards identifizierten Substanzen stimmten mit den in der Literatur beschriebenen intestinalen Abbauprodukten von Flavonoiden, Dihydrochalconen und Hydroxyzimtsäuren überein [Appeldoorn et al., 2009; Rechner et al., 2004; Schoefer et al., 2003] und wurden auch bei *in vivo*-Studien als Metabolite in Urin und Fäzeswasser identifiziert [Jenner et al., 2005; Olthof et al., 2003]. Die Quantifizierung ergab für Dihydrokaffeesäure und 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure die höchsten Konzentrationen, die mit bis zu 78 mg/g im Bereich der ursprünglich in den AEs enthaltenen Polyphenole

liegen (Chlorogensäure: 10 – 183 mg/g). Wie erwartet spiegelte die Verteilung der Abbauprodukte in den Fermentationsüberständen den Gehalt der jeweiligen Ausgangsverbindungen in den unfermentierten AEs wider.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit intestinaler Polyphenol-Abbauprodukte. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der fermentierten Apfelsaftextrakte aus [Bellion, 2006] mit aufgeführt.

Abbauprodukt	TEAC [mM Trolox] [a]	ROS-Level oC [b] | WS [c]	identifiziert in FAE03 6h	FAE03 24h	FAE04 6h	FAE04 24h
F-AE03 6h [d]	2,9	50 | -60				
F-AE03 24h [d]	2,1	50 | -45				
F-AE04 6h [d]	3,1	50 | -80				
F-AE04 24h [d]	2,9	50 | -70				
Quercetin	4,8	100 | -61	+	-	-	-
Phloretin	3,7	30 | -23	+	-	+	-
Dihydrokaffeesäure	1,2	100 | -23	+	+	+	+
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	2,7	---	+	+	+	+
3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure	1,3	100 | -12	+	+	+	+
3-Phenylpropionsäure	0,0	100 | -23	+	+	+	+
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure	3,2	100 | -37	+	+	-	-
3,4-Dihydroxybenzoesäure	1,1	3 | -28	+	+	+	+
4-Methylcatechol	1,3	100 | -73	-	+	-	+
Phloroglucinol	2,1	100 | -47	+	+	+	+

[a] Konzentration einer Trolox-Lösung (in mmol/L) mit der gleichen antioxidativen Wirksamkeit wie eine 1 mmol/L Lösung der Testsubstanz bzw. 1 mg/mL des Extraktes (zur Fermentation wurden 10 mg/mL AE verwendet).
[b] oC: Konzentrationsbereich mit optimaler Wirkstärke, angegeben in [µmol/L]
[c] WS: Wirkstärke: gibt an, um wie viel Prozent der Endpunkt im Vergleich zur (Oxidans)-Kontrolle moduliert wurde.
[d] Werte aus [Bellion, 2006]
---: kein Effekt

Die identifizierten phenolischen **Abbauprodukte** der Extrakt-Polyphenole wurden auf ihr Potential zur Verringerung des TBH-induzierten ROS-Levels in Caco-2 Zellen sowie auf ihre antioxidative Kapazität (TEAC) geprüft um festzustellen, ob diese Substanzen zur beobachteten antioxidativen Wirksamkeit der fermentierten AEs beitragen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass fast alle untersuchten Abbauprodukte eine deutliche antioxidative Kapazität von ≥1 mmol/L Trolox

aufwiesen. Einzige Ausnahmen waren (-)-Chinasäure und 3-Phenylpropionsäure mit 0 mmol/L Trolox, beides Verbindungen ohne die für die antioxidative Kapazität essentielle Phenol-Struktur [Rice-Evans et al., 1996]. Auch der zelluläre ROS-Level wurde durch einige Abbauprodukte stark reduziert; als wirksam erwiesen sich hier Substanzen mit einer Catechol-Struktur wie Dihydrokaffeesäure, 3,4-Dihydroxyessigsäure oder 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Eine ähnliche Wirksamkeit wurde auch für 3,4-Dihydroxybenzaldehyd beschrieben, das eine ähnliche Struktur wie die substituierte Benzoesäure aufweist [Jeong et al., 2009].

Der Vergleich der Wirksamkeit der identifizierten phenolischen Abbauprodukte zeigte durchgehend eine zwar deutliche, aber verringerte antioxidative bzw. protektive Wirksamkeit im Verlauf des Abbaus. Somit sollten intestinale Abbauprodukte, da sie noch Strukturmerkmale ihrer antioxidativ wirksamen Vorläufer besitzen, zur antioxidativen Wirksamkeit der Apfelsaftextrakte im Darm beitragen. Durch die Umwandlung der AE-Inhaltsstoffe in Abbauprodukte welche eine deutliche (wenn auch schwächere) Wirksamkeit aufweisen, lässt sich die geringere antioxidative Wirksamkeit der F-AEs im Vergleich zu den AEs erklären. Eine weitere Gruppe protektiv wirksamer Substanzen, die während der Fermentation entstehen sind SCFAs wie Acetat, Propionat oder Butyrat [Beyer-Sehlmeyer et al., 2003]. Es ist bekannt, dass diese chemopräventiv wirken und somit in der Lage sind, Darmzellen vor genotoxischen Schädigungen (z.B. durch ROS) zu schützen [Glei et al., 2006; Rosignoli et al., 2001]. Somit könnten auch sie zur protektiven Wirksamkeit intestinal metabolisierter Apfelsaftextrakte beitragen, zumal der SCFA-Gehalt der F-AEs mit 20 – 35 mmol/L in einem protektiv wirksamen Bereich liegt.

Als wichtige Quelle oligomerer Procyanidine wurde die protektive Wirksamkeit von Apfelsaft-**Trub** untersucht, welcher ein außerordentliches antioxidatives Potential besitzen könnte [Barth et al., 2007; Barth et al., 2005; Oszmianski et al., 2007]. Da Procyanidine auf Grund ihres hohen Molekulargewichtes und ihrer schlechten Wasserlöslichkeit kein Substrat für Darmzellen bilden wurde der Trub, wie in Abschnitt 3.6.5 beschrieben, anaerob fermentiert. In dieser Arbeit wurde der wässrige Fermentationsüberstand, im Vergleich zu einer Kontrolle (Fermentation ohne Trub), auf seine Fähigkeit zur Verringerung oxidativer Zellschäden getestet.

Dabei zeigte sich für alle untersuchten Marker (TEAC/ORAC, Modulation von TBH-induziertem ROS-Level und Md-Induzierten DNA-Schäden, GSH-Gehalt), dass fermentierter Trub und die Kontrolle eine identische, bestenfalls geringe antioxidative Wirksamkeit aufwiesen: ROS-Level und DNA-Schäden konnten kaum verringert werden; der tGSH-Spiegel der Caco-2 Zellen wurde konzentrationsabhängig depletiert, was fäkalen Komponenten des Fermentationsüberstandes zugeschrieben werden kann, die über GSH-Konjugation detoxifiziert werden könnten [Amorati et al., 2007; Amorati et al.,

2006]. Den selben Effekt zeigten auch die bereits untersuchten Kontrollen (Fermentation ohne Zusatz von AE) von F-AE03 und F-AE04 [Bellion, 2006].
Der Grund für die fehlende Wirksamkeit des fermentierten Trubs ist wahrscheinlich das vollständige Fehlen von Polyphenolen in den Fermentationsüberständen. Dies bestätigt die Analyse der Fermentationsüberstände, durchgeführt von der AG Richling (TU Kaiserslautern) [Bergmann und Richling, 2009, pers. Mitteilung]: in den wässrigen Überständen des fermentierten Trubs und in der Kontrolle konnten keine Polyphenole (und keine Abbauprodukte) identifiziert werden. Dies ist entweder auf einen umfassenden Abbau von Polyphenolen während der anaeroben Inkubation mit Darmbakterien zurückzuführen oder auf eine übermäßige Resorption dieser niedermolekularen Substanzen im Dünndarmmodell (Dialyse).
Eine weitere Möglichkeit wäre die stabile Bindung der vorhandenen Polyphenole an Komponenten des Trubs. Es ist beschrieben, dass Procyanidine, aber auch andere Polyphenole an Proteine oder Kohlenhydrate binden können, z.B. binden Chlorogensäure, Quercetin und Tannine an Proteine, wobei die Bindungsaffinität mit dem Molekulargewicht der Polyphenole ansteigt [Rawel et al., 2005; Soares et al., 2007].

Es ist bekannt, dass Polyphenole nicht nur antioxidative Effekte haben; auch eine prooxidative Wirkung ist möglich [Halliwell, 2008]. Diese resultiert aus der Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) unter Inkubations-Bedingungen; diese könnten die Zellen schädigen oder eine Auswirkung auf die Ergebnisse der zellulären Assays haben. Da solche Effekte *in vivo* bislang noch nicht beobachtet wurden [Halliwell, 2008] kann die Übertragbarkeit der *in vitro*-Experimente auf die *in vivo*-Situation erschwert werden.
Daher wurde die **prooxidative Wirkung der Apfelsaftextrakte/-inhaltsstoffe** unter Inkubations-Bedingungen beobachtet. Alle untersuchten Apfelsaftextrakte (AEs) zeigten in DMEM eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), was auf ihren Gehalt an Polyphenolen zurückzuführen ist. Maßgeblich für die Generierung von H_2O_2 durch Polyphenole war deren Struktur, da bei den untersuchten Einzelstoffen nur bei Substanzen mit einer *o*-Catechol-Gruppe signifikante H_2O_2-Mengen detektiert werden konnten. Die beiden Dihydrochalcone Pt und Pz sowie die Phenolcarbonsäuren CuA, 3HPPA und 4HPPA, die entweder monohydroxyliert sind oder eine *p*-Catecholgruppe aufweisen, waren hier nicht effektiv. Der Rückschluss von der Zusammensetzung der AEs auf deren prooxidative Eigenschaften zeigte, dass vor allem die Gesamtmenge an Polyphenolen für deren prooxidative Wirksamkeit verantwortlich war. Dazu trugen zum größten Teil die Hydroxyzimtsäuren bei, die mit bis zu 70 % der Polyphenole deren größte Fraktion stellen und darüber hinaus auch als potente H_2O_2-Bildner identifiziert wurden.

Weiter waren die beobachteten Effekte stark vom verwendeten Zellkulturmedium abhängig. Während sich die Polyphenole in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) als starke H_2O_2-Bildner erwiesen, konnte in einem 1:1-Gemisch aus DMEM mit Hab's Nutritional Mix F12 (DMEM/F12) kaum H_2O_2 detektiert werden. Dies konnte auf den unterschiedlichen pH-Wert der beiden Medien zurückgeführt werden, da die Oxidation der Polyphenole und die damit einhergehende H_2O_2-Bildung durch basische pH-Werte (Bildung von Phenolat-Anionen) stark erleichtert wird. Daneben spielte die Stabilität der ROS im Medium eine wichtige Rolle. Auch hier zeigte sich DMEM/F12 überlegen, da in ihm gebildetes H_2O_2 effektiver abgebaut wurde als in DMEM. Neben H_2O_2, welches auf Grund seiner relativ hohen Stabilität leicht detektiert werden kann, wurden bei der Oxidation der Polyphenole vermutlich auch Superoxidradikal-Anionen generiert, was auch in der Literatur diskutiert wird [Amorati et al., 2006; Metodiewa et al., 1999]. Diese Folgerung beruht auf dem sichtbaren Einfluss von SOD auf die Polyphenol-vermittelte H_2O_2-Generierung.

Um den Einfluss von gebildetem H_2O_2 bei zellulären Assays in DMEM so gering wie möglich zu halten wurde geprüft, ob dieses durch Coinkubation mit antioxidativen Enzymen zu verringern ist. Hier zeigte sich, dass durch Zugabe von Catalase (CAT) ins Zellkulturmedium dessen H_2O_2-Konzentration auf das Niveau der Lösemittelkontrolle reduziert werden konnte. Die Verwendung antioxidativ wirksamer Enzyme bietet zudem den Vorteil, dass sie auf Grund ihrer Größe nicht in die Zellen gelangen können. Andere Substanzen, die die Bildung von ROS im Medium verhindern sollen sind meist Antioxidanzien (wie z.B. Ascorbinsäure), die selbst mit den Zellen in Wechselwirkung treten können. Außerdem können sie ebenfalls prooxidativ wirken [Wee et al., 2003] und dadurch die Messergebnisse beeinflussen.

Die Auswirkung der polyphenol-bedingten ROS-Generierung auf die Modulation von zellulärem ROS-Level und tGSH-Spiegel von HT-29 Zellen wurden durch Inkubation mit Que, ChA und CaA jeweils mit/ohne CAT getestet. Die Ergebnisse zeigten keinen Einfluss des extrazellulären H_2O_2 auf den (intra-)zellulären ROS-Level nach Induktion mit TBH. Weder bei der Inkubation mit Que noch bei den wesentlich stärkeren H_2O_2-Bildnern ChA und CaA bewirkte die CAT-Zugabe eine Veränderung der Konzentrations-Wirkungskurve. Der tGSH-Spiegel konnte durch Inkubation mit Que und CaA konzentrationsabhängig erhöht werden, was auch frühere Versuche bestätigten [Schäfer, 2006]. Im Gegensatz zu CaA sah man bei der Que-Behandlung einen leichten, jedoch signifikanten Unterschied der Inkubation mit/ohne CAT: in Anwesenheit von extrazellulärem H_2O_2 wurde der tGSH-Spiegel schon bei niedrigeren Konzentrationen signifikant erhöht. Dies könnte auf die Aktivierung des ARE zurückzuführen sein, dass die Expression der γGCL, des Schlüsselenzyms der GSH-Synthese, steuert. Lee-Hilz et al. fanden, dass sich dieser

Transkriptionsfaktor durch geringe Mengen an H_2O_2 induzieren lässt, so dass der unter diesen Bedingungen prooxidative Prozess nicht schädlich ist, sondern eine Verbesserung der antioxidativen Abwehr bewirkt [Lee-Hilz et al., 2006].
Polyphenole sind in der Lage, abhängig von Struktur, Konzentration und verwendetem Medium, signifikante Mengen H_2O_2 zu generieren. Dieses konnte durch Coinkubation mit CAT vollständig abgebaut werden; auch bei Anwesenheit von Zellen wurde kein H_2O_2 mehr detektiert, was auf eine Inaktivierung der ROS durch zelluläre antioxidative Enzyme schließen lässt. Es muss aber betont werden, dass es besser ist, z.B. durch die Wahl des entsprechenden Mediums, die H_2O_2-Bildung zu verhindern als es später durch Supplementierung mit Antioxidantien/antioxidativen Enzymen zu inaktivieren.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche, dass polyphenolreiche Extrakte aus Apfelsaft und Apfelbestandteilen ausgeprägte antioxidative Eigenschaften besitzen und in der Lage sind, oxidative Zellschäden zu reduzieren. Dies ließ sich zum Teil auf die Zusammensetzung der Extrakte zurückführen, die vor allen Dingen von der verarbeiteten Sorte und der Verarbeitungsmethode abhängt. Auf Grund der komplexen Mischung der Extrakte kann jedoch die Beteiligung anderer Substanzen nicht ausgeschlossen werden; auch antagonistische und synergistische Effekte der Inhaltsstoffe sind möglich. Die besten Effekte zeigten Extrakte die einen hohen Anteil an Procyanidinen oder Quercetin-Glykosiden aufwiesen. Die letzteren können durch zusätzliche Extraktion von Apfelschalen oder Trester freigesetzt werden.
Zur Annäherung an die *in vivo*-Situation wurden Apfelsaftextrakte einer anaeroben Fermentation mit Darmbakterien unterzogen; die Fermentate wiesen immer noch eine deutliche antioxidative Wirksamkeit auf. Durch Analyse der Fermentationsüberstände konnten zahlreiche phenolische Abbauprodukte identifiziert werden, deren antioxidative Wirksamkeit nur etwas schwächer war als die ihrer Ausgangsverbindungen. Dies zeigt, dass Polyphenole aus Apfelsaft ihre Wirksamkeit *in vivo* auf zwei Arten ausüben können. Die Ausgangsverbindungen werden zum Teil direkt resorbiert, ein anderer Teil wird von der intestinalen Mikroflora verstoffwechselt und dann aufgenommen. Beide Mechanismen können einen Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit von Apfelsaft im Darm liefern. Erstmals wurde ein anaerob fermentierter isolierter Trub aus Apfelsaft auf seine antioxidative Wirksamkeit untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine antioxidative Wirksamkeit; analog konnten im Fermentat keine Polyphenole detektiert werden.
Die in der Literatur beschriebenen prooxidativen Effekte der Apfelsaft-Polyphenole unter Zellkultur-Bedingungen wurden ebenfalls untersucht, um eine Übertragung auf die *in vivo*-Situation zu erleichtern, da dieses Artefakt im Menschen bislang nicht beobachtet werden konnte. Die Catechol-Gruppe wurde als notwendige Strukturvoraussetzung für die

Polyphenol-vermittelte ROS-Bildung im Zellkultur-Medium identifiziert; Hydroxyzimtsäuren erwiesen sich hier als besonders potente Substanzen. Es wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung des Mediums (Puffer, pH-Wert) eine entscheidende Rolle das verwendete Solvens eine entscheidende Rolle spielt; durch Zugabe von Katalase ließ sich gebildetes H_2O_2 effizient eliminieren. Ein Effekt extrazellulär gebildeter ROS auf zelluläre Marker wurde unter den gewählten Substanzkonzentrationen nur in einem Fall beobachtet: es zeigte sich eine Erhöhung des tGSH-Spiegels und somit eine Verbesserung der antioxidativen Abwehr der Zellen.

Aus den vorliegenden *in vitro*-Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Apfelsäfte aus „alten“ Mostapfelsorten, die einen hohen Gehalt an Flavonolen und/oder Procyanidinen besitzen, eine protektive Wirksamkeit gegen ROS-assoziierte Darmerkrankungen bieten können. Dieser Schutz beruht auf der antioxidativen Kapazität von Polyphenolen und ihren intestinalen Abbauprodukten; eine adverse Wirkung durch artifiziell generierte ROS konnte nicht bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass die Genese von Darmerkrankungen von der aufgenommenen Nahrung beeinflusst wird. Der Genuss von Apfelprodukten mit hoher antioxidativer Wirksamkeit könnte daher zur Prävention ROS-assoziierter Erkrankungen beitragen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, polyphenolreiche Extrakte aus Apfelsaft (AE01 – AE07), Tresterextraktionssaft (AE03B, AE06B) und Apfelschalen (GS, PE) sowie ihre polyphenolischen Inhaltsstoffe auf ihr Potenzial zur Verringerung oxidativer Zellschäden in der Kolon-Karzinom-Zelllinie Caco-2 zu untersuchen. Zur Annäherung an die *in vivo*-Situation wurden mit Darmbakterien fermentierte Apfelsaftextrakte und fermentierter Trub in die Untersuchungen einbezogen, dabei entstehende Polyphenol-Abbauprodukte wurden charakterisiert und ebenfalls geprüft. Untersuchte Parameter waren (oxidative) DNA-Schädigung, zellulärer ROS-Level, Glutathionspiegel und SOD1-Expression. Zusätzlich wurde die zellfreie antioxidative Kapazität mittels ORAC- und TEAC-Assay erfasst.

Die antioxidative Kapazität aller Extrakte war sehr hoch (ORAC: 4,5 – 6,9 mM Trolox; TEAC: 3,4 – 6,5 mM Trolox) und korrelierte mit dem Gehalt an Polyphenolen bzw. Procyanidinen. Der zelluläre ROS-Level wurde am effektivsten durch AE07 und GS reduziert, während AE05, AE06B und GS den besten Schutz vor oxidativen DNA-Schäden boten. Eine Erhöhung des tGSH-Spiegels konnte durch Inkubation mit AE06, AE07, GS und PE (jeweils $\geq$30 µg/mL) erreicht werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass vor allem Flavonol- und/oder Procyanidin-reiche Extrakte eine besonders gute protektive Wirksamkeit aufweisen.

Die fermentierten Apfelsaftextrakte zeigten eine deutliche antioxidative Wirksamkeit, was vor allem den nachgewiesenen phenolischen Abbauprodukten zugeschrieben werden konnte. Diese zeigten fast alle eine ausgeprägte Wirksamkeit im zellfreien und zellulären System; die ursprünglichen Polyphenole der Extrakte wurden durch die Fermentation zum größten Teil abgebaut. Es ist nicht auszuschließen, dass auch andere Komponenten (wie z.B. SCFA) zur protektiven Wirksamkeit fermentierter Extrakte beitragen könnten. Der fermentierte Trub erwies sich in den Untersuchungen als unwirksam, da in dem verwendeten Fermentationsüberstand weder Polyphenole noch Abbauprodukte identifiziert werden konnten.

Weiterhin wurden auch Polyphenol-vermittelte prooxidative Effekte untersucht, für die sich neben einer starken Strukturabhängigkeit die Wahl des verwendeten Solvens als entscheidender Faktor für die beobachtete H_2O_2-Bildung erwies. Es wurden keine Adverse Effekte auf zelluläre Marker beobachtet, vielmehr könnte die antioxidative

Wirksamkeit der Polyphenole durch geringe Mengen an ROS sogar unterstützt werden, da diese die antioxidative Abwehr der Zellen aktivieren.

Insgesamt erwiesen sich phenolische Extrakte aus Apfelbestandteilen als wirksame Antioxidanzien mit hohem Potenzial zur Verringerung oxidativer Zellschäden in humanen Kolonzellen. In begleitenden Untersuchungen mit Einzelstoffen wurden Polyphenole identifiziert, die wesentlich zur protektiven Wirkung der Extrakte beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass die protektive Wirksamkeit von Extrakten und Inhaltsstoffen trotz intestinalen Abbaus persistiert und dass eine moderate prooxidative Wirksamkeit der Polyphenole in Zellen einen günstigen Einfluss auf deren antioxidative Abwehr ausüben kann.

7. Material und Methoden

7.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

Geräte

Biofreezer	Herafreeze [Heraeus]
Blottingkammer	Semiphor [Hoefer Scientific Instruments] mit Netzteil Power Pac 300 [Bio-Rad]
Brutschrank	BBD 6220 [Heraeus] Cytoperm 8088 [Heraeus]
Chemolumineszenzdetektor	LumiImager [Boehringer Mannheim] mit Software LumiAnalyst 3.1 [Boehringer Mannheim]
Elektrophoresekammer, horizontal	Sub Cell GT mit Powerpack [Bio Rad]
Elektrophoresekammer, vertikal	Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System [Bio-Rad]
Folienschweißgerät	[TCM]
Mikroskop, Auflicht-	IM [Zeiss]
Mikroskop, Fluoreszenz-	Axioskop 2 mit Filter Set 15 (Anregung: BP546/12; Emission: LP590) [Zeiss], Kamera Marlin [Allied Vision Technologies] und Software CometAssayIV [Perceptive Instruments]
Mikroplatten-Lesegerät	Synergy 2 / Synergy HT mit Software Gen5 [BioTek]
Multipette	Stepmate [Abimed]
Pipetten	[Gilson]
Pipette, Mehrkanal-	Multimate ME 200 [Abimed]
Pipettierhilfe	Pipetus-akku [Hirschmann]
Schüttler, Überkopf	RK10-VS [Heto Lab Equipment]
Sterilbank	LaminAir HLB 2472 BS [Heraeus] HeraSafe HS12 [Heraeus]
Thermomixer	Thermomixer comfort [Eppendorf]
Thermostat	U3 [Julabo Labortechnik GmbH]
Vortexer	MS1 Minishaker [IKA]
Waage, digital	CP 224 S [Sartorius]
Wasserbad, Schüttel-	[Julabo]
Zählkammer	Neubauer, Neubauer improved [Marienfeld]
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R [Heraeus] Biofuge fresco [Heraeus]

Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier	Gel-Blotting-Papier, Dicke 1,2 mm [Roth]
Deckgläser	24 x 24 mm [Menzel]
Kanüle	Sterican 0,6 x 60 mm, steril und 0,9 x 70 mm, steril [Braun]
Mikrotiterplatten	PS Microplate 96 well [Greiner]
Mikrotiterplatten (DCF-Assay)	CellBIND 96well flat black clear bottom PS, steril [Corning]
Mikrotiterplatten (ORAC)	Microplate 96 well, black [Nunc]
Multipettenspitzen	Ritips Professional 1=100µL, 1=250µL [Roth]
Objektträger	einseitig komplett mattiert, 26x76x10 mm [Menzel]
Petrischalen	steril, 60; 96 mm [Greiner]
PP-Röhrchen	steril, 15 mL; 50 mL [Greiner]
Reaktionsgefäße	1,5 mL; 2 mL [Greiner]

Transfer-Membran	PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran, Porengröße 0,45µm [Whatman]
Zellkulturflaschen	steril, 175 cm2 [Greiner]
Zellschaber	[Greiner]

Chemikalien/Nährlösungen

Medium:	Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose + L-Glutamine (DMEM) [Gibco] Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrition Mix F12 (1:1) + L-Glutamine + 15 mM HEPES (DMEM/F12 (1:1)) [Gibco]
Supplemente:	Fötales Kälberserum (FKS) [Gibco] Penicillin-Streptomycin (10^4 U/mL Penicillin; 10^4 µg/mL Streptomycin) [Gibco]

Acrylamid-Lösung 30 %: Rotiphorese Gel 30 [Roth]
Agarose, Schmelzpunkt 42°C (normal melting agarose, NMA) [BioRad]
Agarose, Schmelzpunkt 37°C (low melting agarose, LMA) [BioRad]
Ammoniumeisen(II)sulfat $(NH_4)_2Fe^{2+}(SO_4)_2$ [Merck]
Ammoniumperoxodisulfat (APS) [Roth]
2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz (ABTS) [Sigma]
2,2′-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) [Aldrich]
BCA-Protein Kit Uptima [KMF Laborchemie, Lohmar]:
Reagenz A: Na_2CO_3, $NaHCO_3$, BCA (Bichinoninic Acid), Na-Tartrat
Reagenz B: $CuSO_4$
Bromphenolblau [Fluka]
1-Butanol
tert-Butylhydroperoxid (TBH) [Sigma-Aldrich]
Dichlorfluorescin-Diacetat (DCFH-DA) [Fluka]
Dimethylsulfoxid für UV Spektroskopie (DMSO) [Fluka]
2,2'-Dinitro-5,5'-dithio-dibenzoesäure p.A. (DTNB) [Aldrich]
Ethidiumbromidlösung 10 mg/mL [Sigma]
Fluorescein-Natrium [Fluka]
Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase [A. Collins, Universität Oslo]
Glutathion, reduzierte Form (GSH) [Sigma]
Glutathion, oxidierte Form (GSSG) [Sigma]
Glutathionreduktase, aus Backhefe [Sigma]
Glycerin [Merck]
Glycin [Merck]
Kaliumdihydrogenphosphat p.A. (KH_2PO_4) [Merck]
di-Kaliumhydrogenphosphat p.A. (K_2HPO_4) [Merck]
Kaliumperoxodisulfat 99 % ($K_2S_2O_8$) [Aldrich]
20x LumiGLO Reagent + 20x Peroxide [Cell Signaling]
Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon) 98 % [Aldrich]
2-Mercaptoethanol [Merck]
Methanol [Merck]
Milchpulver [Roth]
NADPH ≥ 90 % (HPLC) [Fluka]
Natriumchlorid p.A. [Merck]
Natriumdodecylsulfat (SDS) [Serva]
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) [Merck]
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) [Fluka]
d-Natrium EDTA p.A. (Titriplex III, Na_2-EDTA) [Merck]
di-Natriumhydrogenphosphat p.A. (Na_2HPO_4) [Riedel-de Haën]
Natriumhydroxid (NaOH) [Roth]
Perchlorsäure [Roth]

Protein-Größenmarker See Blue Plus 2 [Invitrogen]
Protein Quantification Assay Reagent Concentrate [BioRad]
Proteinstandards: BSA 2 mg/mL [BioRad, Uptima]
Rinderserumalbumin (BSA) [Uptima]
Sorbitol [Aldrich]
5-Sulfosalicylsäure-dihydrat p.A. (SSA) [Serva]
Tetramethylethylendiamin (TEMED) [Roth]
Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure) [Fluka]
Triethanolamin (TEA) [Aldrich]
Tris Ultra [Roth]
Triton X-100 [Roth]
Trypanblau Lösung 0,4 % [Sigma]
Trypsin (1:250 from bovine pancreas) [Serva]
Tween 20 [Sigma]
2-Vinylpyridin (2-VP) [Aldrich]
Wasserstoffperoxid 37 %, stabilisiert [VWR]
Xylenol-Orange [Sigma]

7.2. Zellkultur

Lösungen

PBS-Stammlösung (20x)
4,2 g KH_2PO_4, + 180 g NaCl, + 8,18 g Na_2HPO_4
mit bidest. H_2O auf 1 L auffüllen
auf pH = 7,4 einstellen
Lagerung bei 4°C

PBS-Gebrauchslösung
25 mL der Stammlösung werden mit bidest. H_2O auf 500 mL aufgefüllt und bei 121°C für 20 min autoklaviert
Lagerung bei 4°C

Trypsin-Lösung
0,125 g Trypsin + 62,5 g Na_2-EDTA
mit PBS-Lösung auf 250 mL auffüllen.
pH-Wert auf 7,2 einstellen
Sterilfiltration (0,2 µM)
Lagerung aliquotiert auf 15 mL bei –20°C

7.2.1. Kultivierung und Subkultivierung

Zelllinien, die als Monolayerkulturen in Petrischalen/Platten oder in Zellkulturflaschen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen. Die Intervalle der Mediumerneuerung und Subkultivierung variieren von Zelllinie zu Zelllinie, abhängig von Metabolismus und Wachstumsgeschwindigkeit [Lindl, 2002].

Caco-2-Zellen werden in 175 cm^2-Gewebekulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, einer rel. Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO_2-Gehalt von 5 % kultiviert. Als

Nährmedium (N-med) dient ein kommerziell erhältliches 1:1-Gemisch von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Nutrient Mix F12 welches mit 20 % Fötalem Kälberserum (FKS) sowie 1 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung versetzt wird.
HT-29-Zellen werden unter denselben Bedingungen kultiviert. Das verwendete Nährmedium (N-med) ist Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung.
Um die Kontamination der Zellen mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, werden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt

Mediumwechsel
Da die Zellen im Laufe ihres Wachstums bestimmte Inhaltsstoffe des Mediums metabolisieren und saure Stoffwechselprodukte ans Medium abgeben, muss dieses in regelmäßigen Abständen erneuert werden. Dazu wird das alte Medium abgegossen, die Zellen einmal mit PBS (10 mL) gespült und danach wieder mit ca. 50 mL Kulturmedium bedeckt.

Subkultivierung (Passagieren) der Zellen
Da der Boden einer Kulturflasche mit der Zeit vollständig von Zellen bedeckt wird, muss die Anzahl der Zellen alle 3 – 5 Tage durch Subkultivierung (Passagieren) wieder reduziert werden. Ansonsten würden die Zellen ihre Wachstumsrate reduzieren (Kontaktinhibition) oder könnten sogar ganz absterben.
Das alte Medium wird abgegossen, die Zellen zweimal mit PBS gespült (je 10 mL) und mit 3 mL Trypsin-Lösung inkubiert. Nach 3 – 4 Minuten lassen sich die Zellen durch vorsichtiges Klopfen an die Kulturflasche vom Boden ablösen. Durch Zugabe von 5 mL Kulturmedium wird das Trypsin inaktiviert und die Zellen mit der Pipette vereinzelt. Ein Teil der Zellen wird mit 50 mL frischem Nährmedium wieder neu ausgesät.

7.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Da die Lebenszeit von Zellen im Tiefkühlschrank bei -80°C bzw. im flüssigen Stickstoff begrenzt ist, muss der Vorrat an Zellen regelmäßig erneuert werden, d.h. eingefrorene Zellen in Kultur bringen und mit wenigen Passagen wieder einfrieren. Eine konfluent gewachsene Kulturflasche wird mit minimaler Menge Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und mit möglichst wenig Medium abgestoppt, um die Zellsuspension konzentriert zu halten. Eine entsprechende Anzahl an Kryo-Röhrchen wird mit 150 µL FKS (10 %), 150 µL DMSO (10 %) und 1.200 µL Zellsuspension gefüllt. Die Zellzahl sollte sich bei ungefähr einer Million pro Kryo-Röhrchen bewegen. Die Zugabe von DMSO ist trotz seiner Cytotoxizität unerlässlich, da es die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der

Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert [Lindl, 2002]. Zunächst werden die Röhrchen bei -20°C, am folgenden Tag bei -80°C eingelagert. Zur längerfristigen Lagerung kann flüssiger Stickstoff verwendet werden.
Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen, müssen sie aus dem Tiefkühlschrank aufgetaut werden. Dies sollte möglichst schnell passieren, um die toxische Wirkung des zugesetzten DMSO gering zu halten. Deshalb werden die Kryo-Röhrchen bei 37°C angetaut und sobald sich die Suspension vom Rand löst in ein PP-Röhrchen mit 10-12 mL vorgewärmtem Medium gegeben und dann abzentrifugiert (1.500 Upm, 3 min). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit etwas Medium wieder aufgenommen. Das Einsäen erfolgt in 25 cm^2 Kulturflaschen. Am nächsten Tag muss unbedingt ein Mediumwechsel erfolgen, damit die toten und stark geschädigten Zellen entfernt werden und das Wachstum der lebenden Zellen nicht beeinträchtigt wird [Lindl, 2002].

7.2.3. Testung auf Mykoplasmen

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten, die parasitär in enger Vergesellschaftung mit Pflanzen- oder Tierzellen leben. Sie sind wechselnd in ihrer Morphologie und leicht verformbar, ihre Größe schwankt zwischen 0,2 µm und 2 µm. Dementsprechend sind sie in der Lage, die üblichen Sterilfilter aus Cellulose- und Polyvinylderivaten der Kulturflaschen (Porengröße 0,2 µm) zu passieren und so in die Zellkultur zu gelangen. Mykoplasmen sind in der Zellkultur unerwünscht, da sie nicht nur die Zellen und deren Stoffwechsel verändern, sondern auch die Ergebnisse von Versuchen beeinträchtigen können.
Als Nachweismethode für Mykoplasmenkontaminationen hat sich die Fluorochromierung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bewährt. Die DNA der Mykoplasmen und der Zellen wird mit DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheint die DNA der Mykoplasmen als kleine, hell leuchtende Punkte auf oder in den Zellen, deren Zytoplasma rot leuchtet.
Zur Durchführung des Nachweises werden wenige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension auf einem sterilen Objektträger in einer bereits mit Medium gefüllten 94 mm Petrischale ausgestreut und für mindestens 24 h im Brutschrank kultiviert. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem Methanol gespült und anschließend mindestens 30 min in eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Nach dem Trocknen werden die Zellen mit 40 µL DAPI-Lösung angefärbt, mit einem Deckglas bedeckt und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung bei 365 nm betrachtet. Im Fall einer Mykoplasmenkontamination werden die Zellen nach Herstelleranweisung mit BM Cyclin (Roche) behandelt.

7.2.4. Aussäen der Zellen

Für alle Zelltests wird die in Tabelle 7.1 angegebene Anzahl von Zellen in entsprechend viel Kulturmedium ausgesät.

Tabelle 7.1: Aussaatbedingungen der zellbasierten Assays

Versuch	Gefäß	Anzahl Zellen	Medium Vol.
DCF-Assay	96 well-Platte	$2{,}4 \cdot 10^4$ pro well	100 µL
Comet Assay	Petrischale ∅ 6 cm	$2{,}5 \cdot 10^5$	6,0 mL
GSH-Bestimmung	Petrischale ∅ 9 cm	$1{,}0 \cdot 10^6$	9,0 mL
Western Blot	Petrischale ∅ 9 cm	$2{,}0 \cdot 10^6$	9,0 mL

Die Zellen werden anschließend für 24 h anwachsen gelassen. Erst dann erfolgt die Inkubation mit den entsprechenden Agenzien.

7.2.5. Inkubation

Zur Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen wird das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette/Kanüle von der Petrischale/Multiwellplatte abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend gibt man die entsprechende Konzentration des Fermentationsüberstands in Inkubationsmedium auf die Zellen und inkubiert diese für 24 h im Brutschrank.

Für die Kurzzeitinkubationen (0,5 bis 1 h) wird das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Oxidans bzw. Farbstoff im Brutschrank inkubiert.

7.2.6. Ernte der Zellen

Nach der Substanzinkubation werden die Petrischalen in fester Reihenfolge zunächst einmal mit PBS gewaschen, danach mit 0,5 mL (Petrischale 6 cm) bzw. 1 mL (Petrischale 9 cm) Trypsin-Lösung für 3 – 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sobald sich die Zellen von selbst vom Boden der Petrischale lösen (nach ca. 2 – 4 min.) wird das Trypsin durch Zugabe von 0,5 – 1 mL Kulturmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wird dann in Reaktionsgefäßen gesammelt.

7.3. Bestimmung von Zellzahl und Viabilität (Trypanblau Ausschlusstest)

Die Anzahl der Zellen wird mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese besteht aus neun großen Quadraten (Abbildung 7.1). Jedes dieser Quadrate hat eine Fläche von 1 mm^2, dies ergibt bei einer Tiefe der Kammer von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µL. Für die direkte Zellzählung wird ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop kann anschließend durch Auszählen der (in Abbildung 7.1 grau dargestellten) Quadrate die Zellzahl pro 0,1 µL bestimmt werden, aus der sich die Zellzahl pro Mililiter errechnen lässt [Lindl, 2002].

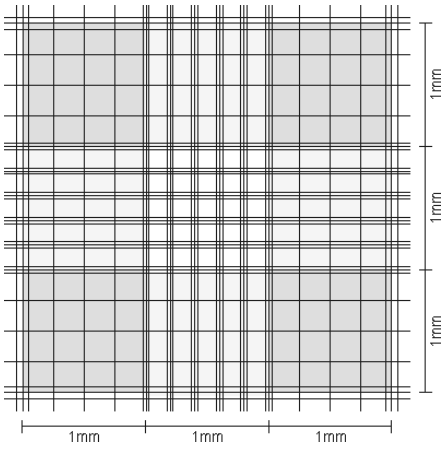


Abbildung 7.1: Neubauer-Zählkammer

Zur Viabilitätsbestimmung wird die Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt und diese Lösung in die Zählkammer gegeben. Das Trypanblau dringt durch die Zellmembran toter Zellen ins Cytosol und färbt es blau. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und bleiben weiß. So können lebende und tote Zellen gut unterschieden, getrennt gezählt und die Viabilität der Probe bestimmt werden. Da Trypanblau zytotoxisch wirkt, sollte die Zählung rasch erfolgen [Lindl, 2002]. Die Viabilität berechnet sich nach folgender Formel:

$$Viabilität[\%] = \frac{lebendeZellen}{lebendeZellen + toteZellen}$$

7.4. Bestimmung des Proteingehaltes

7.4.1. BCA-Assay

<u>Lösungen</u>

Gebrauchslösung: Gemisch aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1

Proteinstandards: BSA 2 mg/mL [BioRad, Uptima]

BSA-Standards

Ausgehend von der BSA-Stammlösung werden mit H_2O bidest. Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt: 2,0 1,0 0,8 0,4 0,2 0,1 0 mg/ mL BSA. Zusätzlich wird ein Blindwert (H_2O bidest.) mitgeführt.

Messung

Es werden je zweimal 10 µL Probe, Standardlösung und Blindwert in zwei 1,5 mL Reaktionsgefäße pipettiert. Dazu werden je 0,5 mL Gebrauchslösung gegeben. Die Inkubation erfolgt im Schüttelwasserbad für 30 min bei 37°C. Danach wird die Farbreaktion durch Abkühlen im Eisbad gestoppt. Aus jedem Reaktionsgefäß werden zweimal 200 µL in jedes Loch der Mikrotiterplatte pipettiert und im Mikroplatten-Photometer bei 562 nm vermessen.

Auswertung

Die Extinktionen der Standardlösungen werden gegen ihre Konzentration aufgetragen. Anhand dieser Standardgerade lassen sich nun die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen.

7.4.2. Bradford-Assay

Lösungen

Protein Quantification Assay Reagent – Gebrauchslösung

Das Protein Quantification Assay Reagent Konzentrat wird im Verhältnis 1:5 mit H_2O bidest. verdünnt.

BSA-Standards

Ausgehend von der BSA-Stammlösung werden mit H_2O bidest. Standardlösungen folgender Konzentrationen hergestellt: 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,0625 / 0,03125 mg/mL BSA. Zusätzlich wird ein Blindwert (H_2O bidest.) mitgeführt.

Messung

Es werden je zweimal 10µL Probe, Standardlösung und Blindwert in die Wells einer 96-well Platte pipettiert. Danach werden mit der Mehrkanalpipette pro well 200 µL der Gebrauchslösung zugegeben und für 10 min. bei Raumtemperatur im Plattenreader inkubiert. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Auswertung

Zunächst werden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen gebildet. Die Extinktion der Standardlösungen werden gegen deren Konzentration aufgetragen. Anhand dieser Standardgerade lassen sich nun die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen.

7.5. Glutathionbestimmung

Lösungen

DTNB-Lösung (6 mM)
11,9 mg DTNB lösen in 5 mL A+B-Puffer,
Lagerung in Braunglasflasche

Glutathion-Reduktase-Lösung (50 U/mL) (GSR)
Das Enzym wird abhängig von seiner Aktivität mit Puffer A+B auf eine Konzentration von 50 U/ mL verdünnt

GSH-Standard (1 mM)
Lösen von 30,73 mg GSH in 1 mL H_2O bidest. ergibt ein 100 mM Lösung.
Von dieser Lösung 200 µL in 19,8 mL 5 % SSA geben ⇒ 1 mM GSH.
Aliquotieren auf 500 µL
Lagerung bei -80°C, max. 3 Monate.

GSSG-Standard (1 mM)
Lösen von 61,26 mg GSH in 1 mL H_2O bidest. ergibt ein 100 mM Lösung.
Von dieser Lösung 200 µL in 19,8 mL 5 % SSA geben ⇒ 1 mM GSSG.
Aliquotieren auf 500 µL
Lagerung bei -80°C, max 3 Monate.

NADPH-Lösung (20 mM)
16,7 mg NADPH lösen in 1 mL 0,5 % $NaHCO_3$-Lösung

$NaHCO_3$-Lösung 0,5 %
125 mg $NaHCO_3$ lösen in 25 mL bidest. H_2O
Lagerung bei 4°C

PBS-Lösung
siehe Abschnitt 7.2

Puffer A
4,25 g KH_2PO_4
+ 0,585 g Na_2-EDTA
lösen in 250 mL bidest. H_2O
Lagerung bei 4°C

Puffer B
10,875 g K_2HPO_4 (oder 14,264 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)
+ 1,17 g Na_2-EDTA
lösen in 500 mL bidest. H_2O
Lagerung bei 4°C

Puffer A+B
15 mL Puffer A mit 85 mL Puffer B mischen, täglich frisch anzusetzen
Lagerung bei 4°C

5-Sulfosalicylsäure (SSA)
5 %: 25 g SSA lösen in 500 mL H_2O bidest
10 %: 50 g SSA lösen in 500 mL H_2O bidest

Triethanolamin-Lösung (50 %) (TEA)
531 µL TEA

+ 469 µL H_2O bidest.

Trypsin-Lösung
siehe Abschnitt 7.2

Ernte und Aufarbeitung der Zellen

Nach der 24-stündigen Substanzinkubation wird das Inkubationsmedium abgesaugt und die Petrischalen mit 9 mL PBS gewaschen. Die Zellernte erfolgt wie in Abschnitt 7.2.6 beschrieben mit folgender Modifikation: die Zellsuspension wird in ein 15 mL PP-Röhrchen überführt, die Petrischale noch zweimal mit je 1 mL serumfreiem Medium abgespült und noch auf dem Boden haftende Zellen mit einem Zellschaber abgelöst; das Medium wird ebenfalls in das PP-Röhrchen gegeben. Nun werden zur Bestimmung der Viabilität 25 µL Zellsuspension entnommen. Das PP-Röhrchen wird bei 4°C für 10 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 mL Puffer A+B resuspendiert und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Das PP-Röhrchen wird dreimal mit je 200 µL Puffer A+B ausgespült und die Reaktionsgefäße bei 4°C für 10 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 370 µL Puffer A+B resuspendiert und zweimal 10 µL Zellsuspension zur Proteinbestimmung entnommen (BCA-Assay, siehe 7.4.1). Danach werden die Zellen durch Zugabe von 350 µL 10 % 5-Sulfosalicylsäure (SSA) lysiert und bei 4°C für 15 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Bestimmung von tGSH bzw. GSSG erfolgt aus dem Überstand.

Messung von tGSH

Ausgehend von GSH-Standards mit 1 mM GSH werden Standardlösungen von 5 µM bis 160 µM GSH in 5 % SSA hergestellt. Ein entsprechender Blindwert (5 % SSA) wird mitgeführt. Es wird ein *Reagenzienmix* hergestellt, der pro well 164 µL Puffer A+B, 20 µL 6 mM DTNB, 4 µL 20 mM NADPH und 2 µL GSR (50 U/ mL) enthält. Es werden 2x10 µL von Lösungsmittelkontrolle, Standard und Probe in eine 96 well-Platte pipettiert; dazu wird mit der Mehrkanalpipette 190 µL des Reagenzienmix gegeben und die Platte im Photometer an Hand folgender Parameter vermessen:

Messmodus	Absorption
Temperatur	25 °C
Wellenlänge	412 nm
Messzeitpunkte	0 Minuten, 2 Minuten

Messung von GSSG

Ausgehend von GSSG-Standards mit 1 mM GSSG werden Standardlösungen von 1,25 µM bis 40 µM GSH in 5 % SSA hergestellt. Ein entsprechender Blindwert (5 % SSA) wird mitgeführt. Es wird ein *Reagenzienmix* hergestellt, der pro well 154 µL Puffer A+B, 20 µL 6 mM DTNB, 4 µL 20 mM NADPH und 2 µL GSR (50 U/ mL) enthält. Zur Inaktivierung

des reduzierten Glutathions (GSH) werden 250 µL des Überstandes mit 10 µL 2-Vinylpyridin und 50 µL 50 % TEA im Thermomixer bei 600 Upm und 26°C für 1 h umgesetzt. Die Lösungsmittelkontrolle und die Standardreihe werden mitgeführt. Es werden 20 µL der derivatisierten Proben in eine 96 well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgt ebenfalls als Doppelbestimmung (d.h. 2 wellst pro Probe). Zu den Proben/Standards wird mit der Mehrkanalpipette 180 µL des Reagenzienmix pipettiert und die Platte im Photometer vermessen:

Messmodus	Absorption
Temperatur	25 °C
Wellenlänge	412 nm
Messzeitpunkte	0 Minuten, 10 Minuten

Auswertung

Die Messwerte der Doppelbestimmungen werden gemittelt und aus den Extinktionen der Standardlösungen wird eine Standardgerade erstellt. Nach linearer Regression erhält man eine Geradengleichung, in welche die gemessenen Extinktionen der Proben eingesetzt und so der jeweilige Gehalt an tGSH bzw. GSSG bestimmt wird. Der Gehalt an tGSH und GSSG wird auf die Proteinmenge der Probe bezogen angegeben (nmol tGSH/mg Protein), welche mittels BCA-Assay bestimmt wurde.

7.6. (Oxidative) DNA-Schäden (Comet Assay)

Lösungen

NMA (Beschichtung der Objektträger)
0,5 % in PBS

LMA (Suspendieren der Zellen)
0,7 % in PBS

Elektrophoresepuffer-Stammlösungen
200 g NaOH mit H_2O bidest. auf 500ml auffüllen
14,9 g EDTA mit H_2O bidest. auf 200ml auffüllen

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung
30 mL Nah-Lösung, + 5 mL Efta-Lösung
mit H_2O bidest. auf 1 L auffüllen
Lagerung bei 4°C

Enzympuffer-Stammlösung (10x)
9,5 g HEPES, + 7,46 g KCl, + 0,146 g EDTA, + 0,2 g BSA
mit H_2O bidest. auf 1 L auffüllen
mit KOH auf pH 8,0 einstellen
Aliquotiert auf 35 mL; Lagerung bei -20°C

Enzympuffer-Gebrauchslösung
35 mL Enzympuffer-Stammlösung

+ 315 mL H_2O bidest.

Ethidiumbromid-Stammlösung
10 mg Ethidiumbromid in 50 mL H_2O bidest.

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung
Stammlösung 1:10 (v/v) in H_2O bidest.

FPG-Enzym-Stammlösung
200 µL Enzympuffer, + 200 µL Glycerin
mit H_2O bidest. auf 2 mL auffüllen
davon 990 µL + 10 µL FPG-Enzym (Verdünnung 1:100)
Aliquotiert auf 25 µL; Lagerung bei -84 °C

FPG-Gebrauchslösung
25 µL FPG-Stammlösung
+ 725 µL Enzympuffer
(Gesamtverdünnung 1:3000)

Lysepuffer-Stammlösung
146,1 g NaCl + 37,2 g Na_2-EDTA + 1,2 g Tris
in 1 L H_2O bidest. lösen
mit NaOH auf pH 10 einstellen
+ 10 g N-Laurylsarcosin-Na-Salz

Lysepuffer-Gebrauchslösung
89 mL Lysepuffer-Stammlösung + 10 mL DMSO + 1 mL Triton X-100

Neutralisationspuffer
48,5 g Tris
mit H_2O bidest. auf 1 L auffüllen
mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Lagerung bei 4°C

Vorbereiten der Objektträger

40 µL Normal Melting Agarose (NMA) auf einen Objektträger geben, mit einem Plastikspatel auf der gesamten Fläche des Objektträgers ausstreichen und trocknen lassen. Danach zweimal nebeneinander je 65 µL NMA auf den Objektträger geben und sofort mit einem Deckglas bedecken. Die Lagerung erfolgt bei 4°C in einer feuchten Box bis max. 1 Woche.

Einbetten in Agarose und Lyse

Aus der Viabilität und Zellzahl wird die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Je 4 Aliquots zu 50.000 (lebenden) Zellen werden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben und zentrifugiert (4°C, 10 Minuten, 2000 Upm). Der Überstand wird abgegossen und das Zellpellet in 65 µL Low Melting Agarose (LMA) resuspendiert. Die Deckgläser der vorbereiteten Objektträger werden abgenommen, die Zellsuspension auf die Gele

gegeben und wieder mit einem Deckglas zugedeckt. Dieser Schritt muss schnell geschehen, da sonst die LMA wieder fest wird. Die Objektträger auf Eis erkalten lassen.
Danach die Deckgläser wieder entfernen und die Objektträger in eine Färbekammer mit eiskaltem Lysepuffer stellen. Die Lyse erfolgt über Nacht bei 4°C.

Inkubation mit FPG und Elektrophorese

Den Lysepuffer abkippen und die Objektträger in der Färbekammer dreimal für je 5 Minuten mit ca. 100 mL eiskaltem Enzympuffer waschen.
Auf jedes Gel werden 50 µL Enzympuffer (- FPG) oder 50 µL Enzymlösung (+FPG) gegeben. Diese mit einem Deckglas zudecken und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubieren.

Dann werden die Deckgläser wieder abgenommen und die Objektträger in eine eisgekühlte Elektrophoresekammer gelegt, die mit eiskaltem Elektrophoresepuffer gefüllt ist. Der Puffer sollte die Objektträger etwa 0,5 cm hoch bedecken. Die Elektrophoresekammer schließen und die DNA für 20 Minuten denaturieren.
Nach 20 Minuten die Stromquelle einschalten (25 V, 0,89 V/cm) und die Stromstärke durch Zugabe oder Entnahme von Pufferlösung auf 300 mA einstellen. Die Elektrophorese läuft für 20 Minuten.

Auswertung

Nach der Elektrophorese werden die Objektträger mit eiskaltem Neutralisationspuffer (3x5 Minuten) gewaschen und mit 40 µL Ethidiumbromidlösung pro Gel angefärbt. Die Deckgläser werden unter dem Fluoreszenzmikroskop mäanderförmig abgesucht. Pro Deckglas werden 50 einzelne, sich nicht überlappende Zellen ausgezählt.
Die Quantifizierung der DNA-Schäden erfolgt über die Schweifintensität (tail intensity, TI, in %), dem Anteil der Fluoreszenz im Kometenschweif an der Gesamtfluoreszenz der Zelle

7.7. zellulärer Redox-Status (DCF-Assay)

Lösungen

DCFH-DA-Lösung
4,87 mg DCFH-DA
+ 1 mL DMSO
davon 50 µL + 10 mL PBS pH 7,0
Handhabung und Lagerung im Dunkeln, für jede Messung neu anzusetzen

PBS-Lösung pH 7,4
siehe Abschnitt 7.2

PBS-Lösung pH 7,0
PBS pH 7,4 einstellen auf pH 7,0

TBH-Stammlösung
20 µL TBH
+ 125 µL H_2O bidest.
davon 25 µL + 75 µL H_2O bidest. (250 mM TBH)
Lagerung bei 4°C, für jede Messung neu anzusetzen

TBH-Gebrauchslösung
20 µL der Stammlösung
+ 20 mL PBS pH 7,4
Lagerung bei 4°C, für jede Messung neu anzusetzen

In schwarzen 96-well Platten mit klarem Boden werden pro well 24.000 Zellen ausgesät und anwachsen gelassen. Nach 24 h wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 100 µL PBS pH 7,4 gewaschen. Danach erfolgt die 24-stündige Substanzinkubation mit 200µL Inkubationsmedium pro well (1 % DMSO). Die äußeren wells der Platte werden statt mit Inkubationsmedium mit PBS gefüllt. Das Inkubationsmedium wird abgesaugt, die Zellen werden einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen und die Zellen für 30 Minuten mit DCFH-DA-Lösung inkubiert (Brutschrank). Alle Arbeiten ab Zugabe von DCFH-DA erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs im Dunkeln (Rotlicht). Nach 30 Minuten wird der überschüssige Farbstoff entfernt und die Zellen einmal mit 100 µL PBS pH 7,4 gewaschen. Dann gibt man 200 µL TBH-Lösung in jedes well, stellt die Platte ins Photometer und führt sofort die erste Messung (t = 0 min) durch; die zweite Messung erfolgt nach 30 min.

Pipettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DMSO	TBH	TBH	SPL1 0,1	SPL1 0,3	SPL1 1	SPL1 3	SPL1 10	SPL1 30	SPL1 100	
C		DMSO	TBH	TBH	SPL1 0,1	SPL1 0,3	SPL1 1	SPL1 3	SPL1 10	SPL1 30	SPL1 100	
D		DMSO	TBH	TBH	SPL1 0,1	SPL1 0,3	SPL1 1	SPL1 3	SPL1 10	SPL1 30	SPL1 100	
E		DMSO	TBH	TBH	SPL2 0,1	SPL2 0,3	SPL2 1	SPL2 3	SPL2 10	SPL2 30	SPL2 100	
F		DMSO	TBH	TBH	SPL2 0,1	SPL2 0,3	SPL2 1	SPL2 3	SPL2 10	SPL2 30	SPL2 100	
G		DMSO	TBH	TBH	SPL2 0,1	SPL2 0,3	SPL2 1	SPL2 3	SPL2 10	SPL2 30	SPL2 100	
H												

DMSO Lösungsmittelkontrolle (Medium +1 % DMSO, kein TBH)

TBH TBH-Kontrolle (Medium +1 % DMSO, mit TBH)

SPL1,2 Medium mit Probe 1 bzw. 2 in entsprechender Konzentration; TBH-Behandlung

Die Messung erfolgt nach folgenden Messparametern:

Messmodus	Fluoreszenz
Temperatur	37 °C
Anregungswellenlänge	485 nm
Emissionswellenlänge	525 nm
Lesemodus	Bottom
Sensitivität	70
Messzeitpunkte	0 Minuten; 30 Minuten

Auswertung

Berechnet wurde der Anstieg der Fluoreszenzanstieg (fluorescence increase, FI) pro Loch analog der Rechnung nach [Wang und Joseph, 1999] wie folgt:

$$FI[\%] = \frac{F_{30\,\min} - F_{0\,\min}}{F_{0\,\min}}$$

$F_{30\,\min}$ Fluoreszenzintensität nach 30 min Inkubationsdauer

$F_{0\,\min}$ Fluoreszenzintensität nach 0 min Inkubationsdauer

Aus den Ergebnissen für die einzelnen wells wird der Mittelwert berechnet und als relativer Fluoreszenzanstieg bezogen auf die TBH-behandelte Kontrolle (=100 %) angegeben.

7.8. Proteinexpression (Western Blot)

Lösungen

	Trenngel 12 %	**Sammelgel 4 %**
H_2O bidest	1,72 mL	1,2 mL
Tris 1,5M (pH 8,8)	1,23 mL	---
Tris 0,5M (pH 6,8)	---	0,5 mL
SDS 10 %	49,2 µL	20 µL
TEMED	2,46 µL	2 µL
Acrylamid-Lösung 30 %	1,97 mL	250 µL
APS 10 %	24,6 µL	20 µL

In dieser Reihenfolge pipettieren. Das APS wird, als Polymerisationsstarter, zuletzt zugegeben. Die Menge ist ausreichend für ein Gel der Größe 8,6 x 6,8 cm (Mini-Gel).

Tris 1,5M (pH 8,8)
- 18,165 g Tris
- in ca. 800 mL H_2O bidest. lösen
- auf pH 8,8 einstellen (mit HCl bzw. NaOH)
- mit H_2O bidest. auf 1 L auffüllen
- Lagern bei RT

Tris 0,5M (pH 6,8)
- 6,055 g Tris
- in ca. 800 mL H_2O bidest. lösen
- auf pH 6,8 einstellen (mit HCl bzw. NaOH)
- mit H_2O bidest. auf 1 L auffüllen
- Lagern bei RT

SDS 10 % (w/v)
10g SDS
+ 100 mL H_2O bidest.
Lagerung bei RT

APS 10 % (w/v)
100 mg APS
+ 1 mL H_2O bidest.
Lagerung bei 4°C

Ladepuffer (6x)
50 mL Tris 0,5M + 160 mg Bromphenolblau + 1,24 g SDS + 40 mL Glycerin
mit H_2O bidest. auf 100 mL auffüllen
Aliquotieren auf 1 mL
Lagerung bei 4°C
Bei Anbruch eines neuen Aliquots: Zugabe von 50 µL 2-Mercaptoethanol (5 % v/v)

Laufpuffer (10x)
300 g Glycin (2 M) + 60,57 g Tris (250 mM) + 20 g SDS (1 % (w/v))
mit H_2O bidest. auf 2 L auffüllen
einstellen auf pH 8,3
Lagerung bei Raumtemperatur

Blotting-Puffer (2x)
11,7 g Glycin (78 mM) + 23,3 g Tris (96 mM) + 1,48 g SDS (0,074 % w/v)
+ 800 mL Methanol (40 % v/v)
Lagerung bei Raumtemperatur

Waschpuffer
250 mL TBS (20x) + 15 mL Tween-20 (0,3 %)
mit bidest. H_2O auf 5L auffüllen
Lagerung bei Raumtemperatur

Milchlösung
250 mL TBS/Tween-20 0,1 % + 12,5 g Milchpulver (5 %)
Lagerung bei 4°C

TBS (20x)
303,9 g NaCl (2,6 M) + 96,9 g Tris (0,4 M)
mit bidest. H_2O auf 2L auffüllen
einstellen auf pH 7,6
Lagerung bei Raumtemperatur

TBS/0,1 % Tween-20
50 mL TBS (20x) + 1 mL Tween-20 (0,1 %)
mit bidest. H_2O auf 1L auffüllen
Lagerung bei Raumtemperatur

Antikörper

Primärantikörper

Protein	Masse [kDa]	Antikörper [Santa Cruz]	Verdünnung	Volumen für 2 mL
Katalase	64	goat polyclonal	1:200	10 µL
SOD1	23	rabbit polyclonal	1:2000	10 µL
β-Aktin	43	mouse monoclonal	1:1000	2 µL
GAPDH	37	mouse monoclonal	1:1000	2 µL
α-Tubulin	55	mouse monoclonal	1:1000	2 µL

Die Primärantikörper werden in 2 mL TBS/0,1 % Tween-20 entsprechend der Tabelle verdünnt.

Sekundärantikörper

Antikörper [Santa Cruz]	Verdünnung	Volumen für 2 mL
donkey anti-goat	1:1000	2 µL
goat anti-mouse	1:1000	2 µL
goat anti-rabbit	1:1000	2 µL
donkey anti-mouse	1:1000	2 µL

Die Sekundärantikörper werden in 2 mL Milchlösung entsprechend der Tabelle verdünnt.

Zellernte und Aufarbeitung

Die Petrischale wird mit PBS gewaschen, mit 100 µL RIPA-Puffer + 0,1 % Protease-Inhibitor versetzt, abgeschabt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden die Zellen im Eisbad für 5 Sekunden mit dem Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen und dann zentrifugiert (4°C, 5 min, 5000 Upm). Danach werden 2x10 µL entnommen und eine Proteinquantifizierung nach Bradford durchgeführt. Die Proteinmenge des Überstandes wird mit H_2O bidest. eingestellt und die Proben bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Giessen des Gels

Pro Gel werden eine dicke Glasplatte mit Spacer (hinten) und eine dünne Glasplatte (vorne) mit Ethanol entfettet, so aufeinander gelegt, dass die Unterkanten bündig abschließen und in einen grünen Gießrahmen gespannt. Nach dem Einspannen in den Gieß-Stand wird der Raum zwischen den Glasplatten mittels einer Pasteur-Pipette mit ca. 3,5 mL Trenngel gefüllt und mit 1-Butanol überschichtet. Dies gewährt eine einheitliche horizontale Gelgrenze und verhindert, dass Sauerstoff an das Gel gelangt, welcher die Polymerisation hemmen würde. Nach dem Polymerisieren (ca. 45 Minuten) wird das 1-Butanol abgegossen und überschüssiges 1-Butanol mit einem Papiertuch entfernt. Dann wird das Sammelgel bis zur Oberkante der vorderen Glasplatte auf das Trenngel pipettiert und der Kamm eingesteckt. Nach dem Polymerisieren wird der grüne Gießrahmen entfernt. Nun kann das Gel samt Glasplatten und Kamm entweder sofort zur

Elektrophorese verwendet werden oder, in feuchte Papiertücher gewickelt, eine Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Proben

Nach dem Auftauen werden die Proben im Verhältnis 1:6 mit Ladepuffer versetzt, denaturiert (5 min. bei 95°C im Thermomixer) und zentrifugiert (Raumtemperatur, ½ min, 1000 Upm).

Elektrophorese

Die Glasplatten mit Gel und Kamm werden aus dem Gießrahmen entfernt und mit der Vorderseite (kleine Glasplatte) nach innen in den Halter der Elektrophoresekammer gespannt. Der mit zwei Gelen bestückte Halter wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Innenraum (zwischen den Gelen) bis zur Oberkante mit Laufpuffer gefüllt. Danach wird die Kammer bis zur Markierung mit Laufpuffer aufgefüllt und die Kämme werden vorsichtig entfernt. In jede Geltasche wird ein Aliquot der Probe pipettiert, die 1. Tasche bleibt dem in jedem Gel mitzuführenden Größenmarker (See Blue Plus 2) vorbehalten. Die Elektrophorese erfolgt mit konstanter Spannung von 150 V für ca. 60 Minuten (das Bromphenolblau sollte fast das Ende des Gels erreicht haben).

Western Blot

Nach der Elektrophorese wird die obere Glasplatte entfernt, das Sammelgel abgeschabt und das Trenngel vorsichtig in eine Schale mit Blottingpuffer überführt. Zeitgleich werden pro Gel eine Transfer-Membran und vier Stück Blotting-Papier (alle 8,3 x 5,5 cm) in Blotting-Puffer getränkt. In die Blottingkammer werden dann in dieser Reihenfolge auf die untere Graphitplatte (Anode) geschichtet:

Graphitplatte (Kathode)
Blotting-Papier
Blotting-Papier
Gel
Transfer-Membran
Blotting-Papier
Blotting-Papier
Graphitplatte (Anode)

Die entstandenen Luftblasen werden mit einer Rolle entfernt, das Oberteil der Blottingkammer mit der Kathodenplatte aufgelegt und mit einem Gewicht beschwert, um einen guten Kontakt zu gewährleisten. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran findet bei einem konstanten Stromfluss von 50 mA pro Gel (bei 2 Gelen dann entsprechend 100 mA), für 90 Minuten statt. Nach dem Blotten werden die Blotting-Papiere sowie das Trenngel verworfen; auf der Membran werden mit einem Kugelschreiber die Banden des Größenmarkers nachgezeichnet. Anschließend wird die

Membran für 1h bei Raumtemperatur in Milchlösung geschüttelt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und anschließend dreimal 5 Minuten (Horizontalschüttler) in Waschpuffer geschüttelt (gewaschen).

Inkubation mit dem Primär-Antikörper

Die Membran wird nach dem Waschen auf eine PP-Folie gelegt welche auf drei Seiten verschweißt wird. Dann werden 2 mL der Primär-Antikörper-Lösung zugegeben, evtl. vorhandene Luftblasen entfernt und die vierte Seite verschweißt. Die Inkubation erfolgt auf dem Überkopfschüttler über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wird die Membran dreimal für 5 Minuten gewaschen.

Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper

Die Membran wird auf eine Polypropylen-Folie gelegt, welche auf drei Seiten verschweißt wird. Dann werden 2 mL der Sekundär-Antikörper-Lösung zugegeben, evtl. vorhandene Luftblasen entfernt und die vierte Seite verschweißt. Die Inkubation erfolgt auf dem Überkopfschüttler für 1h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wird die Membran dreimal für 5 Minuten gewaschen.

Detektion

Pro Membran werden 4,5 mL H_2O bidest. mit je 250 µL LumiGlo-Reagent A und B für jedes Gel frisch angesetzt und in eine abdunkelbare Schale gegeben. Die Membran wird für eine Minute in dem Detektionsreagenz inkubiert. Die entstandene Chemolumineszenz wird mittels Lumi-Imager und der zugehörigen Software (LumiAnalyst) ausgewertet.

7.9. Quantifizierung von H_2O_2 (FOX-Assay)

Lösungen

Perchlorsäure: Dichte: 1670 g/L; M = 100,46 g/mol; ⇒ Lösung von 16,6 M

11 M Perchlorsäure:
3,38 mL H_2O
+ 6,62 mL Perchlorsäure 16,6 M
Starke Wärmeentwicklung - erst Wasser vorlegen, dann Säure zugeben!

Reagenz A:
98 mg Ammoniumeisen(II)sulfat $(NH_4)_2Fe^{2+}(SO_4)_2$
lösen in 10 mL 11 M Perchlorsäure (= 25 mM)

Reagenz B:
4,554 g Sorbitol (100 mM) + 23,77 mg Xylenol-Orange (125 µM)
lösen in 250 mL Wasser

Gebrauchslösung:
1 Teil Reagenz A
+ 100 Teile Reagenz B
(z.B. 200 µL A + 20 mL B)

Alle Messungen erfolgen als Dreifachbestimmung.

Zunächst wird eine H_2O_2-Verdünnungsreihe in H_2O bidest. mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 200 / 100 / 80 / 60 / 40 / 20 / 10 / 5 / 1 µM H_2O_2. Es werden dreimal je 20 µL H_2O bidest, Standard bzw. Probe in eine 96-well Platte pipettiert. Dazu werden pro well 200 µL der Gebrauchslösung gegeben (Mehrkanalpipette) und die Platte im Photometer für 20 min. bei 25°C inkubiert. Danach erfolgt die Absorptionsmessung bei 595 nm.

Nach Mittelwertbildung der Absorptionen wird zunächst eine H_2O_2-Standardkurve erstellt. Die Berechnung der H_2O_2-Konzentration der Proben erfolgt durch point-to-point fit, d.h. es wird immer für zwei Standard-Werte eine Regressionsgerade erstellt. Dieses Verfahren ist notwendig, da die Standardkurve ab einer Konzentration von ca. 80 µM H_2O_2 keine Linearität mehr aufweist (

Abbildung 7.2).

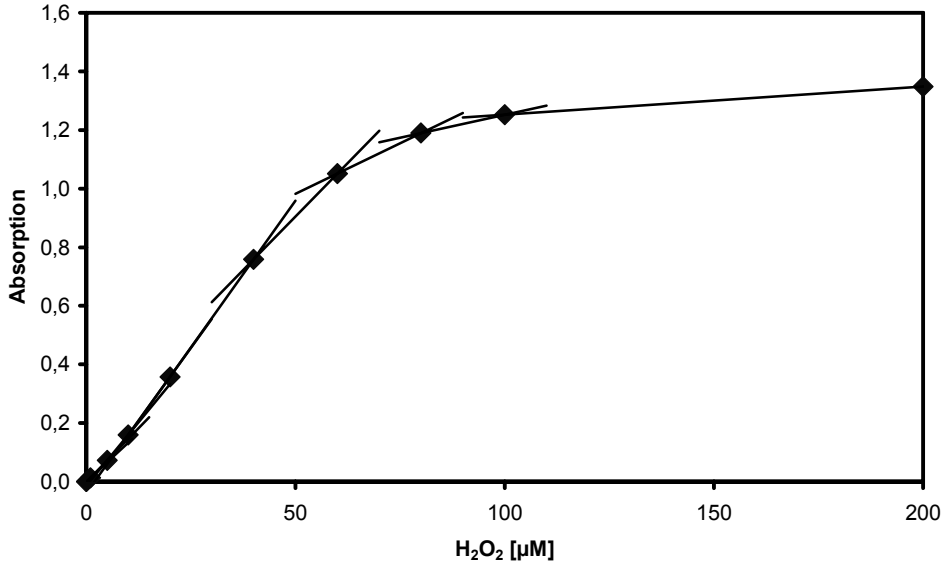


Abbildung 7.2: H_2O_2-Standardkurve (0-200 µM) mit point-to-point fit

7.10. Bestimmung der antioxidativen Wirksamkeit

7.10.1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

Lösungen

ABTS-Stammlösung
115,22 mg ABTS
+ 30 mL H_2O bidest. (7 mM ABTS)

Aktivierung der Radikallösung durch Zugabe von
19,869 mg Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$; 2,45 mM)
und anschließender Lagerung über Nacht im Dunkeln

ABTS-Gebrauchslösung
Einstellen der Stammlösung auf eine Absorption von 0,70 ± 0,02
Temperieren der Lösung auf 30°C
Täglich frisch anzusetzen

Trolox-Stammlösung
7,51 mg Trolox
lösen in 1 mL DMSO
Täglich frisch anzusetzen

Von den AEs wird eine Verdünnungsreihe in DMSO mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1,5 / 1,0 / 0,75 / 0,5 / 0,25 / 0,125 mg AE/mL. Von den Einzelsubstanzen werden Stammlösungen der Konzentration 3 mM hergestellt. Daraus wird eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1,5 / 1,0 / 0,75 / 0,5 / 0,25 / 0,125 mM. Die Trolox-Stammlösung (30 mM) wird zunächst 1:10 verdünnt. Aus dieser 3 mM Trolox-Lösung wird eine Verdünnungsreihe von 1,5 / 1,0 / 0,75 / 0,5 / 0,25 / 0,125 mM Trolox in DMSO hergestellt. Alle Messungen erfolgen als Doppelbestimmung. Von jeder Konzentration werden zweimal 2 µL in eine 96 well-Platte pipettiert. Zusätzlich werden noch 2 µL des Lösungsmittels (DMSO) als Nullwert sowie 2 µL Trolox 30 mM als Positivkontrolle in die Platte gegeben. Die äußeren Löcher der Platte werden dabei ausgespart.

Pipettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DMSO	T 30	SPL1 0,125	SPL1 0,25	SPL1 0,5	SPL1 0,75	SPL1 1,0	SPL1 1,5			
C		DMSO	T 30	SPL1 0,125	SPL1 0,25	SPL1 0,5	SPL1 0,75	SPL1 1,0	SPL1 1,5			
D		DMSO	T 30	SPL2 0,125	SPL2 0,25	SPL2 0,5	SPL2 0,75	SPL2 1,0	SPL2 1,5			
E		DMSO	T 30	SPL2 0,125	SPL2 0,25	SPL2 0,5	SPL2 0,75	SPL2 1,0	SPL2 1,5			
F		DMSO	T 30	SPL3 0,125	SPL3 0,25	SPL3 0,5	SPL3 0,75	SPL3 1,0	SPL3 1,5			
G		DMSO	T 30	SPL3 0,125	SPL3 0,25	SPL3 0,5	SPL3 0,75	SPL3 1,0	SPL3 1,5			
H												

DMSO 2 µL DMSO/well

T30 2 µL Trolox 30 mM/well

SPLx 2 µL Probe x der entsprechenden Konzentration (0,125-1,5 mM) pro well

Dabei entspricht SPL1 der Trolox-Standardreihe; bei mehreren Platten pro Tag wird diese nur einmal bestimmt. Danach werden zu den vorgelegten 2 µL Probe noch 198 µL der

vorbereiteten ABTS-Gebrauchslösung (Absorption 0,70 ± 0,02; 30°C) gegeben. Dies entspricht einer weiteren 1:100-Verdünnung. Die Platte wird ins Photometer gegeben, in dem eine 6-minütige Inkubation bei 30°C erfolgt. Danach wird die Messung bei einer Wellenlänge von 734 nm durchgeführt.

Zunächst wird der Mittelwert der Doppelbestimmung berechnet, von der die Absorption der Positivkontrolle subtrahiert wird. Dies korrigiert die noch vorhandene geringe Eigenextinktion (ungefähr 0,034) aus Lösung und Platte. Ohne diese Korrektur würde die Extinktion dazu führen, dass die prozentuale Entfärbung nicht 100 % erreichen kann. Dann wird für die Proben das Ausmaß der Entfärbung [E%], bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle berechnet:

$$E\% = \frac{E_{Solv} - E_P}{E_{Solv}} \cdot 100$$

E_{Solv} = Absorption der Lösemittelkontrolle

E_P= Extinktion der Probe

Zur Bestimmung des TEAC-Wertes werden die E%-Werte von Trolox bzw. der zu untersuchenden Substanzen gegen die Konzentration aufgetragen und die Steigungen der erhaltenen Geraden miteinander ins Verhältnis gesetzt:

$$TEAC = \frac{Steigung(\text{Probe})}{Steigung(\text{Trolox})}$$

Der TEAC-Wert gibt an, welche Konzentration Trolox [mM] nötig ist, um dieselbe Wirksamkeit zu erreichen wie eine Lösung der Konzentration 1 mM der untersuchten Probe.

7.10.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

<u>Lösungen</u>

Phosphatpuffer

221 mg $NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$ (1,6 mmol/L) + 1,494 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (10,5 mmol/L) + 8,766 g NaCl (150 mmol/L)
lösen in 0,8-0,9 L H_2O bidest.
einstellen auf pH 7,4 mit HCl bzw. NaOH
auffüllen auf 1L mit H_2O bidest.
Lagerung bei 4°C

NaOH-Lösung4g NaOH (2 mol/L)
lösen in 50 mL H_2O bidest.

Fluorescein-Stammlösung I (0,6 mmol/L)
5,6 mg Fluorescein-Natrium (Sigma 46960)
lösen in 25 mL Phosphatpuffer
+ 1 Tropfen NaOH-Lösung
Lagerung bei 4°C max. 4 Wochen

Fluorescein-Stammlösung II (0,12 mmol/L)
2 mL Fluorescein-Stammlösung (0,6 mmol/L)
verdünnen mit 8 mL Phosphatpuffer (1:5-Verdünnung)
Lagerung bei 4°C max. 2 Wochen

Fluorescein-Arbeitslösung (1,2 µmol/L)
100 µL Fluorescein- Arbeitslösung I (0,12 mmol/L)
verdünnen mit 9,9 mL Phosphatpuffer (1:100-Verdünnung)
Täglich frisch herstellen

AAPH-Lösung (129 mM)
875 mg AAPH (α,α'-Azodiisobutyramidine dihydrochloride, Sigma 11633)
lösen in 25 mL Phosphatpuffer
Täglich frisch herstellen
Lagerung bei 4°C

Trolox-Stammlösung (100 mmol/L)
25 mg Trolox
lösen in 1 mL DMSO
Täglich frisch herstellen

Aus der Trolox-Stammlösung (100 mM) wird eine Verdünnungsreihe in DMSO mit folgenden Schritten hergestellt:

Konzentration	**V** $_{(Trolox\text{-}Stammlsg.)}$	**V** $_{(DMSO)}$
100 mM		
40 mM	100 mM: 40µL	60µL
20 mM	40 mM: 50µL	50µL
10 mM	20 mM: 50µL	50µL
5 mM	10 mM: 50µL	50µL
2,5 mM	5 mM: 50µL	50µL
1,25 mM	2,5 mM: 50µL	50µL

Einzelstoffe werden in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und nach folgendem Schema weiter verdünnt:

Konzentration	**V** $_{(Probe.)}$	**V** $_{(DMSO)}$
10 mM		
2 mM	10 mM: 100µL	400µL
1 mM	10 mM: 50µL	450µL
0,2 mM	2 mM: 50µL	450µL

Alle Proben/Standards/Blank werden dann nochmals mit Puffer im Verhältnis 1:200 verdünnt (5µL Probe in DMSO + 995 µL Puffer). Es entstehen wässrige Lösungen (0,5 % DMSO) mit folgenden Konzentrationen: Trolox: 6,25 – 500 µmol/L; Probe: 5 – 100 µmol/L. Danach wird viermal 20 µL Probe/Standard/Blank in eine schwarze 96 well-Platte pipettiert und pro Well 100 µL Puffer zugegeben (Multipette).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	T 6,25	T 6,25	T 12,5	T 12,5	T 25	T 25	T 50	T 50	T 100	T 100
B	T 200	T 200	T 500	T 500	SPL1 5	SPL1 5	SPL1 10	SPL1 10	SPL1 50	SPL1 50	SPL1 100	SPL1 100
C	SPL2 5	SPL2 5	SPL2 10	SPL2 10	SPL2 50	SPL2 50	SPL2 100	SPL2 100	SPL3 5	SPL3 5	SPL3 10	SPL3 10
D	SPL3 50	SPL3 50	SPL3 100	SPL3 100	SPL4 5	SPL4 5	SPL4 10	SPL4 10	SPL4 50	SPL4 50	SPL4 100	SPL4 100
E	SPL4 100	SPL4 100	SPL4 50	SPL4 50	SPL4 10	SPL4 10	SPL4 5	SPL4 5	SPL3 100	SPL3 100	SPL3 50	SPL3 50
F	SPL3 10	SPL3 10	SPL3 5	SPL3 5	SPL2 100	SPL2 100	SPL2 50	SPL2 50	SPL2 10	SPL2 10	SPL2 5	SPL2 5
G	SPL1 100	SPL1 100	SPL1 50	SPL1 50	SPL1 10	SPL1 10	SPL1 5	SPL1 5	T 500	T 500	T 200	T 200
H	T 100	T 100	T 50	T 50	T 25	T 25	T 12,5	T 12,5	T 6,25	T 6,25	BLK	BLK

Mit BLK Blank (Puffer + 0,5 % DMSO)
T Trolox 6,25 - 500 µmol/L
SPL Probe (sample) 1 / 2 / 3 / 4

Die Mikrotiterplatte wird ins vorbereitete Lesegerät gestellt und die Methode (s. unten) gestartet.

Methode Synergy 2: ORAC.prt

```
Temperature setpoint 37°C
Platte einfahren
Start synchronized plate mode
    Dispense 25 µL aus Dispenser 1; (Fluorescein-Lösung)
    Delay 10 Minuten
    Start kinetic (Run time 4 min; Interval 2 min)
      Read Fluorescence Ex/Em: 485/528
    End kinetic
    Dispense 100 µL aus Dispenser 2; (AAPH-Lösung)
    Shake medium for 5 sec
    Start kinetic (Run time 1 h 26 min; Interval 2 min)
      Read Fluorescence Ex/Em: 485/528
    End kinetic
End synchronized plate mode
```

Die Software des Plattenreaders berechnet nach der vorgegebenen Formel zunächst die Fläche unter der Fluoreszenzkinetik (Area Under Curve, AUC):

$$AUC = 1 + \frac{\sum_{i=2}^{48} F_i}{F_1}$$

mit F_i = Fluoreszenz der Messung # i

Danach wird die AUC der Negativkontrolle von der der Proben/Standards subtrahiert:

$$AUC_{net} = AUC_{Probe/Standard} - AUC_{Negativkontrolle}$$

Es wird eine lineare Regression der Standards (6,25 – 500 µM Trolox gegen deren AUC_{net}) sowie der Proben (1 – 50 µM) durchgeführt. Der ORAC Wert berechnet sich als Quotient der Steigungen von Trolox-Gerade und der Regression der Proben:

$$\mathrm{ORAC[TE]} = \frac{\mathrm{Steigung(Probe)}}{\mathrm{Steigung(Trolox)}}$$

Der ORAC-Wert gibt an, welche Konzentration Trolox [mM] nötig ist, um dieselbe Wirksamkeit zu erreichen wie eine Lösung der Konzentration 1 mM der untersuchten Probe.

7.11. Analytik der fermentierten Apfelsaftextrakte

Geräte

HPLC-System	[Jasco]
Pumpe	PU-1580
Degasser	DG-1580-53
Gradientenmischer	LG-1580-02
Autosampler	AS-1550
DAD	MD-2015
Software	Borwin [Jasco] Borwin PDF [Jasco]
Säule	Aqua C18 (250x4,6 mm, 5µm Partikelgröße) mit Vorsäule (4x3 mm C18 ODS SecurityGuard) [Phenomenex]
ESI-MS/MS	Sciex API 3200 [Applied Biosystems] mit Software Analyst 1.4.2 [Applied Biosystems]

Verbrauchsmaterialien

HPLC-Vials	[Jasco]
Inserts 300 µL	[Jasco]
Teflon-Septen	[Jasco]
Spritzen	1 mL [B.Braun]
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm, 13 mm ∅ [Pall]

Chemikalien

Ameisensäure [Merck]
Methanol (MeOH) [J.T. Baker]

Lösungen

Fliessmittel A: 1 L H_2O bidest. + 1 mL Ameisensäure
Fliessmittel B: Methanol

Vorbereitung der Proben

Aliquots der Fermentationsüberstände (1 mL) wurden lyophilisiert, in 500 µL MeOH aufgenommen und vor der Messung filtriert (0,45 µm).

Standardreihen

Für alle zu untersuchenden Substanzen wurden Stammlösungen der Konzentration 1,6 mg/mL angesetzt, welche dann zunächst 1:10 verdünnt wurde (160 mg/L). Daraus wurden durch 1:2-Verdünnung Kalibriergeraden im Bereich von 0,15625 – 160 mg/L hergestellt. Verwendetes Lösungsmittel war ein Gemisch von Methanol und Wasser im Verhältnis 2,3:1 (140 mL MeOH + 60 mL H_2O bidest.).

Interner Standard

Als Interner Standard wurde jeder Messung die Substanz 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure zugesetzt.

HPLC-DAD-Analytik

Die Auftrennung der fermentierten Apfelsaftextrakte erfolgte nach Zugabe des internen Standards mit folgenden Einstellungen:

Gradient	0 min 5 % B 5 min 20 % B 20 min 35 % B 40 min 58.5 % B 43 min 99 % B
Flow	1.2 mL/min
Injektionsvolumen	25 µL
Detektions-wellenlängen	Flavonole: 370 nm Hydroxyzimtsäuren: 320 nm Dihydrochalcone, phenolische Säuren, Flavanole: 280 nm Phloroglucinol, 3-Phenylpropionsäure: 210 nm

HPLC-ESI-MS-Analytik

Die Auftrennung der fermentierten Apfelsaftextrakte erfolgte mit oben genannten HPLC-Einstellungen und folgenden MS-Parametern:

Ionisation	ESI^- (negative Ionisation)
Spannung Spray-Kapillare	4,5 kV
Curtain Gas	nitrogen, 450 °C, 25 psi
GS1	nitrogen, 50 psi.
GS2	nitrogen, 40 psi.
Electron multiplier voltage	2,2 kV
Declustering potential,	-40 V
Entrance potential	-4,5 V
Operation mode	full scan, 120 – 900 u
Total scan duration	1,0 s
Dwell time	2 ms

Die Zuordnung der Peaks im HPLC-Chromatogramm erfolgte durch Vergleich von UV/Vis-Spektrum und Retentionszeit mit den Werten externer Standardverbindungen.

Die Identifikation der Substanzen mittels HPLC-ESI-MS erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit und der Masse der Molekülionenpeaks mit den Werten externer Standardverbindungen.

7.12. Statistik

Zur Berechnung der Ergebnisse der Einzelversuche wurden die Daten der Mehrfachdurchführungen gemittelt. Die Endergebnisse der Assays sind arithmetische Mittelwerte (MW) aus mindestens drei Einzelversuchen ($n \geq 3$), wobei n die Anzahl der unabhängig durchgeführten Versuche darstellt. Als Fehler ist die Standardabweichung (SD) angegeben.

Berechnung der statistischen Signifikanz

Zur Berechnung der signifikanten Abnahme der oxidativen Schädigung (DCF-Assay, Comet Assay) wurde der unabhängige Zweistichproben-t-Test (einseitig) nach Student angewendet. Dabei lautete die Nullhypothese H_0: Die Differenz aus (Oxidans + Polyphenol)-Proben und Oxidans-Proben ist gleich Null. Bei Untersuchungen ohne Oxidansbehandlung (tGSH, SOD1-Expression) erfolgte der Vergleich ebenfalls mittels unabhängigem Zweistichproben-t-Test (einseitig) nach Student. Hier lautete die Nullhypothese H_0: Die Differenz aus Polyphenol-Proben und Lösemittel-Proben ist gleich Null:

$$H_0 = MW_{Ko} - MW_T = 0$$

MW_{Ko} = Mittelwert der Kontroll-Proben

MW_T = Mittelwert der Polyphenol-behandelten Proben

Die Alternativhypothese H_1 hatte die Form

$$H_1 = MW_{Ko} - MW_T > 0$$

bzw. $$H_1 = MW_{Ko} > MW_T$$

Als Signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p<0,05$ angenommen. Die Berechnung erfolgte mit Microcal Origin 7.5.

Ausreißer-Test

Zur Prüfung, ob ein Wert auf Grund seiner hohen Abweichung aus der Mittelwertbildung entfernt werden kann, wurde der Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt. Dazu müssen für den Test mindestens drei Werte ($n \geq 3$) vorliegen. Die Kontrolle erfolgt auf den kleinsten und auf den größten Wert. Für diese wird jeweils eine Prüfgröße (PG) berechnet und mit einem Tabellenwert (mit P = 95 %) verglichen. Ist die berechnete Prüfgröße

kleiner als der Tabellenwert, so liegt kein Ausreißer vor. Die Prüfgröße nach Nalimov berechnet sich wie folgt:

$$PG = \frac{\left| x^* - MW \right|}{SD} * \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

x*	= ausreißerverdächtiger Wert	MW	= Mittelwert
SD	= Standardabweichung	n	= Anzahl der Stichproben

Die Tabelle und weitere Grundlagen sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen [Gottwald, 2000].

8. Literaturverzeichnis

Ader, P., Grenacher, B., Langguth, P., Scharrer, E., Wolffram, S., *Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer*, Exp Physiol 1996, *81*, 943-955.

Agullo, G., Gamet, L., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C., *Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells*, Cancer Lett 1994, *87*, 55-63.

Aherne, S. A., O'Brien, N. M., *Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells*, Free Radic Biol Med 2000, *29*, 507-514.

Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S., *Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants*, J Exp Bot 2002, *53*, 1331-1341.

Altman, S. A., Zastawny, T. H., Randers, L., Lin, Z., Lumpkin, J. A., Remacle, J., Dizdaroglu, M., Rao, G., *tert.-butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mammalian cells*, Mutat Res 1994, *306*, 35-44.

Amorati, R., Franchi, P., Pedulli, G. F., *Intermolecular hydrogen bonding modulates the hydrogen-atom donating ability of hydroquinones*, Angew Chem Int Edit 2007, *46*, 6336-6338.

Amorati, R., Pedulli, G. F., Cabrini, L., Zambonin, L., Landi, L., *Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids*, J Agric Food Chem 2006, *54*, 2932-2937.

Appeldoorn, M. M., Vincken, J. P., Aura, A. M., Hollman, P. C., Gruppen, H., *Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites*, J Agric Food Chem 2009, *57*, 1084-1092.

Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van der Woude, H., van Zanden, J., van Bladeren, P. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M., *Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system*, FEBS Lett 2002, *520*, 30-34.

Baez, S., Linderson, Y., Segura-Aguilar, J., *Superoxide dismutase and catalase enhance autoxidation during one-electron reduction of aminochrome by NADPH-cytochrome P-450 reductase*, Biochem Mol Med 1995, *54*, 12-18.

Barnes, D., Sato, G., *Methods for growth of cultured cells in serum-free medium*, Anal Biochem 1980, *102*, 255-270.

Barry, J. L., Hoebler, C., Macfarlane, G. T., Macfarlane, S., Mathers, J. C., Reed, K. A., Mortensen, P. B., Nordgaard, I., Rowland, I. R., Rumney, C. J., *Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study*, Br J Nutr 1995, *74*, 303-322.

Barth, S. W., Faehndrich, C., Bub, A., Watzl, B., Will, F., Dietrich, H., Rechkemmer, G., Briviba, K., *Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis*, J Agr Food Chem 2007, *55*, 1181-1187.

Barth, S. W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K., Rechkemmer, G., *Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats*, Carcinogenesis 2005, *26*, 1414-1421.

Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., Thomas, M., *Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils - a Graded Response to Membrane Stimulation*, J Immunol 1983, *130*, 1910-1917.

Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001.

Bellion, P., *Untersuchungen zur Modulation oxidativer Zellschäden durch fermentierte phenolische Extrakte aus Apfelsaft*, Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2006.

Bergmann, H., Richling, E., persönliche Mitteilung, 2009, pers. Mitteilung
Berlau, J., Glei, M., Pool-Zobel, B. L., *Colon cancer risk factors from nutrition*, Anal Bioanal Chem 2004, *378*, 737-743.
Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M., Dvorakova, K., Garewal, H., *Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers*, Mutat Res 2005, *589*, 47-65.
Beyer-Sehlmeyer, G., Glei, M., Hartmann, E., Hughes, R., Persin, C., Bohm, V., Rowland, I., Schubert, R., Jahreis, G., Pool-Zobel, B. L., *Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources*, Br J Nutr 2003, *90*, 1057-1070.
Biesalski, H. K., Fürst, P., in *Ernährungsmedizin*, 2. Auflage (Eds.: Biesalski, H. K., Kasper, H., Fürst, P., Kluthe, R., Pölert, W., Puchstein, C., Stähelin, H. B.), Georg ThiemeVerlag, Stuttgart, New York, 1999, pp. 60-191.
Biesalski, H. K., Grimm, P., *Taschenatlas der Ernährung*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2004.
Blaut, M., Clavel, T., *Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease*, J Nutr 2007, *137*, 751S-755S.
Blaut, M., Collins, M. D., Welling, G. W., Dore, J., van Loo, J., de Vos, W., *Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project*, Br J Nutr 2002, *87 Suppl 2*, S203-211.
Blaut, M., Schoefer, L., Braune, A., *Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms*, Int J Vitam Nutr Res 2003, *73*, 79-87.
Bloch, M., Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2005.
BMELV, *Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten*, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, www.bmelv-statistik.de, Bonn, 2008.
Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., Monks, T. J., *Role of quinones in toxicology*, Chem Res Toxicol 2000, *13*, 135-160.
Borek, C., *Dietary antioxidants and human cancer*, Integr Cancer Ther 2004, *3*, 333-341.
Boulton, D. W., Walle, U. K., Walle, T., *Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism*, J Pharm Pharmacol 1999, *51*, 353-359.
Boyer, J., Liu, R. H., *Apple phytochemicals and their health benefits*, Nutr J 2004, *3*, 5.
Bradford, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem 1976, *72*, 248-254.
Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M., *Degradation of quercetin and luteolin by Eubacterium ramulus*, Appl Environ Microbiol 2001, *67*, 5558-5567.
Breinholt, V. M., Offord, E. A., Brouwer, C., Nielsen, S. E., Brosen, K., Friedberg, T., *In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids*, Food Chem Toxicol 2002, *40*, 609-616.
Brigati, G., Lucarini, M., Mugnaini, V., Pedulli, G. F., *Determination of the substituent effect on the O-H bond dissociation enthalpies of phenolic antioxidants by the EPR radical equilibration technique*, J Org Chem 2002, *67*, 4828-4832.
Brigelius-Flohe, R., *Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors*, Biol Chem 2006, *387*, 1329-1335.
Brown, J. P., Dietrich, P. S., *Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test: activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources*, Mutat Res 1979, *66*, 223-240.
Calcagno, A. M., Ludwig, J. A., Fostel, J. M., Gottesman, M. M., Ambudkar, S. V., *Comparison of drug transporter levels in normal colon, colon cancer, and Caco-2 cells: Impact on drug disposition and discovery*, Mol Pharmaceut 2006, *3*, 87-93.
Camera, E., Picardo, M., *Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes*, J Chromatogr B 2002, *781*, 181-206.
Campos, A. M., Lissi, E. A., *Kinetics of the reaction between 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols*, International Journal of Chemical Kinetics 1997, *29*, 219-224.

Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G., *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*, Free Radic Biol Med 1993, *14*, 303-311.

Chen, C. H., Hsu, H. J., Huang, Y. J., Lin, C. J., *Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters*, Planta Med 2007, *73*, 348-354.

Cheynier, V., Osse, C., Rigaud, J., *Oxidation of Grape Juice Phenolic-Compounds in Model Solutions*, J Food Sci 1988, *53*, 1729-&.

Collins, A., Lunec, J., Griffiths, H., in *Measuring in vivo oxidative damage: a practical approach, Vol. 7*, John Wiley & Sons, 2000, pp. 83-93.

Collins, A. R., Harrington, V., Drew, J., Melvin, R., *Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study*, Carcinogenesis 2003, *24*, 511-515.

Craig, W. J., *Health-promoting properties of common herbs*, Am J Clin Nutr 1999, *70*, 491S-499S.

Crow, J. P., *Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species*, Nitric Oxide-Biol Ch 1997, *1*, 145-157.

Cullmann, M., *Einfluss von Apfelinhaltsstoffen auf die Superoxid-Dismutase- und Katalase-Aktivität in humanen Darmkrebszellen*, Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2009.

Czeczot, H., Tudek, B., Kusztelak, J., Szymczyk, T., Dobrowolska, B., Glinkowska, G., Malinowski, J., Strzelecka, H., *Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs*, Mutat Res 1990, *240*, 209-216.

Dangles, O., Fargeix, G., Dufour, C., *One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media*, J Chem Soc, Perkin Trans. 2 1999, 1387-1395.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*, Ann Ist Super Sanita 2007, *43*, 348-361.

Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay*, J Agric Food Chem 2004, *52*, 48-54.

Davis, B. D., Brodbelt, J. S., *Regioselectivity of human UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 in the synthesis of flavonoid glucuronides determined by metal complexation and tandem mass spectrometry*, J Am Soc Mass Spectrom 2008, *19*, 246-256.

Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A., Williamson, G., *Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase*, FEBS Letters 2000, *468*, 166-170.

Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M. R. A., Williamson, G., *Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin*, Free Radical Res 2001, *35*, 941-952.

Day, R. M., Suzuki, Y. J., *Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione*, Dose Response 2005, *3*, 425-442.

de Kok, T. M., van Breda, S. G., Manson, M. M., *Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review*, Eur J Nutr 2008, *47 Suppl 2*, 51-59.

Deneo-Pellegrini, H., De Stefani, E., Ronco, A., *Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay*, Nutr Cancer 1996, *25*, 297-304.

Digles, J., *Einfluss von Apfelinhaltsstoffen auf die Glutathion-Peroxidase-Aktivität in humanen Darmkrebszellen*, Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, 2008.

Donaldson, M. S., *Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet*, Nutr J 2004, *3*, 19.

Dooley, M. M., Sano, N., Kawashima, H., Nakamura, T., *Effects of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride in vivo and protection by vitamin E*, Free Radic Biol Med 1990, *9*, 199-204.

DSMZ, *Human and Animal Cell Line*, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, 2006.

Du, Y., Guo, H., Lou, H., *Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes*, J Agric Food Chem 2007, *55*, 1695-1701.

Duarte, J., Andriambeloson, E., Diebolt, M., Andriantsitohaina, R., *Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation*, Physiol Res 2004, *53*, 595-602.

Dulbecco, R., Freeman, G., *Plaque production by the polyoma virus*, Virology 1959, *8*, 396-397.

Eisenbrand, G., Metzler, M., *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

Eisenbrand, G., Metzler, M., Hennecke, F. J., *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

Ellman, G. L., *Tissue Sulfhydryl Groups*, Archives of Biochemistry and Biophysics 1959, *82*, 70-77.

Estevez, L., Mosquera, R. A., *Molecular Structure and Antioxidant Properties of Delphinidin*, J Phys Chem A 2008, *112*, 10614-10623.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L., Oneill, K. L., *The Comet Assay - a Comprehensive Review*, Mutat Res-Rev Genet 1995, *339*, 37-59.

Faller, A., *Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion*, 13. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.

Fearnhead, N. S., Britton, M. P., Bodmer, W. F., *The ABC of APC*, Hum Mol Genet 2001, *10*, 721-733.

Fearon, E. R., Vogelstein, B., *A genetic model for colorectal tumorigenesis*, Cell 1990, *61*, 759-767.

Ferguson, L. R., Zhu, S. T., Harris, P. J., *Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells*, Mol Nutr Food Res 2005, *49*, 585-593.

Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D. J., Land, E. J., Truscott, T. G., Rice-Evans, C. A., *Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids*, Free Radical Biology and Medicine 1999, *26*, 1202-1208.

Foti, M. C., *Antioxidant properties of phenols*, Journal of Pharmacy and Pharmacology 2007, *59*, 1673-1685.

Frank, J., Biesalski, H. K., Dominici, S., Pompella, A., *The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells*, Histol Histopathol 2000, *15*, 173-184.

Fridrich, D., Kern, M., Pahlke, G., Volz, N., Will, F., Dietrich, H., Marko, D., *Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells*, Mol Nutr Food Res 2007, *51*, 594-601.

Friedman, M., Jurgens, H. S., *Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds*, J Agric Food Chem 2000, *48*, 2101-2110.

Gallagher, E. P., Kavanagh, T. J., Eaton, D. I., *Glutathione, oxidized Glutathione, and mixed disulfides in biological samples*, Methods in Toxicology 1994, *1b*, 349-366.

Gallus, S., Talamini, R., Giacosa, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Franceschi, S., Negri, E., La Vecchia, C., *Does an apple a day keep the oncologist away?*, Ann Oncol 2005, *16*, 1841-1844.

Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y., Lu, J., Bensoussan, L., Seeram, N. P., Heber, D., Henning, S. M., *Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity*, J Nutr 2006, *136*, 52-57.

Garner, A. P., Paine, M. J. I., Rodriguez-Crespo, I., Chinje, E. C., De Montellano, P. O., Stratford, I. J., Tew, D. G., Wolf, C. R., *Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents*, Cancer Research 1999, *59*, 1929-1934.

Gay, C., Gebicki, J. M., *A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay*, Anal Biochem 2000, *284*, 217-220.

Geiger, P. G., Thomas, J. P., Girotti, A. W., *Lethal damage to murine L1210 cells by exogenous lipid hydroperoxides: protective role of glutathione-dependent selenoperoxidases*, Arch Biochem Biophys 1991, *288*, 671-680.

Gerhäuser, C., *Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple juice, and Apple Components*, Planta Medica 2008, *74*, 1608-1624.

Gerhäuser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauft, J., Liu, G. Y., Sitthimonchai, S., Frank, N., *Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents*, Mutat Res-Fund Mol M 2003, *523*, 163-172.

Giacomelli, C., Ckless, K., Galato, D., Miranda, F. S., Spinelli, A., *Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5*, J Brazil Chem Soc 2002, *13*, 332-338.

Glazer, A. N., *Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine*, Faseb J 1988, *2*, 2487-2491.

Glei, M., Hofmann, T., Kuster, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Pool-Zobel, B. L., *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*, J Agric Food Chem 2006, *54*, 2088-2095.

Gölzer, P., Janzowski, C., Pool-Zobel, B. L., Eisenbrand, G., *(E)-2-hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,N2-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells*, Chem Res Toxicol 1996, *9*, 1207-1213.

Gonzalez-Gallego, J., Sanchez-Campos, S., Tunon, M. J., *Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids*, Nutr Hosp 2007, *22*, 287-293.

Gottschalk, G., *Bacterial metabolism*, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1988.

Gottwald, W., *Statistik für Anwender*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000.

Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., Veit, M., *Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans*, J Clin Pharmacol 2001, *41*, 492-499.

Guarrera, S., Sacerdote, C., Fiorini, L., Marsala, R., Polidoro, S., Gamberini, S., Saletta, F., Malaveille, C., Talaska, G., Vineis, P., Matullo, G., *Expression of DNA repair and metabolic genes in response to a flavonoid-rich diet*, Br J Nutr 2007, *98*, 525-533.

Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F., Chasteen, N. D., *Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects*, Dalton Trans 2007, 4951-4961.

Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., Drilleau, J. F., *Variability of the polyphenolic composition of cider apple (Malus domestica) fruits and juices*, J Agric Food Chem 2003, *51*, 6240-6247.

Halliwell, B., *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?*, Arch Biochem Biophys 2008, *476*, 107-112.

Halliwell, B., *Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?*, FEBS Lett 2003, *540*, 3-6.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. Auflage, Oxford University Press, Oxford, New York, 1999.

Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A., *Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?*, Am J Clin Nutr 2005, *81*, 268S-276S.

Herraiz, M., Munoz-Navas, M., *Recognition and management of hereditary colorectal cancer syndromes*, Rev Esp Enferm Dig 2009, *101*, 125-132.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002.

Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., *Detection of phloridzin in strawberries (Fragaria x ananassa Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy*, J Agric Food Chem 2003, *51*, 2896-2899.

Hodnick, W. F., Milosavljevic, E. B., Nelson, J. H., Pardini, R. S., *Electrochemistry of Flavonoids - Relationships between Redox Potentials, Inhibition of Mitochondrial*

Respiration, and Production of Oxygen Radicals by Flavonoids, Biochemical Pharmacology 1988, *37*, 2607-2611.

Hoeijmakers, J. H., *Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases*, Mech Ageing Dev 2007, *128*, 460-462.

Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J., Klump, B., *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2004.

Horvathova, E., Slamenova, D., Hlincikova, L., Mandal, T. K., Gabelova, A., Collins, A. R., *The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay*, Mutat Res-DNA Repair 1998, *409*, 163-171.

Huang, C., Chen, Y., Zhou, T., Chen, G., *Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases*, Xenobiotica 2009, *39*, 312-322.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., *The chemistry behind antioxidant capacity assays*, J Agric Food Chem 2005, *53*, 1841-1856.

Hümmer, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Richling, E., *Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices*, Biotechnol J 2008, *3*, 234-243.

Hümmer, W., Schreier, P., *Analysis of proanthocyanidins*, Molecular Nutrition & Food Research 2008, *52*, 1381-1398.

Huxley, R. R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C. L., Woodward, M., *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*, Int J Cancer 2009, *125*, 171-180.

Invitrogen, *Invitrogen Katalog Online: www.invitrogen.com*.

Ishii, T., Sunami, O., Nakajima, H., Nishio, H., Takeuchi, T., Hata, F., *Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide*, Biochem Pharmacol 1999, *58*, 133-143.

Jacob, S., Praz, F., *DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis*, Biochimie 2002, *84*, 27-47.

Janzowski, C., Glaab, V., Müller, C., Straesser, U., Kamp, H. G., Eisenbrand, G., *Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells*, Mutagenesis 2003, *18*, 465-470.

Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., Eisenbrand, G., *5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione*, Food Chem Toxicol 2000, *38*, 801-809.

Jenner, A. M., Rafter, J., Halliwell, B., *Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds*, Free Radic Biol Med 2005, *38*, 763-772.

Jeong, J. B., Hong, S. C., Jeong, H. J., *3,4-dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (Hordeum vulgare) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity*, Phytomedicine 2009, *16*, 85-94.

Jovanovic, S. V., Simic, M. G., *Antioxidants in nutrition*, Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology 2000, *899*, 326-334.

Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M. G., *Flavonoids as Antioxidants*, J Am Chem Soc 1994, *116*, 4846-4851.

Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., Erk, T., Richling, E., *Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption*, J Agric Food Chem 2007, *55*, 10605-10614.

Kahle, K., Kraus, M., Richling, E., *Polyphenol profiles of apple juices*, Mol Nutr Food Res 2005a, *49*, 797-806.

Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Richling, E., *Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects*, Mol Nutr Food Res 2005b, *49*, 1143-1150.

Kameoka, S., Leavitt, P., Chang, C., Kuo, S. M., *Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids*, Cancer Lett 1999, *146*, 161-167.

Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E., *Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action*, Breast Cancer Res 2004, *6*, R63-74.

Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N. H., Hyun, J. W., *Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation*, J Cell Biochem 2006, *97*, 609-620.

Karczewski, J. M., Peters, J. G., Noordhoek, J., *Quinone toxicity in DT-diaphorase-efficient and -deficient colon carcinoma cell lines*, Biochem Pharmacol 1999, *57*, 27-37.

Kass, G. E., Orrenius, S., *Calcium signaling and cytotoxicity*, Environ Health Perspect 1999, *107 Suppl 1*, 25-35.

Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., *Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies*, Mutat Res-Rev Mutat 2000, *463*, 13-31.

Kedage, V. V., Tilak, J. C., Dixit, G. B., Devasagayam, T. P., Mhatre, M., *A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (Vitis vinifera L.)*, Crit Rev Food Sci Nutr 2007, *47*, 175-185.

Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., Levin, E. D., *Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems*, Environ Health Perspect 1998, *106*, 375-384.

Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussher, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G., Rufer, C., Marko, D., *Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid*, Mol Nutr Food Res 2007, *51*, 1163-1172.

Kern, M., Tjaden, Z., Ngiewih, Y., Puppel, N., Will, F., Dietrich, H., Pahlke, G., Marko, D., *Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract*, Mol Nutr Food Res 2005, *49*, 317-328.

Kern, S. M., Bennett, R. N., Needs, P. W., Mellon, F. A., Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M. T., *Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells*, J Agric Food Chem 2003, *51*, 7884-7891.

Keston, A. S., Brandt, R., *Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide*, Analytical Biochemistry 1965, *11*, 1-&.

Kim, Y. J., Yokozawa, T., *Modulation of oxidative stress and melanogenesis by proanthocyanidins*, Biol Pharm Bull 2009, *32*, 1155-1159.

Klotz, L. O., Patak, P., Ale-Agha, N., Buchczyk, D. P., Abdelmohsen, K., Gerber, P. A., von Montfort, C., Sies, H., *2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K-3, decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade*, Cancer Research 2002, *62*, 4922-4928.

Knaup, B., Schreier, P., persönliche Mitteilung, 2006, pers. Mitteilung

Kondo, Y., Issa, J. P., *Epigenetic changes in colorectal cancer*, Cancer Metastasis Rev 2004, *23*, 29-39.

Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H., *Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines*, Eur J Nutr 1999, *38*, 133-142.

Labib, S., Erb, A., Kraus, M., Wickert, T., Richling, E., *The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids*, Mol Nutr Food Res 2004, *48*, 326-332.

Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 1970, *227*, 680-685.

Lapidot, T., Walker, M. D., Kanner, J., *Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H(2)O(2) during interaction of phenolic compounds with cell culture media*, J Agric Food Chem 2002, *50*, 3156-3160.

Laval, J., *Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress*, Pathol Biol (Paris) 1996, *44*, 14-24.

Le Bourvellec, C., Le Quere, J. M., Renard, C. M. G. C., *Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: Studies in model suspensions and application*, J Agr Food Chem 2007, *55*, 7896-7904.

Lea, A. G. H., Arnold, G. M., *Phenolics of Ciders - Bitterness and Astringency*, J Sci Food Agr 1978, *29*, 478-483.

LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C., *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*, Chem Res Toxicol 1992, *5*, 227-231.

Lecker, S. H., Goldberg, A. L., Mitch, W. E., *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*, J Am Soc Nephrol 2006, *17*, 1807-1819.

Lee, J. S., Surh, Y. J., *Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention*, Cancer Lett 2005, *224*, 171-184.

Lee, K. W., Hur, H. J., Lee, H. J., Lee, C. Y., *Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide*, J Agr Food Chem 2005, *53*, 1990-1995.

Lee-Hilz, Y. Y., Boerboom, A. M., Westphal, A. H., Berkel, W. J., Aarts, J. M., Rietjens, I. M., *Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression*, Chem Res Toxicol 2006, *19*, 1499-1505.

Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E., Rietjens, I. M., *The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones*, Free Radic Biol Med 2001, *31*, 869-881.

Li, H., Flachowsky, H., Fischer, T. C., Hanke, M. V., Forkmann, G., Treutter, D., Schwab, W., Hoffmann, T., Szankowski, I., *Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (Malus domestica Borkh.)*, Planta 2007, *226*, 1243-1254.

Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 2002.

Litwinienko, G., Ingold, K. U., *Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals*, Accounts Chem Res 2007, *40*, 222-230.

Long, L. H., Clement, M. V., Halliwell, B., *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 2000, *273*, 50-53.

Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., Halliwell, B., *Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium*, Mutat Res 2007, *634*, 177-183.

Lottspeich, F., Zorbas, H., *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998.

Lu, S., Luo, Y., Feng, H., *Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by sodium chlorite*, J Agric Food Chem 2006, *54*, 3693-3696.

Lucarini, M., Pedulli, G. F., Guerra, M., *A critical evaluation of the factors determining the effect of intramolecular hydrogen bonding on the O-H bond dissociation enthalpy of catechol and of flavonoid antioxidants*, Chemistry 2004, *10*, 933-939.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K. P., Dexter, D. T., Aruoma, O. I., *Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas*, Food Res Int 2005, *38*, 357-367.

Mahattanatawee, K., Manthey, J. A., Luzio, G., Talcott, S. T., Goodner, K., Baldwin, E. A., *Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits*, J Agric Food Chem 2006, *54*, 7355-7363.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*, American Journal of Clinical Nutrition 2004, *79*, 727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*, Am J Clin Nutr 2005, *81*, 230S-242S.

Marnett, L. J., *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*, Mutat Res 1999, *424*, 83-95.

Marnett, L. J., *Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage*, Toxicology 2002, *181-182*, 219-222.

Marquardt, H., Schäfer, S., *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgeselschaft mbH, Stuttgart, 2004.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*, J Nutr Biochem 2005, *16*, 577-586.

Matissek, R., Steiner, G., *Lebensmittelanalytik*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2006.

Maurya, D. K., Balakrishnan, S., Salvi, V. P., Nair, C. K., *Protection of cellular DNA from gamma-radiation-induced damages and enhancement in DNA repair by troxerutin*, Mol Cell Biochem 2005, *280*, 57-68.

Mehrländer, K., Dietrich, H., Sembries, S., Dongowski, G., Will, F., *Structural characterization of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction*, J Agric Food Chem 2002, *50*, 1230-1236.

Meister, A., Anderson, M. E., *Glutathione*, Annu Rev Biochem 1983, *52*, 711-760.

Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickancaite, E., Segura-Aguilar, J., *Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product*, Free Radic Biol Med 1999, *26*, 107-116.

Michels, K. B., Giovannucci, E., Chan, A. T., Singhania, R., Fuchs, C. S., Willett, W. C., *Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study*, Cancer Res 2006, *66*, 3942-3953.

Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*, Pharmacol Rev 2000, *52*, 673-751.

Miene, C., Glei, M., persönliche Mitteilung, 2009, pers. Mitteilung

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., *A new method for measuring antioxidant activity*, Biochem Soc Trans 1993, *21*, 95S.

Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., *Spectrophotometric determination of antioxidant activity*, Redox Report 1996, *2*, 161-171.

Millis, K. K., Weaver, K. H., Rabenstein, D. L., *Oxidation-Reduction Potential of Glutathione*, J Org Chem 1993, *58*, 4144-4146.

Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G., Huis in't Veld, J. H., *A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products*, Appl Microbiol Biotechnol 1999, *53*, 108-114.

Miura, Y. H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T., Fukui, S., *Active oxygens generation by flavonoids*, Biol Pharm Bull 1998, *21*, 93-96.

Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E., *Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism*, Toxicol In Vitro 2006, *20*, 187-210.

Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Hara, A., Tanaka, T., *Control of cell proliferation in cancer prevention*, Mutat Res 1999, *428*, 291-298.

Moridani, M. Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., O'Brien, P. J., *Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation*, Drug Metab Dispos 2001a, *29*, 1432-1439.

Moridani, M. Y., Scobie, H., Salehi, P., O'Brien, P. J., *Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450*, Chem Res Toxicol 2001b, *14*, 841-848.

Morita, K., Arimochi, H., Ohnishi, Y., *In vitro cytotoxicity of 4-methylcatechol in murine tumor cells: induction of apoptotic cell death by extracellular pro-oxidant action*, J Pharmacol Exp Ther 2003, *306*, 317-323.

Möslein, G., *Hereditäres kolorektales Karzinom*, Chirurg 2008, *79*, 1038-1046.

Mukai, K., Mitani, S., Ohara, K., Nagaoka, S., *Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins*, Free Radic Biol Med 2005, *38*, 1243-1256.

Mulder, T. P., Rietveld, A. G., van Amelsvoort, J. M., *Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine*, Am J Clin Nutr 2005, *81*, 256S-260S.

Müller, C., Eisenbrand, G., Gradinger, M., Rath, T., Albert, F. W., Vienken, J., Singh, R., Farmer, P. B., Stockis, J. P., Janzowski, C., *Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients*, Free Radic Res 2004, *38*, 1093-1100.

Murakami, K., Haneda, M., Qiao, S., Naruse, M., Yoshino, M., *Prooxidant action of rosmarinic acid: transition metal-dependent generation of reactive oxygen species*, Toxicol In Vitro 2007, *21*, 613-617.

Murray, T. J., Yang, X., Sherr, D. H., *Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A*, Breast Cancer Res 2006, *8*, R17.

Nagata, H., Takekoshi, S., Takagi, T., Honma, T., Watanabe, K., *Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase*, Tokai J Exp Clin Med 1999, *24*, 1-11.

Nemeth, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., Williamson, G., Swallow, D. M., Kroon, P. A., *Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans*, Eur J Nutr 2003, *42*, 29-42.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., Zhang, H. Y., *Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(*+) assay*, J Agric Food Chem 2004, *52*, 4669-4674.

Nguyen, T., Sherratt, P. J., Pickett, C. B., *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element*, Annu Rev Pharmacol 2003, *43*, 233-260.

Nielsen, S. E., Breinholt, V., Justesen, U., Cornett, C., Dragsted, L. O., *In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes*, Xenobiotica 1998, *28*, 389-401.

Nouspikel, T., *DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility*, Cell Mol Life Sci 2009, *66*, 994-1009.

Olk, M., Will, F., Dietrich, H., persönliche Mitteilung, 2006-2009, pers. Mitteilung

Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., Katan, M. B., *Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans*, J Nutr 2003, *133*, 1806-1814.

Olthof, M. R., Hollman, P. C., Katan, M. B., *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*, J Nutr 2001, *131*, 66-71.

Ostling, O., Johanson, K. J., *Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian-Cells*, Biochem Bioph Res Co 1984, *123*, 291-298.

Oszmianski, J., Wolniak, M., Wojdylo, A., Wawer, I., *Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices*, J Sci Food Agr 2007, *87*, 573-579.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L., *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*, J Agric Food Chem 2001, *49*, 4619-4626.

Ovaskainen, M. L., Torronen, R., Koponen, J. M., Sinkko, H., Hellstrom, J., Reinivuo, H., Mattila, P., *Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults*, J Nutr 2008, *138*, 562-566.

Pan, M. H., Ho, C. T., *Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development*, Chem Soc Rev 2008, *37*, 2558-2574.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., *Global Cancer Statistics, 2002*, CA Cancer J Clin 2005, *55*, 74-108.

Pierini, R., Kroon, P. A., Guyot, S., Ivory, K., Johnson, I. T., Belshaw, N. J., *Procyanidin effects on oesophageal adenocarcinoma cells strongly depend on flavan-3-ol degree of polymerization*, Molecular Nutrition & Food Research 2008, *52*, 1399-1407.

Pietta, P., Simonetti, P., Gardana, C., Mauri, P., *Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites*, J Pharm Biomed Anal 2000, *23*, 223-226.

Pietta, P. G., *Flavonoids as antioxidants*, J Nat Prod 2000, *63*, 1035-1042.

Pohl, C., Will, F., Dietrich, H., Schrenk, D., *Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols*, J Agric Food Chem 2006, *54*, 10262-10268.

Pool-Zobel, B., Veeriah, S., Bohmer, F. D., *Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis*, Mutat Res-Fund Mol M 2005, *591*, 74-92.

Pool-Zobel, B. L., *Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data*, Br J Nutr 2005, *93 Suppl 1*, S73-90.

Potter, J. D., *Colorectal cancer: Molecules and populations*, J Natl Cancer I 1999, *91*, 916-932.

Preston, S. L., Wong, W. M., Chan, A. O., Poulsom, R., Jeffery, R., Goodlad, R. A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W. F., Tomlinson, I. P., Wright, N. A., *Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission*, Cancer Res 2003, *63*, 3819-3825.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*, J Agric Food Chem 2005, *53*, 4290-4302.

Prohaska, J. R., *The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases*, Biochim Biophys Acta 1980, *611*, 87-98.

Ramos, S., *Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways*, Mol Nutr Food Res 2008, *52*, 507-526.

Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K., Poulsen, L., *Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease*, Mol Nutr Food Res 2005, *49*, 159-174.

Rawel, H. A., Meidtner, K., Kroll, J., *Binding of selected phenolic compounds to proteins*, J Agr Food Chem 2005, *53*, 4228-4235.

Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidtner, K., Kroll, J., Schweigert, F. J., *Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence*, Mol Nutr Food Res 2006, *50*, 705-713.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Radic Biol Med 1999, *26*, 1231-1237.

Rechner, A. R., *Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfelsaft und Beerenobstsäften*, Dissertation, Forschungsanstalt Geisenheim, 2002.

Rechner, A. R., Dietrich, H., Patz, C.-D., *Antioxidative Wirkung von naturtrüben Apfelsäften: Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes*, Flüssiges Obst 1999, *5/99*, 227-230.

Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A., *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*, Free Radic Biol Med 2002, *33*, 220-235.

Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A., *Colonic metabolism of dietary polyphenols:*

influence of structure on microbial fermentation products, Free Radic Biol Med 2004, *36*, 212-225.

Rehm, H., *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006.

Rice-Evans, C., Pecker, L., *Flavonoids in Health and Disease*, 2. Auflage, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2003.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, Free Radic Biol Med 1996, *20*, 933-956.

Rietjens, I. M., Boersma, M. G., van der Woude, H., Jeurissen, S. M., Schutte, M. E., Alink, G. M., *Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk*, Mutat Res 2005, *574*, 124-138.

Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*, Cell Mol Life Sci 2009, *66*, 981-993.

Römpp, *Römpp Lexikon Online; http://www.roempp.com/prod/index1.html*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009.

Roques, S. C., Landrault, N., Teissedre, P. L., Laurent, C., Besancon, P., Rouane, J. M., Caporiccio, B., *Hydrogen peroxide generation in caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: effect of ascorbic acid*, Free Radic Res 2002, *36*, 593-599.

Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Spinozzi, F., Agea, E., Pelli, M. A., Morozzi, G., *Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells*, Carcinogenesis 2001, *22*, 1675-1680.

Rousset, M., *The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation*, Biochimie 1986, *68*, 1035-1040.

Russell, R. K., Wilson, D. C., Satsangi, J., *Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease*, Arch Dis Child 2004, *89*, 598-603.

Saeman, J. F., Bubl, J. L., Harris, E. E., *Quantitative Saccharification of Wood and Cellulose*, Ind Eng Chem 1945, *17*, 35-37.

Sambruy, Y., Ferruzza, S., Ranaldi, G., De Angelis, I., *Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology*, Cell Biol Toxicol 2001, *17*, 301-317.

Scalbert, A., Williamson, G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*, J Nutr 2000, *130*, 2073S-2085S.

Schäfer, S., *Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen*, Dissertation, Universität Kaiserslautern, 2006.

Schäfer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Janzowski, C., *Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines*, Mol Nutr Food Res 2006a, *50*, 24-33.

Schäfer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Janzowski, C., *Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines*, Mol Nutr Food Res 2006b, *50*, 413-417.

Scharf, G., Prustomersky, S., Knasmuller, S., Schulte-Hermann, R., Huber, W. W., *Enhancement of glutathione and g-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 2003, *45*, 74-83.

Schieber, A., Keller, P., Carle, R., *Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography*, J Chromatogr A 2001, *910*, 265-273.

Schmidt, R. F., Thews, G., *Physiologie des Menschen*, 26. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995.

Schneider, H., Simmering, R., Hartmann, L., Pforte, H., Blaut, M., *Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria*, Journal of Applied Microbiology 2000, *89*, 1027-1037.

Schoefer, L., Mohan, R., Schwiertz, A., Braune, A., Blaut, M., *Anaerobic degradation of flavonoids by Clostridium orbiscindens*, Appl Environ Microbiol 2003, *69*, 5849-5854.

Schoel, B., Welzel, M., Kaufmann, S. H., *Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay*, J Biochem Biophys Methods 1995, *30*, 199-206.

Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D., *Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States*, J Agric Food Chem 2008, *56*, 1415-1422.

Segain, J. P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H. M., Galmiche, J. P., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*, Gut 2000, *47*, 397-403.

Sembries, S., Dongowski, G., Jacobasch, G., Mehrländer, K., Will, F., Dietrich, H., *Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats*, Br J Nutr 2003, *90*, 607-615.

Shapiro, H., Singer, P., Halpern, Z., Bruck, R., *Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis*, Gut 2007, *56*, 426-435.

Shih, I. M., Wang, T. L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S. R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., *Top-down morphogenesis of colorectal tumors*, Proc Natl Acad Sci U S A 2001, *98*, 2640-2645.

Siegenthaler, W., Blum, H. E., *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006.

Siegers, C. P., Klaassen, C. D., *The Significance of Biliary-Excretion of Drugs in Man*, Deut Med Wochenschr 1983, *108*, 1564-1570.

Sies, H., *Oxidative stress: from basic research to clinical application*, Am J Med 1991, *91*, 31S-38S.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*, Exp Cell Res 1988, *175*, 184-191.

Singh, R., Czaja, M. J., *Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress*, J Gastroen Hepatol 2007, *22*, S45-S48.

Singh, R., Teichert, F., Verschoyle, R. D., Kaur, B., Vives, M., Sharma, R. A., Steward, W. P., Gescher, A. J., Farmer, P. B., *Simultaneous determination of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun Mass Spectrom 2009, *23*, 151-160.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*, Anal Biochem 1985, *150*, 76-85.

Soares, S., Mateus, N., De Freitas, V., *Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching*, J Agr Food Chem 2007, *55*, 6726-6735.

Soobrattee, M. A., Bahorun, T., Neergheen, V. S., Googoolye, K., Aruoma, O. I., *Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants*, Toxicol In Vitro 2008, *22*, 45-56.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T., *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions*, Mutat Res 2005, *579*, 200-213.

Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B., Basit, A. W., *The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs*, Int J Pharm 2008, *363*, 1-25.

Spencer, J. P., *Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract*, J Nutr 2003, *133*, 3255S-3261S.

Spormann, T., *Modulation oxidativer Zellschäden bei Hämodialysepatienten*, Dissertation, Universität Kaiserslautern, 2008.
Stadtman, E. R., *Protein oxidation in aging and age-related diseases*, Ann N Y Acad Sci 2001, *928*, 22-38.
Steinmetz, K. A., Potter, J. D., *Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review*, J Am Diet Assoc 1996, *96*, 1027-1039.
Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., *Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals*, Talanta 2007, *71*, 1741-1751.
Sun-Waterhouse, D., Melton, L. D., O'Connor, C. J., Kilmartin, P. A., Smith, B. G., *Effect of apple cell walls and their extracts on the activity of dietary antioxidants*, J Agr Food Chem 2008, *56*, 289-295.
Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., Niitsu, Y., *Colorectal cancer: genetics of development and metastasis*, J Gastroenterol 2006, *41*, 185-192.
Termini, J., *Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations*, Mutat Res 2000, *450*, 107-124.
Thews, G., *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999.
Thielen, C., *Auswahl und Verarbeitung von Früchten zur Steigerung der Gehalte an phenolischen Antioxidantien in Fruchtsäften*, Dissertation, Universität Kaiserslautern, 2006.
Thijssen, H. H. W., Vervoort, L. M. T., Schurgers, L. J., Shearer, M. J., *Menadione is a metabolite of oral vitamin K*, Brit J Nutr 2006, *95*, 260-266.
Thor, H., Smith, M. T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S. A., Orrenius, S., *The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells*, J Biol Chem 1982, *257*, 12419-12425.
Tseng, T. H., Wang, C. J., Kao, E. S., Chu, H. Y., *Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes*, Chem Biol Interact 1996, *101*, 137-148.
Valgimigli, L., Iori, R., *Antioxidant and Pro-Oxidant Capacities of ITCs*, Environ Mol Mutagen 2009, *50*, 222-237.
Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., Telser, J., *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*, Mol Cell Biochem 2004, *266*, 37-56.
Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P., Bilton, R. F., *Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?*, Bba-Gen Subjects 2001, *1527*, 161-166.
Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, Chem Biol Interact 2006.
van Acker, S. A. B. E., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., van der Vijgh, W. J. F., *Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids*, Biochemical Pharmacology 1998, *56*, 935-943.
van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W. M., *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions*, J Agric Food Chem 2001, *49*, 3606-3613.
Van Der Sluis, A. A., Dekker, M., Skrede, G., Jongen, W. M., *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods*, J Agric Food Chem 2002, *50*, 7211-7219.
VanderVeen, L. A., Hashim, M. F., Shyr, Y., Marnett, L. J., *Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde*, Proc Natl Acad Sci U S A 2003, *100*, 14247-14252.
VdF, *Die beliebtesten Fruchtsäfte*, Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie 2009.
Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., Pool-Zobel, B. L., *Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics*, Mol Carcinog 2006, *45*, 164-174.

Veeriah, S., Miene, C., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Sauer, J., Bohmer, F., Wolfl, S., Pool-Zobel, B. L., *Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells*, International Journal of Cancer 2008, *122*, 2647-2655.

Walle, T., Walle, U. K., Halushka, P. V., *Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans*, J Nutr 2001, *131*, 2648-2652.

Wang, H., Joseph, J. A., *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*, Free Radic Biol Med 1999, *27*, 612-616.

Wang, Y. S., *Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species*, Chemical Research in Toxicology 2008, *21*, 276-281.

Watzl, B., Rechkemmer, G., *Flavonoide*, Ernährungs-Umschau 2001a, *48*, 498-502.

Watzl, B., Rechkemmer, G., *Phenolsäuren*, Ernährungs-Umschau 2001b, *48*, 413-416.

WCRF, AICR, *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective*, American Institute for Cancer Research, Washington DC, 2007.

Wee, L. M., Long, L. H., Whiteman, M., Halliwell, B., *Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium*, Free Radic Res 2003, *37*, 1123-1130.

Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D., *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*, Anal Biochem 1988, *175*, 231-237.

Wijeratne, S. S., Cuppett, S. L., Schlegel, V., *Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells*, J Agric Food Chem 2005, *53*, 8768-8774.

Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H., *Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices*, Eur Food Res Technol 2000, *211*, 291-297.

Williamson, G., Day, A. J., Plumb, G. W., Couteau, D., *Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates*, Biochem Soc Trans 2000, *28*, 16-22.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Laskowski, P., *Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties*, J Agric Food Chem 2008, *56*, 6520-6530.

Wolff, S. P., *Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides*, Meth. Enzymol. 1994, *233*, 182-189.

Wong, N. A., Harrison, D. J., *Colorectal neoplasia in ulcerative colitis-recent advances*, Histopathology 2001, *39*, 221-234.

Wong, N. A., Pignatelli, M., *Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis?*, Am J Pathol 2002, *160*, 389-401.

Wright, N. A., Poulsom, R., *Top down or bottom up? Competing management structures in the morphogenesis of colorectal neoplasms*, Gut 2002, *51*, 306-308.

Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D., *Glutathione metabolism and its implications for health*, J Nutr 2004, *134*, 489-492.

Wyman, C., Kanaar, R., *DNA double-strand break repair: all's well that ends well*, Annu Rev Genet 2006, *40*, 363-383.

Ying, C. J., Sun, X. F., Zhang, S. L., Zhang, X. P., Mao, L. M., Zuo, X. Z., Yao, P., *ROS-related enzyme expressions in endothelial cells regulated by tea polyphenols*, Biomed Environ Sci 2004, *17*, 33-39.

Zessner, H., Pan, L., Will, F., Klimo, K., Knauft, J., Niewohner, R., Hummer, W., Owen, R., Richling, E., Frank, N., Schreier, P., Becker, H., Gerhauser, C., *Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential*, Mol Nutr Food Res 2008, *52 Suppl 1*, S28-44.

Zweibaum, A., *Differentiation of Human Colon-Cancer Cells - a New Approach of Colon-Cancer*, Ann Gastroent Hepato 1993, *29*, 257-262.

9. Anhang

9.1. Nicht dargestellte Abbildungen und Tabellen

Abschnitt 4.1.1: Ergebnisse der linearen Regression (y = m*x + n) zwischen AE-Inhaltsstoffen (x) und ORAC-Werten (y). Angegeben ist der Korrelationskoeffizient R.

Substanz	R	Substanz	R
Phloretin-2-xyloglucosid	0,857	Procyanidin B_1	0,112
Phloridzin	0,183	(+)-Catechin	-0,512
∑ Dihydrochalcone	0,680	Procyanidin B_2	-0,149
Quercetin-3-rutinosid	0,007	(-)-Epicatechin	0,047
Quercetin-3-galactosid	-0,274	Procyanidin C_1	-0,598
Quercetin-3-glucosid	-0,187	∑ Flavan-3-ole	-0,303
Quercetin-3-xylosid	-0,270	Chlorogensäure	0,638
Quercetin-3-arabinosid	-0,245	4-Caffeoylchinasäure	0,247
Quercetin-3-rhamnosid	-0,240	Coumaroylglucose	0,462
∑ Flavonole	-0,253	Kaffeesäure	0,652
∑ Polyphenole	0,886	3-Coumaroylchinasäure	0,747
∑ Procyanidine	0,074	4-Coumaroylchinasäure	0,441
∑ Polyphenole + Procyanidine	0,647	5-Coumaroylchinasäure	0,572
		p-Cumarsäure	0,247
∑ Oligosaccharide	-0,846	∑ Hydroxyzimtsäuren	0,645

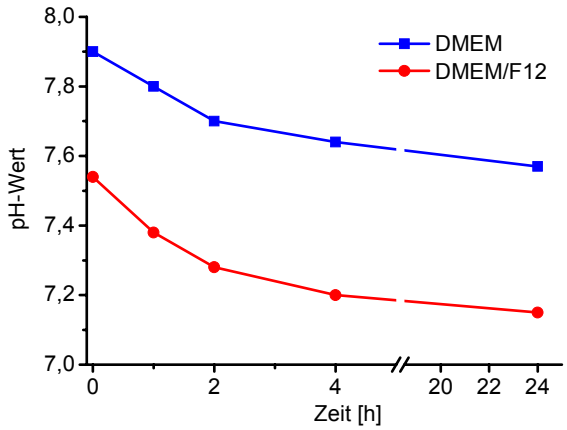
Abschnitt 4.1.1: Ergebnisse der linearen Regression (y = m*x + n) zwischen AE-Inhaltsstoffen (x) und TEAC-Werten (y). Angegeben ist der Korrelationskoeffizient R.

Substanz	R	Substanz	R
Phloretin-2-xyloglucosid	-0,062	Procyanidin B_1	-0,189
Phloridzin	-0,390	(+)-Catechin	0,447
∑ Dihydrochalcone	-0,280	Procyanidin B_2	0,590
Quercetin-3-rutinosid	-0,091	(-)-Epicatechin	0,600
Quercetin-3-galactosid	0,060	Procyanidin C_1	0,465
Quercetin-3-glucosid	0,029	∑ Flavan-3-ole	0,680
Quercetin-3-xylosid	0,000	Chlorogensäure	-0,061
Quercetin-3-arabinosid	0,004	4-Caffeoylchinasäure	0,022
Quercetin-3-rhamnosid	-0,042	Coumaroylglucose	-0,138
∑ Flavonole	0,006	Kaffeesäure	-0,543
∑ Polyphenole	-0,134	3-Coumaroylchinasäure	-0,325
∑ Procyanidine	0,707	4-Coumaroylchinasäure	-0,120
∑ Polyphenole + Procyanidine	0,479	5-Coumaroylchinasäure	-0,221
		p-Cumarsäure	-0,233
∑ Oligosaccharide	-0,495	∑ Hydroxyzimtsäuren	-0,125

Abschnitt 4.1.2: Ergebnisse der linearen Regression (y = m*x + n) der AE-Inhaltsstoffe (x) und der mittleren rel. FI-Werte (y). Angegeben ist der Korrelationskoeffizient R.

Substanz	R	Substanz	R
Phloretin-2-xyloglucosid	-0,459	Procyanidin B_1	-0,488
Phloridzin	-0,037	(+)-Catechin	0,083
∑ Dihydrochalcone	-0,442	Procyanidin B_2	-0,298
Quercetin-3-rutinosid	0,000	(-)-Epicatechin	0,166
Quercetin-3-galactosid	-0,184	Procyanidin C_1	-0,002
Quercetin-3-glucosid	-0,250	∑ Flavan-3-ole	-0,074
Quercetin-3-xylosid	-0,219	Chlorogensäure	0,264
Quercetin-3-arabinosid	-0,144	4-Caffeoylchinasäure	-0,033
Quercetin-3-rhamnosid	-0,039	Coumaroylglucose	0,223
∑ Flavonole	-0,163	Kaffeesäure	0,545
∑ Polyphenole	-0,149	3-Coumaroylchinasäure	-0,584
∑ Procyanidine	-0,321	4-Coumaroylchinasäure	-0,225
∑ Polyphenole + Procyanidine	-0,369	5-Coumaroylchinasäure	0,346
		p-Cumarsäure	-0,160
∑ Oligosaccharide	-0,031	∑ Hydroxyzimtsäuren	0,081

Abschnitt 4.4.1: Zeitabhängige Einstellung des pH-Wertes in DMEM- und DMEM/F12-Zellkulturmedium bei Inkubation im Brutschrank über 24h.



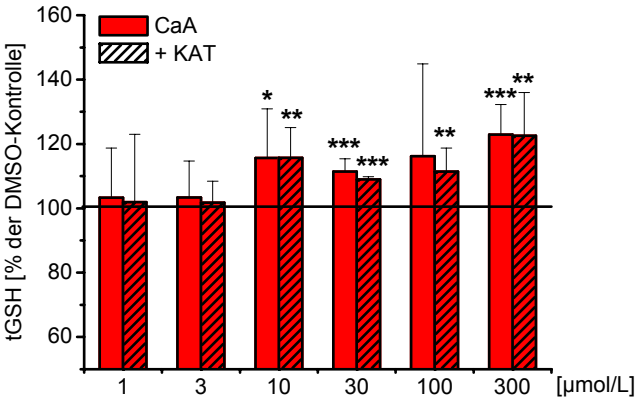
Abschnitt 4.4.2: Ergebnisse der linearen Regression (y = m*x + n) zwischen AE-Konzentration (x) und H_2O_2-Menge (y) nach 24h-Inkubation.

Extrakt	Steigung (m)	Achsenabschnitt (n)	Bestimmtheitsmaß (R^2)
AE01	0,415	-2,89	0,998
AE02	0,454	-4,36	0,997
AE03B	0,238	-2,29	0,983
AE04	0,467	-4,06	0,997
AE05	0,316	-1,14	0,999
AE06	0,466	-4,84	0,994
AE06B	0,187	-1,81	0,992
AE07	0,527	-4,21	0,996

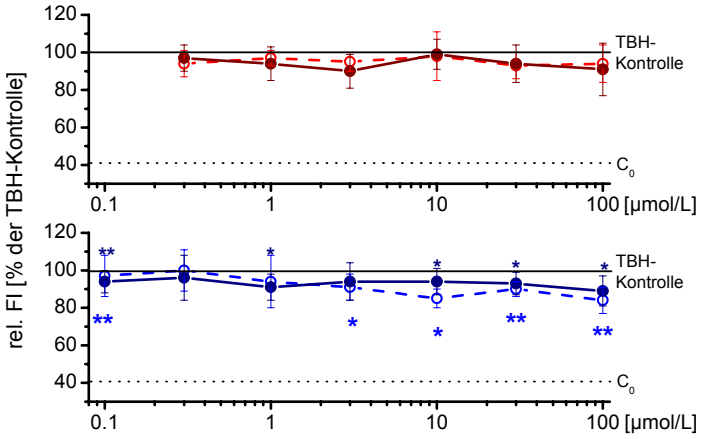
Abschnitt 4.4.2: Ergebnisse der linearen Regression (y = m*x + n) zwischen AE-Inhaltsstoffen (x) und gebildeter H_2O_2-Menge (y) nach 24h-Inkubation von 100 µg/mL AE. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient R.

Substanz	R	Substanz	R
Phloretin-2-xyloglucosid	0,725	Procyanidin B_1	-0,299
Phloridzin	-0,468	(+)-Catechin	-0,214
∑ Dihydrochalcone	0,163	Procyanidin B_2	0,080
Quercetin-3-rutinosid	-0,574	(-)-Epicatechin	0,039
Quercetin-3-galactosid	-0,754	Procyanidin C_1	-0,276
Quercetin-3-glucosid	-0,581	∑ Flavan-3-ole	-0,098
Quercetin-3-xylosid	-0,641	Chlorogensäure	0,758
Quercetin-3-arabinosid	-0,478	4-Caffeoylchinasäure	0,369
Quercetin-3-rhamnosid	-0,536	Coumaroylglucose	0,310
∑ Flavonole	-0,590	Kaffeesäure	0,101
∑ Polyphenole	0,707	3-Coumaroylchinasäure	0,525
∑ Procyanidine	0,044	4-Coumaroylchinasäure	0,684
∑ Polyphenole + Procyanidine	0,563	5-Coumaroylchinasäure	0,303
		p-Cumarsäure	-0,380
∑ Oligosaccharide	-0,842	∑ Hydroxyzimtsäuren	0,776

Abschnitt 4.4.5: Modulation des tGSH-Spiegels in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit CaA. MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur Lösemittel-Kontrolle (0,1 % DMSO): *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.



Abschnitt 4.4.5: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit CaA (rot) bzw. ChA (blau). MW ± SD aus n=3-5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderung zur TBH-Kontrolle *p<0,05 **p<0,01.



9.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Dipl.-Chem. Phillip Bellion
Adresse:	Brentanostr. 36 D-69434 Hirschhorn (Neckar) Deutschland
Geburtstag und -ort:	02.06.1980 in Merzig/Saar

Studium

Sep. 2006 – Jun 2009	Promotion an der TU Kaiserslautern, Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. G. Eisenbrand
Okt. 2000 - Aug. 2006	Studium der Chemie (Diplom) an der TU Kaiserslautern
17. Aug 2006	Abschluss des Studienganges Chemie (Diplom) mit Bestehen der Diplomprüfungen, Gesamtnote: 1,2
Dez. 2005 - Aug. 2006	Diplomarbeit in der Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. G. Eisenbrand; Thema: „Untersuchungen zur Modulation oxidativer Zellschäden durch fermentierte phenolische Extrakte aus Apfelsaft“, Note: 1,1
10. Apr. 2004	Diplomvorprüfung

Schulausbildung

Juni 1999	Abitur am Gymnasium am Stefansberg, Merzig/Saar; Note 2,3
1990 – 1999	Gymnasium am Stefansberg, Merzig/Saar
1986 – 1990	Grundschule Orscholz

Zusatzqualifikationen

Seit 2007 Weiterbildung zum Fachtoxikologen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT):

- Molekulare Zelltoxikologie
- Tierversuchskunde I (theoretischer Teil) und Biostatistik
- Tierversuchskunde II (praktischer Teil)
- Lebensmitteltoxikologie
- Grundlagen der Epidemiologie
- Molekulare Zelltoxikologie
- Fremdstoffmetabolismus / Toxikokinetik

- Grundlagen der Organtoxikologie und –pathologie I

Eingeschränkte Sachkunde nach §5 ChemVerbotsV

Ausbildung zum Ersthelfer

Administrative Aufgaben

Betreuung von Seminararbeiten mit Themen der Lebensmittelchemie und -toxikologie:

- Helena Ufelmann: Phytinsäure - Anti-Nutrient oder gesundheitsfördernder Lebensmittelinhaltsstoff?
- Sarah Pfleger: Die Rolle der DNA-Methylierung in der Kanzerogenese

Betreuung und Koordination der Arbeit von Forschungspraktikanten, Diplomanden und Laboranten; Beurteilung der Arbeiten:

Forschungspraktika:

- Alexander Täubert: Einfluss der Fermentation auf die antioxidative Wirkung von Apfelsaftextrakten an Kolonzellen
- Anne Rosch: Untersuchungen zur Auswirkung pro-oxidativer Effekte von Flavonoiden auf den Glutathionspiegel humaner Kolonkarzinomzellen
- Kristine Spitz: Extrazelluläre Generierung reaktiver Spezies durch phenolische Apfelinhaltsstoffe in der Zellkultur
- Sarah Pfleger: Einfluss von Apfelsaft-Polyphenolen auf die Expression antioxidativer Enzyme in Darmzellen mittels Western-Blot

Diplomanden

- Claudia Schmitz: Modulation des zellulären Redoxstatus und der Cyclooxygenase-2-Transkription durch Apfelsaftinhaltsstoffe in humanen Kolonzellen
- Jasmin Digles: Einfluss von Apfel-Inhaltsstoffen auf die Glutathion-Peroxidase-Aktivität in humanen Darmkrebszellen
- Maria Cullmann: Einfluss von Apfelsaft-Inhaltsstoffen auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase in Darmzellen

Berichterstattung zu laufenden Projekten

Gremientätigkeiten

2000 – 2005	Studentisches Mitglied des Fachbereichsrates Chemie
2001 – 2005	Mitglied des Fachschaftsrates Chemie
2002 – 2005	Studentisches Mitglied des Prüfungsausschusses Chemie (Diplom)

9.3. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

P. Bellion, T. Hofmann, B.L. Pool-Zobel, F. Will, H. Dietrich, B. Knaup, E. Richling, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski: 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. 2008, 56, 6310-6317

P. Bellion, M. Olk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29; Mol. Nutr. Food Res., 2009, 53, 1226-1236

P. Bellion, M. Olk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Polyphenolic apple extracts and their constituents modulate DNA strand breaks and oxidation damage in human colon carcinoma cells; in: Symposiumsband: „Risk assessment of phytochemicals in food – novel approaches" DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM); Wiley-VCH; *im Druck*

P. Bellion, J. Digles, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Polyphenolic apple extracts: effects of raw material and production method on antioxidant effectiveness and reduction of DNA damage in Caco-2 cells; *in Vorbereitung*

Abstraktpublikationen

Bellion P., Hofmann T., Veeriah S., Dietrich H., Will F., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C.: Antioxidative Wirksamkeit von fermentierten phenolischen Apfelsaftextrakten in der humanen Koloncarcinomzelllinie Caco-2; Lebensmittelchemie, 2007, 61, 43

Janzowski C., **Bellion P.**, Soyalan B., Baum M., Will F., Dietrich H., Veeriah S., Glei M., Pool-Zobel B.L., Eisenbrand G.: Phenolic apple juice extracts and its fermentation

products reduce oxidative stress and induce antioxidative cell response in human colon carcinoma cell lines; Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res., 2007, 48, no. 2580

P. Bellion, C. Schmitz, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski: Antioxidative Wirksamkeit von Polyphenolen des Apfels und ihrer intestinalen Abbauprodukte in humanen Kolonzellen; Lebensmittelchemie, 2008, 62, 13-14

Bellion P., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C.: Generierung von Wasserstoffperoxid durch Polyphenole in vitro und dessen Einfluss auf das zelluläre Redox-System: Lebensmittelchemie, 2008, 62, 109-110

C. Janzowski, **P. Bellion**, M. Baum, G. Eisenbrand: Influence of polyphenol-mediated peroxide generation on redox-markers in the colon cell line HT-29; Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2008, 49, no. 5461

P. Bellion, B. Knaup, E. Richling, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Abbau von Apfel-Polyphenolen im Darm: Bildung und antioxidative Wirksamkeit phenolischer Metabolite; Lebensmittelchemie, 2009, 63, 4

P. Bellion, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski: Einfluss des intestinalen Abbaus auf die antioxidative Wirksamkeit von Apfel-Polyphenolen in vitro; Lebensmittelchemie, 2009, 63, 43

weitere Tagungsbeiträge:

10th Karlsruhe Nutrition Congress, Karlsruhe, 15. – 17.10.2006:
P. Bellion, M. Glei, S. Veeriah, B.L. Pool-Zobel, H. Dietrich, F. Will, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Fermented apple juice extracts reduce oxidative stress in human colon carcinoma cell line Caco-2

1st International Symposium on Nutrition and Intestinal Health, Kaiserslautern, 28.02. – 01.03.2007:
P. Bellion, M. Glei, S. Veeriah, B.L. Pool-Zobel, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Modulation of cellular ROS-level in human colocarcinoma cells by fermented and unfermented polyphenolic apple juice extracts

1. Symposium Graduiertenkolleg GRK 1427: “Food, gut and the immune system: a challenge in environmental medicine”, Düsseldorf, 04. – 05.10.2007
Bellion P; Glei M; Pool-Zobel BL; Will F; Dietrich H; Baum M; Eisenbrand G; Janzowski C: Fermented apple juice extracts exhibit a lower antioxidative potential in human colon cells compared to the original polyphenolic extracts

25 Jahre Lebensmittelchemie & Toxikologie an der TU Kaiserslautern: Symposium "Cornerstones of Life Sciences in Chemistry", Kaiserslautern, 28.10.2007
P. Bellion, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Polyphenol-mediated generation of peroxides in vitro and their influence on cellular redox-markers

AACR Meeting Frontiers in Cancer Prevention Research, Philadelphia (USA), 05. – 08.12.2007
Janzowski C., **Bellion P.**, Soyalan B., Baum M., Eisenbrand G.: Influence of polyphenol-mediated peroxide generation on cellular redox markers

2nd Copenhagen Workshop on DNA Oxidation, Kopenhagen, Dänemark, 29. – 30.01.2009
P. Bellion, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Polyphenolic apple extracts and their constituents modulate DNA damage in Caco-2 cells

Diese Seiten sind für alle, die mich unterstützt haben, sei es bei der Erstellung dieser Arbeit, während des Studiums oder „im richtigen Leben“. Daher (ohne Reihung nach Wertigkeit)

Vielen Dank…

… an Frau Janzowski für die Freiheit, die Sie mir bei der Durchführung meiner Ideen gelassen hat, für ihre Anregungen und die schönen Tage in Meckesheim (die entspannte Alternative zu den ungezählten Nachmittagen an der Uni).

… an Herrn Eisenbrand für die (stets konstruktive) Kritik und die neuen Blickwinkel auf meine Arbeit die er mir durch sein umfassendes Wissen eröffnet hat.

… dem BMBF für die finanzielle Unterstützung sowie allen Netzwerkpartnern für die distanzierte Sicht auf meine Arbeiten. Besonderer Dank geht an die Herren Dietrich und Will sowie an Melanie Olk für die Bereitstellung der Apfelsaftextrakte und den guten Kontakt bei allen Fragen.

… meiner Lieblings-TA Sylvia, für die unschätzbare Unterstützung bei der Arbeit, die gute Stimmung im Labor, unseren guten(!) Musikgeschmack und Schoggi.

… an Ingrid, Heike und Frau Bressem für ihre Hilfe bei kleinen und großen Problemen.

… meinen Diplomanden Claudia, Jasmin und Maria sowie den Forschungspraktikanten Alex, Anne, Kristine und Sarah für ihre Unterstützung. Ich hoffe, ihr wart mit mir genauso zufrieden, wie ich es mit euch war.

… an Veronika, für die große Unterstützung bei der Polyphenol-Analytik.

… den „Jenaern“ Thomas, Claudi, Michael und Daniel für die Fermentation von Extrakten und Trub und die Gastfreundschaft während unseres Besuches im November 2007. Frau Pool-Zobel wird mir mit ihrer offenen und fröhlichen Art immer im Gedächtnis bleiben.

… an Tamara für die nette Gesellschaft im Labor und das stoische Ertragen von Sylvias und meinem Musikgeschmack.

… an Rainer für Hilfe bei allem, sein Gästebett und seinen Humor.

… an Eva für ihre Unterstützung und die nette Gesellschaft in Kaffeezimmer und Labor.

… an Ari für die Hilfe beim Flottmachen der HPLC und bei allen Computerproblemen.

…allen, die die schönen Grillabende bei Rainer am Weiher zum Erlebnis gemacht haben.

… Hannah, Thomas und Frau Richling für die Hilfe bei analytischen Fragestellungen.

… Lars & Jessi, Jochen & Verena, Stefan & Isa und Andi für die gemeinsame Studienzeit.

… noch mal Jasmin fürs Korrekturlesen und die vielen Kommas.

… meinem Vater für die finanzielle Förderung, ohne die ich mein Studium so nicht hätte absolvieren können.

… Birgit & Clemens für ihr ehrliches Interesse an meiner Arbeit und ihre Unterstützung.

… allen Maders und Remmels für seelischen Beistand und die Hilfe in allen Lebenslagen.

„Echte Freundschaft ist eine Tür die manchmal klemmt, aber nie zufällt.“

„Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken…“

(Goethe JW, 1797)

Daher:

vielen Dank Simone

DANKE LUKAS (Grossbuchstaben sind leichter zu lesen)

Und falls sich jemand auf den Schlips getreten fühlt, weil sein/ihr Name noch nicht genannt wurde:

Vielen Dank an _____ (bitte Name einfügen)

für _____ (bitte Grund angeben)