

Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Apfelsäften und polyphenolischen Inhaltsstoffen *in-vitro* und an Ratten

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

D 386

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemiker
Bülent Soyalan

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 31.03.2010

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2010

The Times They Are A-Changin`

(Bob Dylan, 1964)

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum Mai 2006 bis Juli 2009 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 31.03.2010

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas, sowie für hilfreiche Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk für die Bereitschaft zur zweiten Berichterstattung, sowie Herrn Prof. Dr.-Ing. S. Ernst für die Leitung der Prüfungskommission.

*Ich widme diese Arbeit
meiner Frau Sabine
und unserer Tochter Anne Safinas*

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	5
1. EINLEITUNG	8
2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
3. THEORETISCHER HINTERGRUND	14
3.1 DER MENSCHLICHE DARM.....	14
3.2. CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN.....	16
3.2.1 <i>Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa</i>	16
3.2.1.1 <i>Ätiologie und Pathogenese</i>	17
3.2.1.2 <i>Genetische Ursachen</i>	18
3.2.1.3.....	19
<i>Ernährung</i>	19
3.3 DICKDARMKREBS	19
3.3.1 RISIKOFAKTOREN.....	21
3.4 OXIDATIVER STRESS	23
3.5. ANTIOXIDATIVE ABWEHRMECHANISMEN DER ZELLE	27
3.5.1.....	30
DAS ANTIOXIDANT RESPONSE ELEMENT (ARE).....	30
3.5.2 ROLLE VON NRF2 BEI DER ARE VERMITTELTEN GENEXPRESSION	31
3.5.3.....	32
REGULATION DER NRF2-KEAP1 WECHSELWIRKUNG	32
3.5.4.....	33
REGULATION VON NRF2 DURCH UPSTREAM SIGNALWEGE	33
3.5.5 GLUTATHION.....	35
3.5.6 γ -GCS REGULIERUNG	41
3.5.7.....	44
<i>Oxidativer Stress und redox-abhängige Änderungen der γ-GCL Aktivität</i>	44
3.5.8 <i>GCLC und GCLM Polymorphismen</i>	46
3.5.9.....	48
<i>Glutathion Therapie</i>	48
3.6. ENZYMATISCHE ABWEHRMECHANISMEN	49
3.6.1 <i>Glutathionperoxidase (GPX)</i>	49
3.6.2 <i>Superoxiddismutase 2 (SOD2)</i>	52
3.6.3.....	54
<i>Katalase</i>	54
3.7.....	56
NICHT-ENZYMATISCHE ANTIOXIDANTIEN.....	56
4. POLYPHENOLE	57
4.1 PHENOLSÄUREN	58
4.2 HYDROXYZIMTSÄUREN	58
4.3 DIHYDROCHALKONE	59
4.4 ANTHOCYANE	60
4.5 FLAVONOLE	63
4.6 FLAVONE.....	63
4.7 FLAVANOLE	64
4.8 PROANTHOCYANIDINE	65
4.9.....	66
STRUKTURELLE VORRAUSSETZUNGEN FÜR DAS ANTIOXIDATIVE POTENZIAL VON FLAVONOIDEN	66
5. METABOLISMUS UND BIOVERFÜGBARKEIT VON POLYPHENOLEN	67
5.1 WIRKUNG VON FLAVONOIDEN IM GASTROINTESTINALTRAKT	71
6. POLYPHENOLE DES APFELS	72
6.1 ABSORPTION, BIOVERFÜGBARKEIT UND METABOLISMUS VON APFELSAFTINHALTSSTOFFEN	74
6.2 PRÄVENTIVE WIRKSAMKEIT POLYPHENOLISCHER APFELINHALTSSTOFFE IN-VITRO	77
6.2.1 <i>Modulation antioxidativer Enzyme</i>	77

6.2.2 Antioxidative Aktivität	77
6.2.3 Antiinflammatorische Mechanismen	78
6.2.4	79
Hemmung von Signalwegen.....	79
6.2.5 Hemmung der Zellproliferation durch Apfelsaftextrakte.....	80
6.2.6.....	82
Apoptose-Induktion durch polyphenolische Apfelinhaltsstoffe.....	82
6.2.7 Antimutagenes Potential.....	83
6.2.8 Wirkung von Ballaststoffen aus Äpfeln in-vivo.....	84
6.3 ÄPFEL UND KREBSPRÄVENTION	85
6.3.1	87
Humane Kurzzeit-Interventionsstudien: Modulation des antioxidativen Status	87
7. HERSTELLUNG DER APFELSAFTEXTRAKTE UND APFELSÄFTE	89
7.1 ZUSAMMENSETZUNG DER IN-VITRO EINGESetzten APFELSAFTEXTRAKTE	89
7.2 HERSTELLUNG DES „APFELSMOOTHIE“ FÜR DIE ILEOSTOMA-STUDIE	91
7.2.2 POLYPHENOLZUSAMMENSETZUNG DES APFELSMOOTHIE	91
7.3. HERSTELLUNG UND ANALYTIK DER APFELSÄFTE FÜR DIE INTERVENTIONSSTUDIE AN RATTEN	93
7.3.1 Zusammensetzung der Apfelsäfte und antioxidative Kapazität.....	94
7.4 HERSTELLUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DES ROTEN MEHRFRUCHTSAFTES FÜR DIE INTERVENTIONSSTUDIE MIT HD-PATIENTEN.....	96
8. TESTSYSTEME	97
8.1 BESTIMMUNG DER ANTIOXIDATIVEN KAPAZITÄT.....	97
8.2 DICHLOROFLUORESCHEIN-ASSAY (DCF-ASSAY).....	99
8.3.....	100
DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	100
8.3.1 Die Taq DNA-Polymerase	101
8.3.2 Puffer und MgCl.....	101
8.4.....	101
QUANTITATIVE REAL-TIME TAQMAN-PCR.....	101
8.4.1	102
TaqMan PCR-MGB-Sonde	102
8.4.2 Kriterien für die Sondenauswahl.....	103
8.4.3 Spezifität des TaqMan PCR Assay.....	104
8.4.4	104
Auswahl der PCR-Primer.....	104
8.4.5 Optimierung der TaqMan PCR	105
8.4.6 Quantifizierungsstrategie	105
8.4.7 Relative Quantifizierung.....	105
8.5 ZELLINIEN	106
8.5.1 HT-29 Zellen.....	106
8.5.2 CaCo-2 Zellen	106
8.6 INKUBATION MIT TESTSUBSTANZEN.....	107
8.6.1	107
Tert.-Butylhydroperoxid.....	107
8.6.2 Menadion.....	107
8.6.3 Sulforaphan	108
9. ERGEBNISSE UND ERSTE DISKUSSION	109
9.1 MODULATION DER TRANSKRIPTION ANTIOXIDATIVER GENE DURCH APFELSAFT- INHALTSSTOFFE/ EXTRAKTE IN HT-29 UND CACO-2 ZELLEN.....	109
9.1.1	109
γ -GCL Transkription	109
9.1.2 GPX2 und GSR Transkription	113
9.1.3 Nrf2-Transkription	114
9.1.2 NQO1 Transkription.....	115
9.1.2 PARP1 Transkription	115
9.2. HUMANE INTERVENTIONSSTUDIE MIT APFELMARKSAFT	116
9.2.1 Zellfreie antioxidative Aktivität der Ileostoma-Proben	117
9.2.1.1 TEAC-Werte der Ileostoma-Proben.....	117

9.2.1.2.....	118
ORAC-Werte der Ileostoma-Proben.....	118
9.2.2 Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels.....	120
9.2.3 Modulation der antioxidativen Genexpression.....	123
9.2.4 Kumulierte Trockenmassen der Ileostomabeutel-Lyophilisate.....	124
9.2.5 Zytotoxizität und Wachstumshemmung.....	125
9.2.5.1 Wachstumshemmung	125
9.2.5.2.....	127
Viabilität.....	127
9.3. MODULATION DER ARE-ABHÄNGIGEN GENEXPRESSION DURCH APFELSÄFTE IN KOLON UND LEBER VON RATTEN.....	128
9.3.1 Basisexpression antioxidativer Gene in Kolon und Leber.....	129
9.3.2.....	130
Modulation der Genexpression durch Apfelsäfte	130
9.4 MODULATION DER ANTIOXIDATIVEN GENEXPRESSION BEI HD-PATIENTEN NACH INTERVENTION MIT EINEM ANTHOCYANREICHEN MEHRFRUCHTSAFT.....	131
10. GESAMTDISKUSSION DER ERGEBNISSE	135
11. ZUSAMMENFASSUNG	145
12. MATERIALIEN UND METHODEN	146
12.1 GERÄTE:.....	146
12.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN:	147
12.3 REAGENZIEN UND MEDIEN:.....	147
12.4 KITS:	148
12.5 LÖSUNGEN:	148
12.6 KULTIVIERUNG DER HT-29 UND CACO-2 ZELLINIE.....	149
12.6.1 Caco-2 Zellen	149
12.6.2 HT-29 Zellen.....	150
12.6.3 Mediumwechsel	150
12.6.4 Subkultivierung (Passagieren der Zellen).....	150
12.6.5 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau.....	150
12.6.6 Prüfung auf Mycoplasmen durch Fluorochromierung mit DAPI.....	151
12.7 ILEOSTOMA-STUDIE	152
12.7.1 Studiendesign.....	152
12.7.2 Charakterisierung des verwendeten Apfelsmoothies	152
12.7.3.....	153
Analytische Methoden und Biomarker.....	153
12.7.4 Patientendaten und Statistik	154
12.7.5 Aufarbeitung der Ileostoma-Beutelinhalte.....	154
12.7.6.....	154
Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).....	154
12.7.7 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	155
12.7.8 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay.....	157
12.7.9.....	158
Quantitative Real Time TaqMan-PCR.....	158
12.8 INTERVENTIONSSTUDIE AN RATTEN	161
12.8.1 Behandlung der Tiere und Probeentnahme	161
12.8.2 RNA Extraktion und RT-PCR	162
12.9 HD-STUDIE	165
12.9.1 Studiendesign.....	165
13. STATISTIK	165
14. LITERATURVERZEICHNIS.....	169
15.	198
ANHANG.....	198
GENEXPRESSION (HD-STUDIE).....	198
GENEXPRESSION IN HT-29 ZELLEN	199
GENEXPRESSION IN CACO-2 ZELLEN	202
DATEN ZUR RATTENSTUDIE	204

DATEN ZUR ILEOSTOMA-STUDIE.....	205
16.	208
ERKLÄRUNG DER EIGENLEISTUNG.....	208
17.	209
PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	209
DANKSAGUNG.....	211
LEBENS LAUF	214

Abkürzungen

AP-1	activator protein 1
8-OHdG	8-Hydroxyguanin
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ARE	„antioxidative response element“
AUC	„area under the curve“
BCA	Bicinchoninsäure
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	„bovine serum albumin“
CAT	Katalase
CBG	β -Glukosidase
cDNA	komplementäre DNA
cGPx (GPx1)	zelluläre Glutathion-Peroxidase
COMT	Catechol-O-methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
Cp	„crossing point“
Ct	„threshold cycle“
DAD	Diodenarraydetektor
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH	2',7'-Dichlorofluorescein
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E	Extinktion
E%	Entfärbung in %
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EC-SOD	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	„et alia“, lateinisch für „und andere“
F	Fluoreszenz
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fi	Fluoreszenzintensität
γ -GCL	γ -Glutamylcystein-Synthetase
GI-GPx (GPx2)	gastrointestinale Glutathion-Peroxidase
GPx	Glutathion-Peroxidase
GPx1 (cGPX)	zelluläre Glutathion-Peroxidase
GPx2 (GI-GPx)	gastrointestinale Glutathion-Peroxidase
GPx3	Plasma Glutathion-Peroxidase
GPx4	Phospholipid-Hydroperoxidase
GS	Glutathion-Synthetase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSR	Glutathion-Reduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)
HAT	„hydrogen atom transfer“
HPLC	„high performance liquid chromatography“
I-Med	Inkubations-Medium
LDL	„Low Density-Lipoprotein“
LPH	Laktase-Phloridzin-Hydrolase
LH	Fettsäure

MC	Morbus Crohn
mRNA	messegner Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid
net	Netto
NF-κB	„nuclear factor κB“
N-Med	Nähr-Medium
ORAC	„oxygen radical absorbance capacity“
PBS	„phosphate saline buffer“
PCR	Polymerasekettenreaktion
Penstrep	Penicillin/Streptomycin
Ph.E.	Phloridzin-Äquivalente
P-PST, SULT	Phenol-Sulfotransferasen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	“reversed phase”
RT	Reverse Transkription
RTq-PCR	Real Time quantitative Polymerasekettenreaktion
SET	„single electron transfer“
S-Med	Serumfreies-Medium
SOD	Superoxid-Dismutase
SPL	“sample”
SSA	5-Sulfosalicylsäure
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TBH	tert.-Butylhydroperoxid
TEAC	„Trolox equivalent antioxidative capacity“
tGSH	Gesamtglutathion
TNB	2-Nitro-5-Thiobenzoessäure
UC	Colitis Ulcerosa
UDPGT, UGT	UDP-Glukuronosyltransferasen
VdF	Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V.
XRE	„xenobiotisches response element“
$\Delta\Delta C_T$	Delta delta C_T
β -actin	Beta-actin
ΔC_T	Delta C_T
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
5(6) TAMRA	5(6)-carboxy-tetramethyl rhodamine
5(6)-FAM	5(6)-carboxyfluorescein
A	Adenin
AMV	Avian-Myoblastosis-Virus
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
CCD	Charge Coupled Device
cDNA	Copy DNS (ssDNS Kopie der mRNS)
DAPI	4', 6'-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat
dd	Didesoxy
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppelsträngige RNS
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G	Guanin
GCLC	Glutamatcystein-Ligase-Catalytic
GCLM	Glutamatcystein-Ligase-Modifier
GDP	Guanosindiphosphat
gRNA	gesamt Ribonucleinsäure
GTC	Guanidinthiocyanat
HT-29	humane Kolonzelllinie
kb	Kilobasen
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Messenger RNA
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
nt	Nucleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/strep	Penicillin/streptomycin
QPCR	Quantitative PCR
RNase	RNA-spaltendes Enzym
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	rounds per minute – Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssRNA	Einzelsträngige RNA
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
γ-GCS	gamma-Glutamylcystein-Synthetase
Caco-2	humane Kolontumorzelllinie

1. Einleitung

Ein Drittel aller Kosten im Gesundheitswesen werden nach Schätzungen des Bundesministeriums für Gesundheit durch Krankheiten verursacht, deren Entstehung und Entwicklung direkt oder indirekt durch Ernährungsfaktoren mit beeinflusst werden. Die Frage, ob und inwieweit sich derartige Erkrankungen durch verbesserte Ernährung oder verbesserte Lebensmittel verhindern, in ihrem Verlauf aufhalten oder gar rückgängig machen lassen, ist somit von erheblichem gesundheitspolitischem Interesse. Denn eine gesunde Ernährung stellt einen maßgeblichen Faktor bei der Prävention einer Vielzahl chronischer Erkrankungen, wie Diabetes, Asthma, Arteriosklerose, Rheuma, koronare Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfall, neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson), sowie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Chron, Colitis Ulcerosa) und nicht zuletzt auch von Krebs dar (*Lata et al., 2007; Jedrychowski et al., 2009*). Dickdarmkrebs ist hierbei in den westlichen Industrieländern mit steigender Inzidenz die zweithäufigste Todesursache bei beiden Geschlechtern. Kein anderes Krebsrisiko ist in seiner Ätiologie so stark von Umwelt- und Ernährungsgewohnheiten geprägt, wie der Darmkrebs. Epidemiologische Studien geben Hinweise darauf, dass eine kalorien- und fettreiche Ernährung, sowie ballaststoffarme- und hochprozessierte Lebensmittel mit geringer Nährstoffdichte das Krebsrisiko deutlich begünstigen. Ein hoher Anteil an rotem (eisenhaltigem) Fleisch, wenig Obst und Gemüse, sowie regelmäßiger Alkoholkonsum tragen ebenfalls zu einem erhöhten Risiko bei (*Potter, 2000*). Neben diesen Faktoren spielen auch Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheit, die individuelle genetische Prädisposition, sowie Körpergewicht, Alter und physische Aktivität eine entscheidende Rolle. Das Potential einer gesunden Ernährung als effektive Möglichkeit zur Prävention wird jedoch leider oft unterschätzt. In der Summe könnte dabei durch eine gesunde Ernährung das individuelle Krebsrisiko um bis zu 40 % gesenkt werden (*Karp et al., 2006*). Immer mehr Studien belegen diesen engen Zusammenhang und weisen auf die Notwendigkeit einer vermehrt obst- und gemüsereichen Ernährung als gesundheitsfördernde Massnahme hin. Obst und Gemüse stellen aufgrund ihrer Vielfalt, Reichhaltigkeit und ihrem Gehalt an wertvollen Inhaltsstoffen eine wichtige Quelle für essentielle Vitamine, Mineralstoffe, Proteine, Ballaststoffe, sowie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dar und haben antikanzerogenes Potenzial. Ausschlaggebend für diese gesundheitsfördernde Wirkung sind die in Obst und Gemüse enthaltenen bioaktiven Verbindungen, insbesondere die sog. sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (*Boyer et al., 2004; Willers et al., 2007; Gerhauser 2008*).

In westlichen Ländern stellen Äpfel neben Trauben und Orangen eine wichtige Quelle für die Aufnahme von Obst aus der Nahrung dar (*Perez et al., 2001*). Der Konsum von Apfelsaft ist weit verbreitet, mit einem jährlichen Pro-Kopf Verbrauch zwischen 8 und 12 Litern (*AFG-Markt; Perez 2008*). Epidemiologische Studien deuten auf eine inverse Korrelation zwischen regelmäßigem Verzehr von Äpfeln und dem Risiko für unterschiedliche Krebserkrankungen (wie z.B. Darmkrebs), Herz-Kreislauf Erkrankungen, Typ II Diabetes, sowie anderen ROS assoziierten Krankheiten hin (*Lata et al. 2007; Jedrychowski et al. 2009*). Darüber hinaus konnte in einer Kohortenstudie mit Neugeborenen ein umgekehrter Zusammenhang zwischen dem Apfelverzehr von Müttern in der Schwangerschaft und der frühkindlichen Entwicklung allergischer Erkrankungen (Asthma) festgestellt werden (*Willers et al. 2007*).

In einer Interventionsstudie mit gesunden Probanden konnte durch Apfelsaftverzehr eine verringerte Oxidation von Low-density Lipoproteinen im Plasma beobachtet werden. Diese antioxidative Wirkung wird mit einem reduzierten Risiko für koronare Arterienerkrankungen in Verbindung gebracht (*Hyson et al., 2000*). Die gesundheitsfördernde Wirkung des Apfelsaftes wird vor allem auf die darin enthaltenen polyphenolischen Inhaltsstoffe zurückgeführt. Äpfel stellen damit eine signifikante Polyphenolquelle für die menschliche Ernährung dar (*Arts et al. 2001; Boyer 2004; Gerhauser 2008*). Apfelpolyphenole kommen hauptsächlich in der Schale, im Kern und in der Frucht vor, sind potentielle Antioxidantien in-vitro und hemmen die inflammatorische Genexpression (*Schaefer et al. 2006; Bellion et al. 2008; Jung et al. 2009*). Epidemiologische Studien (retro oder prospektive) die das Essverhalten in der allgemeinen Bevölkerung beobachten, ermöglichen eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Aufnahme eines spezifischen Nahrungsmittels und dem Krebsrisiko (*Hoffmann et al. 2007*). In den letzten Jahren haben sich die Hinweise auf das krebopräventive Potenzial von Äpfeln verdichtet, insbesondere im Hinblick auf die Prävention von Lungen- und Dickdarmkrebs (*Feskanich et al. 2000*). Der Verzehr von Äpfeln korrelierte hierbei nicht-signifikant mit einem reduzierten Lungenkrebsrisiko, wogegen die Aufnahme von Tee (Hauptquelle für Catechine, 87%) keinen protektiven Effekt aufwies (*Arts et al. 2001*). Neben der Prävention von Lungenkrebs durch Apfelverzehr, gibt es epidemiologische Hinweise auf ein präventives Potenzial gegenüber Dickdarmkrebs. In der Nurses Health-Studie konnte ein signifikant vermindertes Darmkrebsrisiko bei 20 % der Frauen die am häufigsten Äpfel aßen, im Vergleich zu den 20 % die am wenigsten Äpfel verzehrten beobachtet werden (*Michels et al., 2006*). In einer kürzlich erschienen Fall-Kontroll-Studie von Jedrychowski et al. konnte eine deutliche inverse Korrelation zwischen dem Darmkrebsrisiko und der Anzahl täglich verzehrter Äpfel gezeigt werden. Hierbei wurden charakteristische Daten (Alter, Geschlecht, Energieaufnahme, Obst- und Gemüseverzehr) von 186 Darmkrebs-Patienten mit denen von 211 gesunden Probanden verglichen und mit Hilfe einer multivariaten Statistik ausgewertet. Bei einem Verzehr von mehr als einem Apfel pro Tag konnte eine signifikante Reduktion der Odds Ratio (OR: 0,37; 95% CI: 0,15-0,91) festgestellt werden (*Jedrychowski et al. 2009*). Die Autoren folgern hieraus, dass das verminderte Darmkrebsrisiko durch Apfelverzehr möglicherweise mit dem hohen Polyphenolgehalt in Äpfeln zusammenhängt.

Neben ihrer Fähigkeit freie Radikale direkt abzufangen und Übergangsmetallionen zu chelatieren, zeigen Apfelpolyphenole die Eigenschaft Zellen durch Steigerung der antioxidativen Abwehr vor ROS vermittelten Schäden zu schützen (*Rahman et al., 2006*). Die Expression antioxidativer Enzyme, wie z.B. der Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPX) und NADPH chinon-oxidoreduktase (NQO1) wird primär durch den Transkriptionsfaktor Nuclear factor erythroid derived 2-like 2 (Nrf2) gesteuert (*Kobayashi et al., 2005*). Studien an Nrf2 und Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) defizienten Mäusen unterstreichen zudem die wichtige Rolle von Nrf2 im Schutz vor Erkrankungen der Leber und des Gastrointestinaltraktes (*Aleksunes et al. 2007*). Nach oraler Gabe von Phenolsäuren, konnte in der Leber von Ratten erhöhte Cu,Zn-SOD, GPX und Katalase (KAT) mRNA Expression beobachtet werden, was auf eine transkriptionelle Regulierung dieser antioxidativen Enzyme hindeutet (*Yeh et al. 2006*). In HT-29 Zellen konnte nach Inkubation mit Lyophilisaten aus Ileostomabeutel-Inhalten eine gesteigerte Glutathion S-Transferase theta 2 (GSTT2)

Genexpression beobachtet werden. Nach Konsum von 1l eines trüben Apfelsaftes wurden die Ileostoma-Beutel an definierten Zeitpunkten gesammelt und deren lyophilisierte Inhalte *in-vitro* auf antioxidative Wirksamkeit geprüft (*Veeriah et al. 2008*). Die Polyphenolkonzentration von Apfelsäften (AS) ist stark von der Apfelsorte (Mostäpfel > Tafeläpfel), als auch vom Herstellungsverfahren (trüber AS > klarer AS) abhängig (*Will F et al., 2008*). Der Zusatz von Apfelmarmelade zum trüben AS führt darüber hinaus zu einer Erhöhung der Polyphenolkonzentration um etwa 100 % (*Will F et al., 2008*). In einer Interventionsstudie mit Dimethylhydrazin (DMH) behandelten Ratten, bewirkte trüber AS eine stärkere Reduktion in der Anzahl abberanter Crypt Foci, als klarer AS. Die Ergebnisse lassen ein präventives Potential gegenüber Kolonkrebs erwarten. Allerdings konnte durch beide AS keine signifikante Modulation inflammatorischer Cyclooxygenasen (Cox-1, Cox-2), als auch glutathion-assoziiierter (GST-P, GST-M, γ -Glutamylcystein-Ligase: γ -GCL) Gene bei DMH behandelten und unbehandelten Tieren beobachtet werden (*Barth et al. 2005; Barth et al. 2007*).

Die molekularen Mechanismen, die diesen präventiven Effekten zugrunde liegen, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Sichere Erkenntnisse über die kausalen Beziehungen zwischen Ernährung und Gesundheit und das Wohlbefinden von Menschen bilden die Grundlage sowohl für die Bereitstellung hochwertiger und gesunder Lebensmittel als auch für die Entwicklung und Verbreitung wissenschaftlich fundierter Empfehlungen zur Optimierung des Ernährungsverhaltens der Verbraucher. Das durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte nationale Forschungsnetzwerk „*Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten der Prävention durch die Ernährung*“, hat sich der Aufklärung der Wirkung von Apfelsaft-Inhaltsstoffen in der Prävention von Darmkrankheiten verschrieben und verfolgt das Ziel, eine optimale medizinische Versorgung der Bevölkerung sicherzustellen. Wurden in der ersten Förderphase klare und trübe Apfelsäfte, Apfelsaftextrakte, Trubstoffe aus naturtrüben Apfelsäften sowie ausgewählte Inhaltsstoffe wie Flavonoide und Procyanidine in die Untersuchungen einbezogen, liegen die Schwerpunkte in der zweiten Förderphase neben der weiteren Identifizierung der aktiven Komponenten auf der Absicherung der Daten am Menschen. Aus den Ergebnissen lassen sich Aussagen zum Einsatz antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe in funktionellen Lebensmitteln zur Prävention von Darmerkrankungen ableiten. Als Modelle dienen hier in erster Linie Darmzellen, an denen die antioxidative Kapazität, der Transport, sowie die Wirkung der Substanzen auf Zellwachstum, Genexpression und Zelltod untersucht werden. Die Ergebnisse sollen unter anderem der Entwicklung neuer Herstellungsverfahren von Obstsaften und funktionellen Lebensmitteln dienen (*BMBF, 2009*).

Für die Beurteilung möglicher gesundheitsfördernder Wirkungen im Kolon ist es notwendig, protektive Effekte im biologischen System zu erkennen. Verschiedene ROS schädigen einzelne Zellstrukturen in sehr unterschiedlichem Ausmaß, ein Assay kann jedoch nur einen einzelnen Aspekt darstellen. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist es daher nur mit einem Spektrum relevanter Marker möglich, oxidative Veränderungen an unterschiedlichen zellulären Zielmolekülen sowie Modulation der redoxsensitiven Zellantwort zu erfassen und in ihrer Bedeutung zu bewerten. Weiterhin ist es erforderlich, die antioxidative Kapazität potentiell präventiver Stoffe intrazellulär zu erfassen, da hierdurch im Gegensatz zu den häufig herangezogenen zellfreien Tests Einflüsse von Bioverfügbarkeit, Stabilität und Metabolismus

der Substanzen berücksichtigt werden. Die Aktivierung der antioxidativen Genexpression erfolgt über responsive DNA-Elemente, welche in der jeweiligen Promotorregion des Gens lokalisiert sind und die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 für die antioxidant response element (ARE) abhängige Aktivierung verantwortlich ist. Nrf2 ist in fast allen Zellen und Geweben exprimiert und zählt zu der Familie der sogenannten Cap'N collar (CNC) basic leucine zipper Proteine (*Gupta et al. 1997; Klaunig et al., 2004*). Vergleichende Untersuchungen an genetisch veränderten Nagetiermodellen (Nrf2^{+/+} und Nrf2^{-/-}) haben gezeigt, dass zahlreiche Gene durch Nrf2 reguliert werden, darunter auch jene, die für die Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind. Ferner ist ein Einfluss von polyphenolischen Inhaltsstoffe auf die Regulation der Nrf2 Genexpression, sowie weiterer redoxsensitiver Zielgene beschrieben. Unter diesen Genen zählen die γ -GCL, die für den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Glutathionsynthese verantwortlich ist, NQO1, GPX, Glutathion Reduktase (GSR), SOD, KAT, Hemeoxygenase (HO-1) und Thioredoxin (*Fridovich 1986*).

2. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

In Teilprojekt 1.6 des BMBF-Netzwerks wurde mit einem breiten Methodenspektrum die antioxidative Wirksamkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen untersucht. Ziel der Arbeiten war es, die antioxidative Wirksamkeit polyphenolreicher Apfelsäfte/ Extrakte zu charakterisieren, um aus den hieraus gewonnenen Erkenntnissen Apfelsäfte mit besonders hohem gesundheitsförderndem Nutzen zu entwickeln.

Die antioxidative Wirksamkeit polyphenolischer Inhaltsstoffe äußert sich u.a. in der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), sowie in der Verringerung oxidativer Zellschäden. Die Zelle verfügt darüber hinaus über antioxidative Abwehrmechanismen die bei erhöhtem oxidativem Stress aktiviert werden können. Ein wichtiges regulatives Element bietet hierbei die antioxidative Genexpression, welche die nachgeschaltete Expression antioxidativer Enzyme steuert und u.a. durch polyphenolische Verbindungen moduliert werden kann (*Moskaug et al. 2004*). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit stellt daher die Untersuchung des Einflusses polyphenolischer Apfelsäfte, sowie ausgewählter Apfelsaftextrakte (AE) und polyphenolischer Inhaltsstoffe auf die antioxidative Genexpression dar. Aus den hieraus gewonnenen Erkenntnissen können konkrete Aussagen über Unterschiede in der Genexpression innerhalb der untersuchten Testbedingungen (*in-vitro und in-vivo*) und auch Unterschiede in der antioxidativen Wirksamkeit der eingesetzten Testmaterialien (Apfelsaftextrakte, Apfelsäfte, polyphenolische Inhaltsstoffe) getroffen werden.

– Die *in vitro*-Arbeiten haben das Ziel, die antioxidative Wirksamkeit verschiedener Apfelsaftextrakte zu charakterisieren und die mit unterschiedlich zusammengesetzten polyphenolischen Apfelsaftextrakten an humanen Darmzellen gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Entwicklung von Apfelsäften mit besonders hoher präventiver Kapazität im Darm beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Aglyka Quercetin und Phloretin, der Inhaltsstoffe Chlorogensäure und Kaffeesäure sowie der Apfelsaftextrakte AE02 /03 und AE05 auf die Transkription der katalytischen und modulatorischen γ -GCL-Untereinheiten (GCLC und GCLM) in HT-29 und Caco-2 Zellen nach 6- und 24h-Inkubation mittels Real Time TaqMan-PCR untersucht. Als Referenzverbindungen wurden Sulforaphan und der Redox-Cycler Menadion vergleichend eingesetzt. Die für den Redoxstatus des Glutathions relevanten ARE-abhängigen Gene GPX2 und GSR (*Brigelius-Flohe et al. 2006; Muller et al., 2003; Singh et al., 2006*), sowie die Transkription des nuklearen Redoxfaktors Nrf2 wurden in die Untersuchungen miteinbezogen.

– In einer Interventionsstudie mit Ileostoma-Patienten wurde die antioxidative Wirksamkeit eines fermentierten Apfelmarksaftes charakterisiert. Interventionsstudien mit Ileostoma-Patienten können sowohl Aufschluss über die Bioverfügbarkeit polyphenolischer Inhaltsstoffe und ihrer Metabolite geben, als auch die Charakterisierung besonders antioxidativ wirksamer polyphenolischer Verbindungen ermöglichen. Ileostoma-Patienten haben in der Regel einen intakten Dünndarm und bieten daher die Möglichkeit die *in-vivo* Fermentation von Lebensmitteln in diesem Darmabschnitt zu erfassen, denn alles was den Ileostomabeutel erreicht, würde auch den nachfolgenden Dickdarmabschnitt passieren und dort möglicherweise auch präventive Wirksamkeit entfalten. Bereits durchgeführte Untersuchungen zur Zusammensetzung

und Wirkung polyphenolreicher Apfelsaftextrakte *in vitro*, zeigten viel versprechende antioxidative Eigenschaften von Apfelinhaltsstoffen in humanen Darmzellen, die bestimmten Schlüsselstrukturen zugeschrieben werden konnten (*Schaefer et al. 2006; Bellion et al. 2008*). Erste Informationen zur Metabolisierung der Apfelinhaltsstoffe im Dünndarm-Modell und bei Ileostomie-Patienten lagen bereits vor (*Kahle et al. 2005, 2006, 2007*). Die Arbeitsgruppe von Prof. Helmut Dietrich in der Forschungsanstalt Geisenheim hat auf der Basis dieser Ergebnisse einen Smoothie mit hohem natürlichen Polyphenol- und Pektingehalt für die vorgesehene Studie bereitgestellt.

Ziel dieser humanen Interventionsstudie war die Charakterisierung eines polyphenolreichen Apfelmarsaftes im Hinblick auf Bioverfügbarkeit und antioxidativer Wirksamkeit im menschlichen Darm. Der zu prüfende Apfelsaft ist ein natürliches Nahrungsmittel, bestehend aus naturtrübem Apfelsaft und Apfelmarmark aus polyphenolreichen Apfelsorten, der eine hohe Schutzwirkung erwarten lässt. Im Vordergrund steht die Klärung der Frage, welche Saftinhaltsstoffe/ Metabolite den Dickdarm erreichen und in welchem Maße sie an Darmzellen präventiv wirksam sind. Die vorgesehene Verzehrsstudie mit Patienten mit Stoma des terminalen Ileum ermöglicht Saftinhaltsstoffe/ Metabolite unmittelbar vor der Dickdarmpassage aus den Inhalten der Ileostomabeutel zu gewinnen und *in-vitro* zu untersuchen. Durch die Charakterisierung der biologischen Wirkung der Beutelinhalte können Strukturen identifiziert werden, die möglicherweise im Kolon präventiv wirksam sind und darüber hinaus wird der zeitliche Verlauf der Magen-Darmpassage erfasst. Die Identifizierung als auch die quantitative Erfassung der in den Ileostoma-Proben enthaltenen polyphenolischen Inhaltsstoffe/ Metabolite ist dabei Gegenstand laufender Untersuchungen in der AG Prof. Richling und könnte Hinweise auf aktivitätsgeleitete Strukturcharakteristika einzelner polyphenolischer Verbindungen geben.

— In einer weiteren Interventionsstudie wurde der Einfluss unterschiedlich hergestellter Apfelsäfte (klarer/ trüber AS, Smoothie, im Vergleich zu einem polyphenolfreien Kontrollsaft) auf die Modulation ARE abhängiger Genexpression in Kolon und Leber männlicher Sprague-Dawley (SD) Ratten (n=8/ Gruppe; 10 Tage Saftintervention; 4 Tage wash-out; 4 Wiederholungen) untersucht. Die Expression von Zielgenen (SOD1/SOD2; GPX1/GPX2; γ -GCL; GSR; KAT; NQO1 und Nrf2) wurde mittels duplex RT-PCR untersucht. Ziel der Studie war zu ergründen, inwieweit polyphenolreiche AS die antioxidative Genexpression in Ratten modulieren und inwiefern die Polyphenolzusammensetzung und Art des Saftes einen Einfluss auf die antioxidative Abwehr hat.

— In einer bereits durchgeführten zehnwöchigen Interventionsstudie mit Hämodialyse (HD)-Patienten konnten Spormann et al. eine protektive Wirksamkeit eines roten anthocyanreichen Mehrfruchtsaftes zeigen (*Spormann et al., 2008*). Ergänzend zu den von Spormann et al. untersuchten Biomarkern wurden Genexpressionsuntersuchungen in peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) der HD-Patienten mittels Real Time TaqMan PCR durchgeführt. Hierbei wurde neben der Expression ausgewählter glutathionbezogener Gene (γ -Glutamylcystein-Ligase, γ -GCL; Glutathionperoxidase, GPX1; Glutathionreduktase, GSR) auch die Nrf2 Transkription, sowie die Genexpression des inflammatorischen Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2) erfasst. Im Verbund zu den von Spormann et al. erhaltenen Ergebnissen lassen sich hierbei möglicherweise Aussagen darüber treffen, ob die ausgewählten Zielgene durch die Saftintervention moduliert werden und an der antioxidativen Abwehr involviert sind.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1 Der menschliche Darm

Sowohl bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), als auch im Falle von Dickdarmkrebs sind primär der Darm, bzw. weite Teilbereiche des Gastrointestinaltraktes betroffen und zeigen je nach Krankheitssymptom und Pathologie ein unterschiedliches Erscheinungsbild. Für ein grundlegendes Verständnis dieser Erkrankungen ist daher der anatomische Aufbau dieses besonderen Organs erforderlich und wird im Folgenden Abschnitt kurz erläutert. Der menschliche Darm ist aufgrund seiner großen Gesamtoberfläche von 200 m² ein äußerst effizientes, aber auch empfindliches Organ. Neben der Resorption von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten aus der Nahrung, trägt er vor allem zur Regulierung des Immunsystems bei (*Gastell, 2002*). Der gesamte Darm bildet einen Teilbereich des Gastrointestinaltraktes (GIT) und gliedert sich in mehrere Darmabschnitte (Abb.1-2).

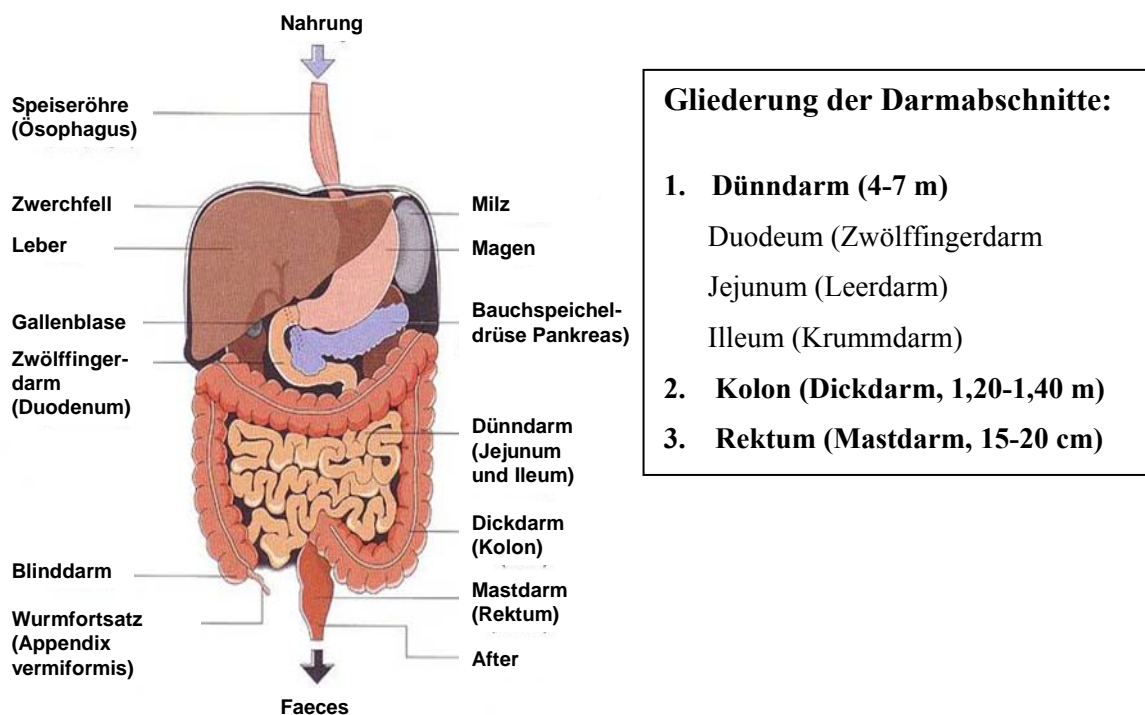


Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Gastrointestinaltraktes mit den umliegenden Organen.

Durch die zahlreichen Ausstülpungen (Falten und Zotten) des Dünndarms wird dessen Oberfläche auf ein Vielfaches vergrößert, wodurch Nahrungsbestandteile besser resorbiert werden können. Das Darmlumen wird von der Schleimhaut (Mucosa) ausgekleidet und gliedert sich in drei Schichten:

1. **Epithelschicht**
2. **Schleimbindegewebe** (umhüllt von einer dünnen Schicht glatter Muskulatur)
3. **Submucosa** (Bindegewebsschicht)

Innerhalb der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes sind vereinzelt oder in Gruppen zahlreiche Lymphfollikel lokalisiert, die zusammen mit diffus verteilten Lymphozyten in ihrer Gesamtheit als darmassoziiertes lymphatisches System bezeichnet. Es stellt einen Teil des spezifischen Abwehrsystems dar, das gegen Antigene im Darm wirkt. Besonders in der Schleimhaut des Ileums liegen die Lymphfollikel dicht gedrängt in Form zusammengesetzter Platten (Peyer-Platten) vor.

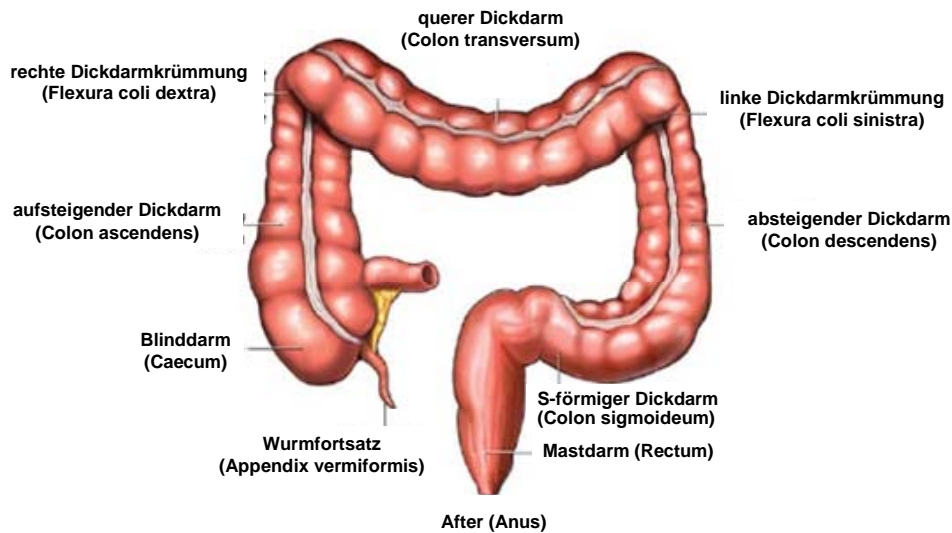


Abbildung 2: Aufbau des menschlichen Dickdarms

Hauptfunktion des Dickdarms ist die Rückresorption von Wasser und Salzen, die mit den Verdauungssäften in den Darm gelangen. In den Dickdarm gelangen unverdauliche Nahrungsreste, die durch Bakterien in Gärungs- und Fäulnisprozessen metabolisiert werden. Die Dickdarmschleimhaut weist eine wesentlich geringere Oberflächenvergrößerung als die Dünndarmschleimhaut auf (Abb. 3). Es fehlen Zotten und die Oberfläche wird ausschließlich durch tiefe Einsenkungen (Lieberkühnsche-Krypten) vergrößert. Als Ausdruck einer starken Wasserrückresorption besteht das Schleimhautepithel überwiegend aus schleimbildenden Becherzellen und mit einem Bürstensaum ausgestatteten Epithelzellen. In der Schleimhaut kommen ebenfalls zahlreiche Lymphfollikel vor.

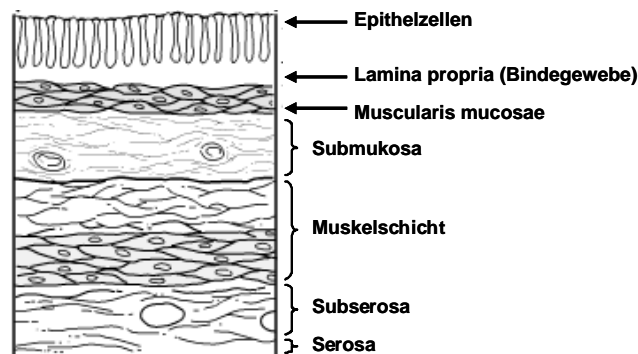


Abbildung 3: Aufbau der menschlichen Dickdarmschleimhaut. (Johnston, 1999)

3.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Als chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes verstanden, die mit einer fortschreitenden Entzündung des Darms einhergehen. Man unterscheidet dabei zwischen der sogenannten Colitis Ulcerosa (CU) und dem Morbus Crohn (MC). Beide Erkrankungen können in jedem Lebensalter auftreten, mit einem Manifestationsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, sowie einem zweiten niedrigeren, zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (bimodale Altersverteilung) (**Renz-Polster, 2004**). Obwohl die Ursachen für die Entstehung von CED wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa bis heute nicht vollständig geklärt sind, wird ein enger Zusammenhang in der Fehlregulation des Immunsystems, verbunden mit einem erhöhten oxidativen Stress in den Darmzellen angenommen. Beide Erkrankungen richten sich gegen das körpereigene Abwehrsystem und werden daher als autoimmun aufgefasst. Aktuelle Studien geben Hinweise auf eine Beteiligung verschiedener Zielgene und veränderter molekularer Mechanismen, deren funktionelle Aufklärung einen wichtigen Schritt zum besseren Verständnis ermöglicht. Neben einer gezielten medikamentösen Behandlung kann eine angepasste gesunde Ernährung einen positiven Beitrag für den besseren Umgang mit der Erkrankung leisten (**Head et al. 2004**).

3.2.1 Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa

Die Krankheit Morbus Crohn (MC) wurde erstmals 1932 von Dr. B. B. Crohn et al. als Enteritis regionalis (lokale Dünndarmentzündung) beschrieben, kann jedoch im gesamten Gastrointestinaltrakt von der Mundhöhle bis zur Analregion vorkommen und alle Schichten der Darmwand befallen (**Head et al. 2004**) (Abb.4). Der Befall ist diskontinuierlich, segmental, mit oft weiten gesunden Bereichen zwischen befallenen Darmteilen (**Thews, 1999**). MC wird sehr häufig im terminalen Ileum diagnostiziert, der Dickdarm ist in 30 % der Fälle betroffen, übrige Dünndarmabschnitte und der Magen zu 5 %, die Speiseröhre in weniger als 1 % und gelegentlich auch die Mundschleimhaut (7 %). Die Erkrankung beginnt i. d. R. schleichend, selten akut, Perioden geringerer und hoher Aktivität wechseln miteinander ab (**Hubert, 2004**).

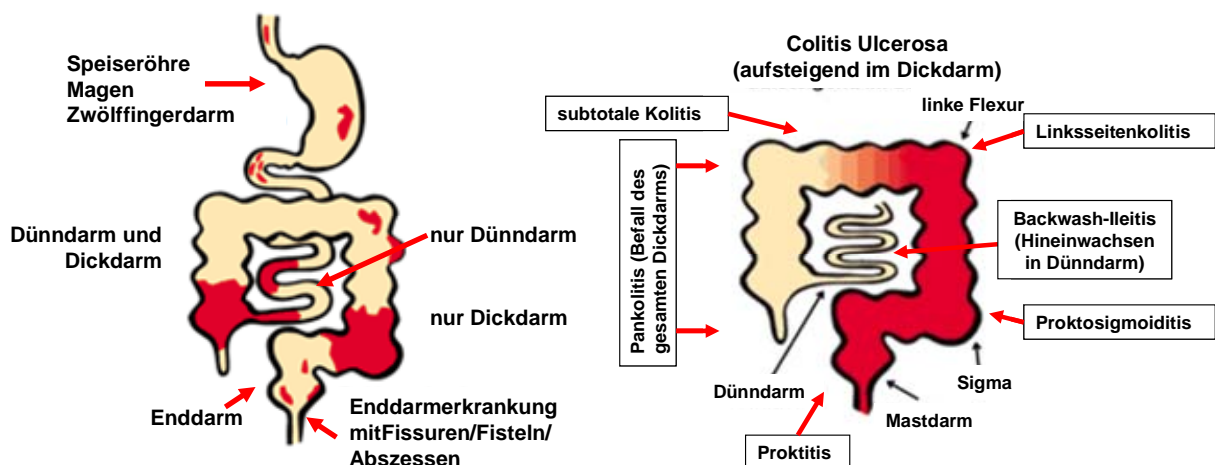


Abbildung 4: Entzündungsbefall bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa

Colitis Ulcerosa (UC) wurde erstmals 1875 von Wilks und Moxon beschrieben. Diese Erkrankung tritt ebenfalls schubartig auf und ist mit einer vermehrten Entzündung des Dickdarms verbunden. Jedoch sind nicht wie beim Morbus Crohn alle Wandschichten betroffen, sondern nur Mucosa und Submucosa. Meist beginnt die Erkrankung im Mastdarm (Rektum) und breitet sich u. U. über den gesamten Dickdarm aus. Man unterscheidet hierbei verschiedene Ausdehnungen (Abb. 4) (*DCCV e.V., 2009; Hubert, 2004*). MC und CU sind keine ausschließlich den Darm betreffenden Erkrankungen, es treten auch Veränderungen der Haut, Gelenke, sowie der Augen auf. Eine zusätzliche Erkrankung der Atemwege, Nieren oder des Nervensystems sind vermutlich Folgen des defekten Immunsystems (*Itzkowitz et al. 2004*). Zu den pathologischen Symptomen zählt eine Erhöhung an inflammatorischen Mediatoren (Tab.1), oxidativer Stress, vermindertes Kolonmilieu, abnormale Glycosaminoglycan-Gehalte in der Mucosa, erniedrigte Oxidation kurzkettiger Fettsäuren, erhöhte intestinale Permeabilität, sowie erhöhte Sulfidbildung.

Tabelle 1: Vergleich der Zytokinprofile zwischen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (*Head et al. 2004*)

Zytokin	Colitis Ulcerosa	Morbus Crohn
Interleukin 1 (IL-1)	normal im Serum, erhöht in der Mucosa	
IL-2	normal im Serum und Mucosa	erhöht in Serum und Mucosa
IL-6	normal im Serum, erhöht in Mucosa	erhöht in Serum und Mucosa
IL-8	in Serum nicht feststellbar, erhöht in Mucosa	in Serum nicht feststellbar, in Mucosa nicht beschrieben
Interferon-gamma	Serumspiegel nicht bekannt, normal in Mucosa	Serumspiegel nicht bekannt, erhöht in Mucosa
Tumor-Nekrose-Faktor alpha	erhöht in Serum und Mucosa	erhöht in Serum und Mucosa

3.2.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts sind an MC und CU überwiegend Einwohner der reichen Industrieländer in Nord-/West- und Mitteleuropa, sowie USA und Japan erkrankt. Möglicherweise gibt es einen unmittelbaren Zusammenhang mit einer erhöhten Hygiene in diesen Ländern, wodurch seltener eine vorzeitige Immunisierung mit Erregern stattfindet und dadurch Allergien und chronische Erkrankungen vermehrt auftreten. Auch das frühzeitige Abstillen des Kindes oder das ausschließliche Aufziehen mit Milch aus der Flasche erhöht das Erkrankungsrisiko um 50 %, da nur eingeschränkt Immunglobuline in den Körper gelangen, wobei gerade diese Bestandteile der Muttermilch besonders wichtig sind um einen wirksamen Schutz vor Krankheitserregern auszubilden (*Gastell, 2002*). Darüber hinaus wird auch eine genetische Prädisposition vermutet, die unter Einwirkung weiterer Faktoren wie z. B. Störung des Immunsystems, bakterielle Einflüsse, Ernährung oder Umwelteinflüsse die Erkrankung auslösen kann. Es handelt sich folglich um eine multifaktoriell bedingte Krankheit. In Tab. 2 werden zusammenfassend die wichtigsten Merkmale beider Erkrankungen gegenübergestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung: Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (*Emmerich, 2004*)

	Morbus Crohn	Colitis Ulcerosa
Epidemiologie	Inzidenz: 5-6/100 000 p.a., Prävalenz: 50-60/100 000 Einw.; w > m	Inzidenz: 5-6/100 000 p.a., Prävalenz: 80-120/100 000 Einw.; w = m
Lokalisation	gesamter GI-Trakt	Dickdarm (selten Ileum)
Ausbreitung	segmental (von proximal)	kontinuierlich (von distal)
Tiefe des Befalls	transmural	nur Mukosa und Submukosa
Granulome	50-60 %	selten
Kryptenabszesse	+	+++
Becherzellenanzahl	normal	vermindert
klinische Symptome	Diarrhoe, selten Rektalblutung; häufig Fisteln, Stenosen und selten toxisches Megakolon, Abszesse	Diarrhoe, häufig Rektalblutung; selten Fisteln, Stenosen, gelegentlich Abszesse, gelegentlich
extraintestinale Manifestationen	häufig: Nieren/Gallensteine, Pericholangitis, Sakroileitis, Arthritis (monoartikulär), Erythema nodosum, Uveitis, Episkleritis	selten: Pericholangitis, Sakroileitis, primär sklerosierende Cholangitis, Arthritis, Leberzirrhose, Uveitis, Episkleritis
maligne Entartung	selten (Dünndarm)	gelegentlich (Dickdarm)
Röntgen	Pseudopolypen +, Pflastersteinrelief, kurze Stenosen	Pseudopolypen +++, Hauttrenchschwund, samtartige Schleimhaut
Endoskopie	scharf begrenzte Ulzerationen, Rektumbefall in 50 %	diffuse Ulzerationen, Rektumbefall in 95 %

Oxidative Vorgänge im Pathomechanismus von CED sind in den letzten 20 Jahren in der medizinischen Forschung in den Vordergrund gerückt, vor allem die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche eine Schädigung der Epithellzellen der Darmmucosa zur Folge haben können, erhält immer mehr Aufmerksamkeit (*Tuzun et al., 2002*). In Biopsien entzündeter Darmschleimhaut von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa Patienten konnten Lih-Brody et al. 1996 erhöhten oxidativen Stress und erniedrigte Aktivität antioxidativer Enzyme nachweisen (*Lih-Brody et al. 1996*). Andererseits fanden Bhaskar et al., dass die Aktivität antioxidativer Enzyme in der Mucosa bei CU Patienten und Kontrollgruppen sich nicht unterschied und der Malondialdehyd-Gehalt auch nicht anstieg (*Bhaskar et al., 1995*). Die Ergebnisse mehrerer Studien zeigen aber, dass viele antioxidative Systeme im Serum und Plasma, sowie im Gewebe bei CED-Patienten insgesamt erniedrigt sind (*Karp et al. 2006*). Allerdings wurde ein erhöhter Glutathionperoxidase-Spiegel im Plasma beobachtet, was als eine aktive Reaktion der Mucosa gegen freie Radikale gesehen wird (*Tuzun et al., 2002*).

3.2.1.2 Genetische Ursachen

Obwohl CED keine Erbkrankheit im klassischen Sinne ist, gilt ein erhöhtes Vorkommen in der Verwandtschaft von Patienten und ein erhöhtes Risiko für Kinder von Erkrankten inzwischen als gesichert (*Head et al. 2004*). Hierbei wird von einer polygenen Erkrankung ausgegangen, bei der mehrere Gene in Korrelation miteinander und der Umwelt stehen und so für das Entstehen der Erkrankung verantwortlich sind (*Hubert, 2004*). So wurden unter anderem auf Chromosom 16 (IBD1-Gen), 12 (IBD2-Gen) und 6 (IBD3-Gen) verschiedene Suszeptibilitätsregionen entdeckt, die mit erhöhtem Auftreten einer CED in Verbindung stehen (*Hugot et al. 1995, 1996; Ohmen et al. 1996*). Das NOD2-Gen (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 auch CARD15: caspase activation and recruitment domain 15 genannt) auf Chromosom 16 scheint

vor allem mit Morbus Crohn assoziiert zu sein. Homozygote Träger dieses Suszeptibilitätsgens weisen im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 30-100-fach erhöhtes Risiko auf, an MC zu erkranken, allerdings ist das NOD2-Gen nur für 10-15% der Fälle von Morbus Crohn verantwortlich (*Bamias et al., 2005*).

3.2.1.3 Ernährung

Crohn- und Colitis- Patienten weisen im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko an Krebs zu erkranken auf. Besonders bei Patienten mit einem ausgedehnten Kolonbefall oder einer langen Erkrankungsdauer können sich Dickdarmkarzinome bilden. Umso wichtiger ist daher auch den präventiven Effekt einer gesunden, Obst- und gemüsereichen Ernährung zu nutzen. Die schnelle Verfügbarkeit und das überwältigende Angebot konventioneller Lebensmittel und Fertigprodukte, führt in den westlichen Industrieländern mitunter zu einem raschen Wandel in der Ernährungsweise, hin zu einer überwiegend ungesunden, fett- und zuckerlastigen Ernährung. Eine erhöhte Aufnahme einfacher Zucker und gehärteter Fette (Trans-Fettsäuren) wird mit dem Auftreten von CED in Verbindung gebracht. Dagegen könnte eine gesundheitsbewusste, ballaststoff- und abwechslungsreiche Ernährung mit reichlich Obst und Gemüse einen präventiven Beitrag darstellen (*Karp et al., 2006*). Neben Vitaminen und Ballaststoffen werden vor allem den Polyphenolen, die in vielen Obst- und Gemüsesorten sowie Fruchtsäften (Apfelsaft), Kakao und grünem Tee vorkommen, eine präventive Wirkung zugeschrieben (*Lata et al., 2007; Jedrychowski et al., 2009*).

3.3 Dickdarmkrebs

Darmkrebs ist in Deutschland bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer auf über 37.000 und Frauen auf etwa 36.000 geschätzt. Männer erkranken im Mittel mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Darmkrebs ist darüber hinaus sowohl für Frauen als auch für Männer die zweithäufigste Krebstodesursache. Die kumulierten relativen 5-Jahres-Überlebensraten bei Darmkrebs liegen für Männer wie auch für Frauen inzwischen bei 60 %. Es sind mehrere vererbare Formen des Dickdarmkrebses bekannt, diese tragen jedoch nur zu 15 % an der Erkrankungsursache bei. Die Adenom-Karzinom Sequenz stellt das bis heute generell akzeptierte Modell für die Ursache und Entwicklung der sporadischen Erkrankungsform dar (*Winawer, 1999*). Adenomatöse Polypen sind häufige Läsionen und nur ein geringer Anteil wird malignant. Es wird daher angenommen, dass insbesondere Umweltfaktoren einen Einfluss auf diese Veränderung nehmen (*Hill et al., 1978*). Glücklicherweise ist der Übergang vom nicht-invasiven Adenom zum invasiven Karzinom ein relativ seltenes Ereignis. Den größten Durchbruch für das Verständnis der Adenom-Karzinom Sequenz brachte die Entdeckung dass die Progression mit somatischen Mutationen einhergeht, die Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene beeinflussen (*Vogelstein et al. 1988*) (Abb.5). Das Mutationsmuster hängt dabei von der Größe und Wachstumsrate der Läsionen ab.

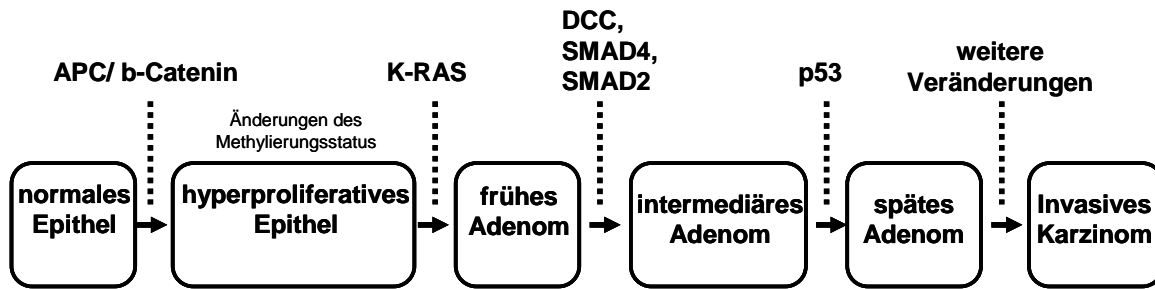


Abbildung 5: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese im Dickdarm (nach Fearon & Vogelstein, 1990)

In der nicht vererbaren Form des Dickdarmkrebs sind mehrere unabhängige genetische Ereignisse in der richtigen Reihenfolge für die Entstehung erforderlich (Vogelstein *et al.* 1988; Nystrom *et al.* 2009). Der Prozess beginnt mit der Bildung adenomatöser polyposis Coli (APC) Mutationen innerhalb normaler Kolonepithelzellen. Letztere migrieren an die Spitze der Krypten, wo sie expandieren und ein frühes Adenoma bilden (Smith *et al.* 1993). Die nachfolgende Akkumulation einer K-RAS Mutation fördert die Entstehung eines intermediären Adenoms, gefolgt von der Bildung eines späten Adenoms nach Mutationen an Chromosom 18q21 (Zielgene: DCC, DPC4 und JV18). Mutationen am p53 Gen führen schließlich zur Transformation prä malignanter Läsionen zum invasiven Karzinom und weitere genetische Veränderungen letztendlich zu Mutationen (Kinzler *et al.* 1996). Um die vollständige Malignität zu erreichen, müssen die Zellen bestimmte Transformationseigenschaften aufweisen (Hanahan *et al.* 2000). Dazu zählt ein unbegrenztes Replikationspotential, eine ausreichende Wachstumsstimulierung, Unbeeinflussbarkeit durch antiproliferative Signale, Umgehung der Apoptose, Induktion und Aufrechterhaltung der Angiogenese, sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastase. Diese Ereignissequenzen bieten jedoch viele Möglichkeiten zur Intervention, mit dem Ziel den Transformationsprozess aufzuhalten, zu verzögern oder gar umzukehren. Neben der nicht-vererbaren Erkrankungsform existieren darüber hinaus zwei vererbare Formen des Darmkrebs (Olschwang *et al.* 2005).

Die ultimative Entstehung von Kolontumoren wird mit dem stark teilungsaktiven Mukosa-Epithel in Verbindung gebracht. Die säulenartigen Epithelzellen kleiden die mukosale Oberfläche des Dün- und Dickdarms aus (Abb. 6). Sie werden dabei permanent in das Darmlumen abgeschürft und durch neue Zellen aus den Krypten ersetzt. Während im Dünndarm die reifenden Zellen in die Zotten (Villi) migrieren, werden im Dickdarm die leicht gezahnten Interkrypt-Zonen besetzt. Jede Krypte stellt dabei eine eigene proliferierende Einheit dar. In beiden Darmabschnitten ist die Zellproliferation in der Nähe der Kryptebasis am höchsten und am oberen Drittel (in der Nähe des Darmlumens) dagegen vollständig abwesend. In der Basalzone unterscheidet man zwei Typen von teilungsaktiven Zellen. Die Stammzellen unterliegen einer asymmetrischen Zellteilung, bei der eine Tochterzelle ihre physikalische Lokalisation beibehält, während die andere Tochterzelle sich an eine Population teilender Zellen anschließt und während ihrer Migration von der Kryptebasis mehrere Aufspaltungen erfährt. Die Kryptezell Replikation ist in erster Linie im Gleichgewicht mit der Abschieferung alternder Zellen in das Darmlumen. Es

gibt jedoch auch einen geringen Anteil an Zellverlusten, die durch Apoptose von Zellen in der Basalzone der Krypten resultiert.

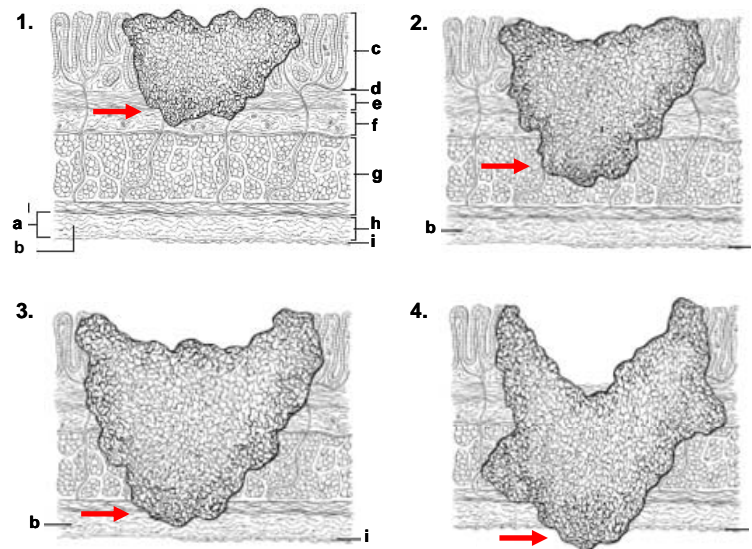


Abbildung 6 (1-4): Unterschiedliche Stadien der Tumordinvasion beim Dickdarm-Karzinom. Zuordnung der Buchstaben wie folgt (a: pericolisch perirektales Gewebe, b: *Adventitia*, c: *Mucosa*, d: *Lamina propria*, e: *Muscularis mucosae*, f: *Submucosa*, g: *Muscularis propria*, h: *Subserosa*, i: *Serosa*)
 Stadium T1: Invasion des Tumors in die *submucosa*
 Stadium T2: Invasion des Tumors in die *muscularis propria*
 Stadium T3: Invasion des Tumors durch die *muscularis propria* in die *subserosa*
 Stadium T4: Tumor durchdringt direkt andere Organe und/ oder perforiert das Bauchfell (*visceral peritoneum*)

3.3.1 Risikofaktoren

Ernährungsbedingte Faktoren, insbesondere eine ballaststoffarme, fettreiche Nahrung, ein hoher Anteil an rotem (eisenhaltigem) Fleisch (**Potter, 2000**), ein geringer Anteil an Gemüse, sowie regelmäßiger Alkoholkonsum erhöhen das Risiko an Darmkrebs zu erkranken ebenso wie Übergewicht und Bewegungsmangel. Das bessere Verständnis der molekularen Ereignisse in der Adenom-Karzinom Sequenz, ermöglicht hierbei die Aufklärung der protektiven Wirkmechanismen bioaktiver Lebensmittelinhaltsstoffe. Es ist seit langem bekannt, dass z. B. nicht-steroidale antiinflammatorische Arzneimittel (sog. NSAIDs) wie Acetylsalicylsäure (Aspirin) das Risiko für Dickdarmkrebs um bis zu 50 % senken können (**Lancaster et al. 1994**) und eine Regression von Polypen, sowie früher präkanzeröser Läsionen bewirken (**Katsuk et al. 1998**). Ein gewisser Anteil dieser protektiven Wirkung von NSAIDs resultiert aus ihrer Fähigkeit in Tumorzellen Apoptose zu induzieren, wodurch diese nicht mehr in der Adenom-Karzinom Sequenz auftreten können (**Elder et al. 2000**). Die Herausforderung besteht in der Charakterisierung und Identifizierung sicherer und effektiver Lebensmittel und Lebensmittelinhaltsstoffe, durch deren Aufnahme langfristig eine vergleichbare präventive Wirkung erzielt werden kann. Wie vermögen Lebensmittelinhaltsstoffe nun die Initiation und Promotion von Neoplasien auf zellulärer Ebene zu beeinflussen? In diesem Zusammenhang sind eine Vielzahl nahrungsmittelbedingter Kanzerogene, wie z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische aromatische Amine (**Adamson et al., 1996**) und N-Nitroso

Verbindungen bekannt. Eine andere Möglichkeit ist, dass Mutationen innerhalb der Adenom-Karzinom Sequenz aus endogenen Ursachen resultieren und Lebensmittelinhaltsstoffe primär in der post-Initiationsphase der Dickdarm-Kanzerogenese wirksam sind. In jedem Fall scheint die Rate der Kryptzell-Apoptose eine wichtige Determinante in jedem Schritt der Adenom-Karzinom Abfolge zu sein (**Bodmer, 1999**).

Allerdings gibt es konsistente Hinweise, dass eine obst- und gemüsereiche Ernährung mit einem verminderten Erkrankungsrisiko einhergeht. Ballaststoffen wird ebenfalls protektive Wirksamkeit gegen die Krebsentstehung zugeschrieben, obwohl Studien dies nicht eindeutig belegen konnten, bzw. der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist. Im Rahmen eines umfangreichen Reports wurde ein enger Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Obst und Gemüse und dem verminderten Risiko an Schlundkopf-, Speiseröhren-, Mund-, Lungen-, Magen-, Kolon-, und Rektumkrebs zu erkranken festgestellt (**World-Cancer-Research-Fund, 1997**). Aus dieser Studie wurde ebenfalls ein möglicherweise verringertes Risiko für andere Krebsformen (wie z. B. Kehlkopf-, Pankreas-, Brust- und Blasenkrebs) abgeleitet. Als Konsequenz aus den hierbei gewonnenen Erkenntnissen, wurden Ernährungsrichtlinien mit Fokus auf eine obst- und gemüsereiche Ernährung erstellt, deren Umsetzung in Verbindung mit einem normalen Körpergewicht, sowie regelmäßiger physischer Aktivität eine um 30-40 % erniedrigte Krebsinzidenz erwarten lässt. Die Realisierung, dass die Ernährung solch einen dramatischen Effekt auf die Krebsentstehung hat, resultiert aus den Ergebnissen epidemiologischer und experimenteller Studien. Die Erfassung der unterschiedlichen Inzidenz verschiedener Krebsformen zwischen unterschiedlichen Ländern, sowie die sukzessiven Generationen von Menschen die von einem Land in ein anderes ausgewandert sind zeigten, dass die Krebsentstehung sehr stark durch Umwelteinflüsse determiniert wird, mit der Ernährung als wichtigste Variable. Seit vielen Jahren konnte in unterschiedlichen Studien ein präventives Potential bioaktiver Lebensmittelinhaltsstoffe gezeigt werden. Insbesondere sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden präventive und gesundheitsfördernde Wirkungen zugesprochen. Zu den Hauptvertretern zählen hierbei die Polyphenole und phenolischen Inhaltsstoffe in Lebensmitteln. Auf der Grundlage von Human- und Tierstudien gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass insbesondere Polyphenole des Apfels eine wichtige Rolle bei der Prävention einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen spielen. Darüberhinaus wird dem Verzehr von Äpfeln- und Apfelprodukten eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen. Im Vergleich zu anderen Obst- und Gemüsesorten, sowie weiteren Polyphenolquellen gibt es konsistente Zusammenhänge zwischen dem Verzehr von Äpfeln und dem Krebsrisiko (**Kubik 2004; Knekt et al. 2002; Zatloukal et al. 2003; Jedrychowski et al. 2009**), sowie kardiovaskulärer Erkrankungen (**Sesso et al. 2003**), Asthma und chronischer obstruktiver Lungenerkrankung (**Tabak et al. 2001**). Der tägliche Verzehr von Äpfeln wird darüber hinaus mit einer verbesserten Lungenfunktion (**Butland et al., 2000**), sowie mit einer Gewichtsabnahme korreliert (**Conceicao et al., 2003**). In einer Fall-Kontroll Studie aus Uruguay konnte ein inverser Zusammenhang zwischen Apfelverzehr und dem Risiko für Dickdarmkrebs beobachtet werden (**Deneo-Pellegrini et al. 1996**). Eine Reanalyse mehrerer Fall-Kontroll Studien aus mediterranen Regionen zeigte ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen dem Apfelverzehr und sämtlicher Krebsformen, darunter auch Dickdarmkrebs (**Gallus et al., 2005**).

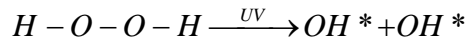
3.4 Oxidativer Stress

Unter normalen physiologischen Bedingungen herrscht ein gutes Gleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und dem Abbau durch antioxidative Abwehrsysteme. Ist jedoch der ROS-Level erhöht, was z.B. bei chronischen Entzündungen auftritt, und daher ein Mangel an antioxidativen Substanzen vorliegt, spricht man von oxidativem Stress. Biologisch relevant sind vor allem das Superoxid-Anion-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), sowie das Hydroxylradikal ($\cdot OH$), welche instabil und demzufolge hochreaktiv sind. Sie nehmen an zellulären Oxidations- und Reduktionsreaktionen teil (mitochondriale Atmungskette, Immunabwehr), wodurch sie ihre elektrochemische Stabilität zurückgewinnen. Dabei können aber auch biochemische Verbindungen wie Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Gewebe geschädigt oder zerstört werden (**Opata, 2006**). Im Organismus erfolgt die zelluläre Schädigung durch freie Radikale primär über die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranen. Durch die dabei entstehenden Peroxylradikale wird die sogenannte Lipidperoxidation in einer Kettenreaktion unterhalten, wobei auch bestimmte Aldehyde wie z.B. Malondialdehyd gebildet werden. Dies kann die Membranstabilität und -permeabilität, die Rezeptoranpassung sowie die potentielle zelluläre Lyse beeinträchtigen (**Karp et al. 2006**).

Molekularer Sauerstoff gelangte erstmals vor etwa 2,2 Mill. Jahren als Nebenprodukt photosynthetisch aktiver Cyanobakterien in hohem Maße in die Atmosphäre. Im Laufe der Evolution haben sich dabei alle aeroben Organismen an das toxische und mutagene Gas mit Hilfe hierfür eigens spezialisierter antioxidativer Abwehrmechanismen an diese lebensfeindlichen Bedingungen angepasst. Der zunehmende atmosphärische Sauerstoff (~ 21% O_2) stellte jedoch auch einen lebensnotwendigen Schutz vor gefährlicher UV-C Strahlung dar, indem er die Ozonschicht (O_3) bildete und wahrscheinlich somit erst Lebewesen die Besiedlung des Festlandes ermöglichte. Weiterhin wurde auch der Gehalt an zweiwertigem Eisen (Fe-II) in wässrigen Umgebungen durch die Bildung wasserunlöslicher Eisenkomplexe stark reduziert (**Lane, 2002**). Fe-II spielt hierbei eine besondere Rolle, da es unmittelbar mit H_2O_2 zur Bildung des hoch toxischen Hydroxyl-Radikals (OH^*) führt. Diese Reaktion ist als sogenannte Fenton-Reaktion bekannt:



Die Fenton-Reaktion findet ebenfalls *in-vivo* statt, jedoch wird diese durch die begrenzte Verfügbarkeit an freiem Fe^{2+} und H_2O_2 im Organismus kontrolliert (**Halliwell et al. 1984; Halliwell, 2006b**). Die Diffusion von H_2O_2 in zelluläre Membranen erfolgt hierbei möglicherweise über dieselben Kanäle wie für H_2O . Die zelluläre Konzentration und Verteilung von Übergangsmetallen wird unter physiologischen Bedingungen streng reguliert, freie Übergangsmetallionen in der Zelle sind daher oft mit pathologischen Erkrankungen (bei denen freie Radikale eine Rolle spielen) assoziiert. Als freie Radikale im engeren Sinne werden hierbei molekulare Spezies bzw. Atome verstanden, die über ein oder mehrere ungepaarte Elektronen verfügen. Atomarer Wasserstoff stellt dabei das einfachste freie Radikal dar. Radikale können über mehrere Mechanismen gebildet werden, z.B. durch die Übertragung eines Elektrons auf ein Nicht-Radikal, oder durch die homolytische Spaltung von kovalenten Bindungen mit UV-Licht:



Die Bildung des Hydroxyl-Radikals trägt hierbei wesentlich zur Schädigung des Organismus durch ionisierende Strahlung bei (*von Sonntag, 1987*). Aus thermodynamischer Sicht stellt O₂ selbst ein Radikal dar, da es über zwei ungepaarte Elektronen verfügt. Im stabilen Grundzustand haben beide Elektronen im π* 2p Orbital eine parallele Spinausrichtung. Im Verlauf einer Oxidationsreaktion mit einem nicht radikalischen Molekül, können im O₂ Molekül die zwei freien Stellen im π* Orbital jedoch nicht auf einmal besetzt werden, da hier das Pauli-Prinzip greift. Somit werden im O₂ Molekül die Orbitale nacheinander besetzt, was die relativ träge Reaktionsbereitschaft mit Nicht-Radikalen erklärt. Im Gegensatz dazu reagiert O₂ sehr schnell mit radikalischen Verbindungen über Einelektronen-Transferreaktionen. Eine weitaus reaktivere Form stellt der Singulett Sauerstoff dar, welcher ein hohes Oxidationspotenzial besitzt und direkt Proteine, DNA und Lipide oxidieren kann (*Footte, 1985*). Betrachtet man den Singulett Sauerstoff etwas genauer, so erkennt man zwei mögliche π* 2p Zustände, in denen beide eine hohe Oxidationsbereitschaft aufweisen, da hier das Spin-Kriterium nicht mehr erfüllt ist (Abb. 7) Der ¹Σ_g⁺ ist sehr instabil und zerfällt rasch in den ¹Δ_g Zustand, letzterer ist in biologischen Systemen gegenwärtig. Es sei hierbei noch zu erwähnen, dass es sich bei ¹Δ_g O₂ nicht um ein freies Radikal handelt, da es keine ungepaarten Elektronen besitzt.

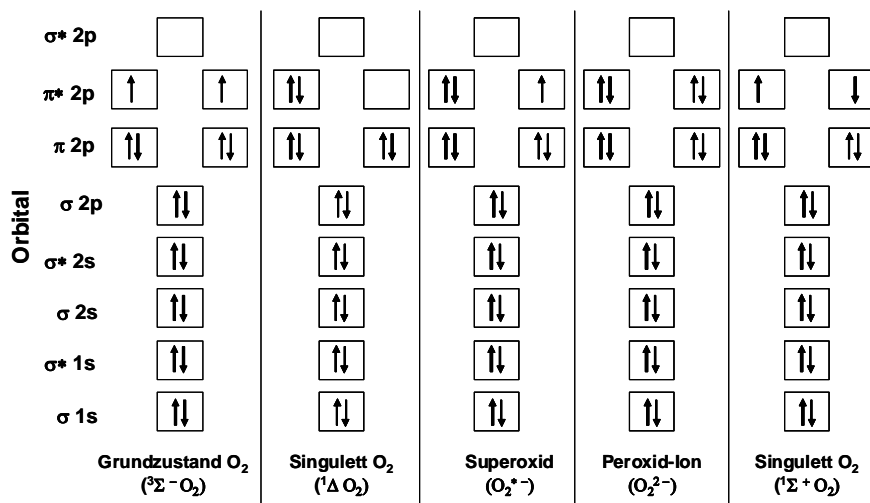
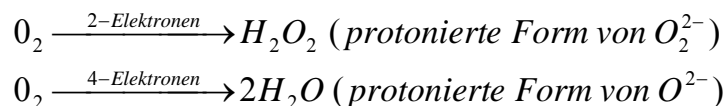


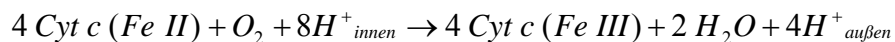
Abbildung 7: Unterschiedliche Elektronenverteilung in den Orbitalen des Sauerstoffmoleküls. Vereinfachte Darstellung, modifiziert nach (*Halliwell, 2006a*).

Die Bildung von Singulett-Sauerstoff erfolgt bei Tieren vor allem in der Haut und im Auge (*Halliwell et al. 1986*) und kann ebenfalls durch die Aufnahme photosensibilisierender Wirkstoffe aus Pflanzen wie z. B. Hypericin im Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), Fagopyrin im Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*), Psoralen in Sellerie (*Apium graveolens*) oder Furocumarine in Doldenblütern gefördert werden. Medikamente wie Fluoroquinolon Antibiotika oder Isotretinoin (Behandlung von Hauterkrankungen) können durch die gleichzeitige Einwirkung von UVA-/ UVB-Strahlung des Sonnenlichts phototoxische Reaktionen auslösen, an deren Mechanismus ebenfalls Singulett-Sauerstoff beteiligt ist

(Halliwell et al. 1986; Morison 2004). Wird dem Sauerstoffmolekül (O_2) ein Elektron zugeführt, so führt dies zur Bildung des Superoxidradikal-Anions ($O_2^{\bullet-}$), welches jedoch ein schwächeres Radikal als O_2 darstellt (Fridovich, 1995). Die Addition eines weiteren Elektrons führt zur Entstehung des sog. Peroxidions (O_2^{2-}), bei dem es sich um ein Nicht-Radikal (keine ungepaarten Elektronen) mit schwacher O-O Bindung im Molekül handelt (Tab. 3). Letztere kann über die Aufnahme weiterer zwei Elektronen aufgehoben werden und zwei Oxidionen (O^{2-}) bilden. In biologischen Systemen führt eine Zweielektronen-Reduktion von O_2 zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), eine Vierelektronen-Reduktion dagegen zwei Wassermoleküle (H_2O).



Mitochondrien sind in der Lage 95 % des aufgenommenen Sauerstoffs zu Wasser zu reduzieren. Innerhalb der mitochondrialen Atmungskette wird dieser Schritt von der Cytochrom-c-Oxidase (einem komplexen Multiprotein) durchgeführt, welches in einem katalytischen Zyklus durch Elimination von vier Elektronen aus vier Molekülen Cytochrom-c-Oxidase ein Molekül O_2 zu zwei Molekülen Wasser H_2O reduziert:



Da die Reduktion in mehreren Schritten erfolgt, können während der katalytischen Reaktion partiell reduzierte Sauerstoffspezies entstehen, die toxische Wirkungen in der Zelle entfalten können (Babcock, 1999).

Tabelle 3: Reaktive Spezies

ROS ist ein Sammelbegriff und beinhaltet, sowohl Sauerstoff-Radikale, als auch bestimmte Nicht-Radikale. Alle Sauerstoff-Radikale zählen demnach zu den ROS, was jedoch nicht bedeutet, dass alle ROS Sauerstoffradikale sind. Der Begriff Reaktive Stickstoff-Spezies (RNS) stellt ebenfalls eine kollektive Bezeichnung dar, wobei nicht alle Verbindungen gleich reaktiv sind. Zum Beispiel reagieren H_2O_2 , NO^* und $O_2^{\bullet-}$ schnell mit einigen Molekülen, wohingegen OH^* sehr schnell mit fast allem reagiert. Im Vergleich dazu, weisen Verbindungen wie RO_2^* , NO_3^* , RO^* , $HOCl$, $HOBr$, $CO_3^{\bullet-}$, $CO_2^{\bullet-}$, NO_2^* , $ONOO^-$, NO_2^+ und O_3 eine mittlere Reaktivität auf. Modifiziert nach (Halliwell, 2006a)

Freie Radikale		Nicht-Radikale	
Reaktive Sauerstoffspezies			
Superoxid	$O_2^{\bullet-}$	Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hydroxyl	OH^*	Hypobromige Säure ^a	$HOBr$
Hydroperoxyl (protoniertes Superoxid)	HO_2^*	Hypochlorige Säure ^b	$HOCl$
Carbonat	$CO_3^{\bullet-}$	Ozone ^c	O_3
Peroxyl	RO_2^*	Organische Peroxide	$ROOH$
Alkoxyl	RO^*	Peroxonitrit ^d	$ONOO^-$
Kohlendioxid-Radikal	$CO_2^{\bullet-}$	Peroxonitrat ^d	O_2NOO^-
Singulett-Sauerstoff	$O_2 \text{ } ^1\Sigma_g^+$	Singulett-Sauerstoff	$O_2 \text{ } ^1\Delta_g$

		Peroxonitrit-Säure ^d	ONOOH
		Peroxomonocarbonat	HOOCO₂⁻
Reaktive Chlorspezies			
atomares Chlor	Cl⁺	Hypochlorige Säure ^b	HOCl
		Nitryl-Chlorid ^c	NO₂Cl
		Chloramine	
		Chlorgas	Cl₂
		Bromchloride ^a	BrCl
		Chlordioxid	ClO₂
Reaktive Bromspezies			
atomares Bor	Br[*]	Hypobromige Säure	HOBr
		Bromgas	Br₂
		Bromchlorid ^a	BrCl
Reaktive Stickstoffspezies (RNS)			
Stickoxid-Radikal	NO[*]	Salpetrige Säure	HNO₂
Nitrit-Radikal ^c	NO₂[*]	Nitrosyl-Kation	NO⁺
Nitrat-Radikal ^{c, f}	NO₃[*]	Nitrosyl-Anion	NO⁻
		Distickstofftetroxid	N₂O₄
		Distickstofftrioxid	N₂O₃
		Peroxonitrit ^d	ONOO⁻
		Peroxonitrat ^d	O₂NOO⁻
		Peroxonitrit Säure ^d	ONOOH
		Nitronium-Kation	NO₂⁺
		Alkylperoxonitrite	ROONO
		Alkylperoxonitrate	RO₂ONO
		Nitrylchlorid	NO₂Cl
		Peroxoacetylnitrat ^c	CH₃C(O)OONO₂

^a HOBr und BrCl können ebenfalls als reaktive Bromspezies aufgefasst werden.

^b HOCl und HOBr werden oftmals zu den ROS gezählt.

^c Oxidierende Verbindungen, die sich in verschmutzter Luft bilden und toxisch auf Pflanzen und Tiere wirken können.

^d ONOO⁻, ONOOH und O₂NOO⁻ werden oftmals auch zu den ROS gezählt.

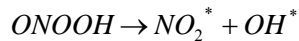
^e NO₂Cl kann auch als RNS aufgefasst werden.

^f Diese Spezies können allergene Proteine in Pollen nitrieren.

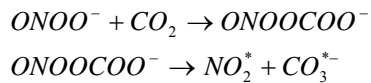
Freie Radikale können sowohl miteinander, als auch mit Nicht-Radikalen zu toxischen Endprodukten weiterreagieren. Als Beispiel sei die Bildung des Nicht-Radikals Peroxonitrit (ONOO⁻) aus den beiden Radikalen Stickoxid (NO^{*}) und Superoxid (O₂^{*-}) (*Beckman et al., 1996*).



Unter physiologischem pH-Wert erfolgt eine Protonierung des Peroxonitrits zur Peroxonitrit-Säure. Letztere hat chemisch gesehen nitrierende Eigenschaften und stellt ein starkes Oxidationsmittel dar, wodurch es direkt Proteine, Lipide und DNA zu schädigen vermag. Eine homolytische Spaltung der Säure führt ebenfalls zur Bildung noxischer Produkte:



Eine Reaktion von Peroxonitrit mit Kohlendioxid (CO_2) führt in einem zweiten Schritt ebenfalls zur Bildung radikalischer Endprodukte:



Sowohl das Stickstoffdioxid- NO_2^* als auch das CO_3^{*-} Carbonat-Radikal stellen aggressive Oxidationsmittel dar und können ebenfalls Biomoleküle schädigen. Biologische Prozesse aus denen unkontrolliert radikalische Verbindungen hervorgehen, stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit der Pathologie chronischen Erkrankungen (*Beckman et al. 1996; Halliwell et al. 1999*) auf die an anderer Stelle näher eingegangen wird.

3.5. Antioxidative Abwehrmechanismen der Zelle

Im Schutz der Zelle vor oxidativem Stress bietet die transkriptionelle Aktivierung von antioxidant response element (ARE) abhängigen Genen (Abb. 8), möglicherweise den wichtigsten Mechanismus zur antioxidativen Abwehr (*Favreau et al. 1995; Huang et al. 2000; Nguyen et al. 2000*). Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 für die ARE abhängige Aktivierung verantwortlich ist. Nrf2 ist in fast allen Zellen und Geweben exprimiert und zählt zu der Familie der sogenannten Cap'N collar (CNC) basic leucine zipper Proteine (*Gupta et al. 1997; Klaunig et al. 2004*). Vergleichende Untersuchungen an genetisch veränderten Nagetiermodellen (Nrf2^{+/+} und Nrf2^{-/-}) haben gezeigt, dass zahlreiche Gene durch Nrf2 reguliert werden, darunter auch jene, die für die Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind (Tab. 4). Unter diesen Genen zählen z. B. die γ -GCL, NQO1, GST, Aldehyd Dehydrogenase (ADH), GPX, GSR, Peroxiredoxin I (PrxI), SOD, KAT, HO-1 und Thioredoxin (*Fridovich 1986*).

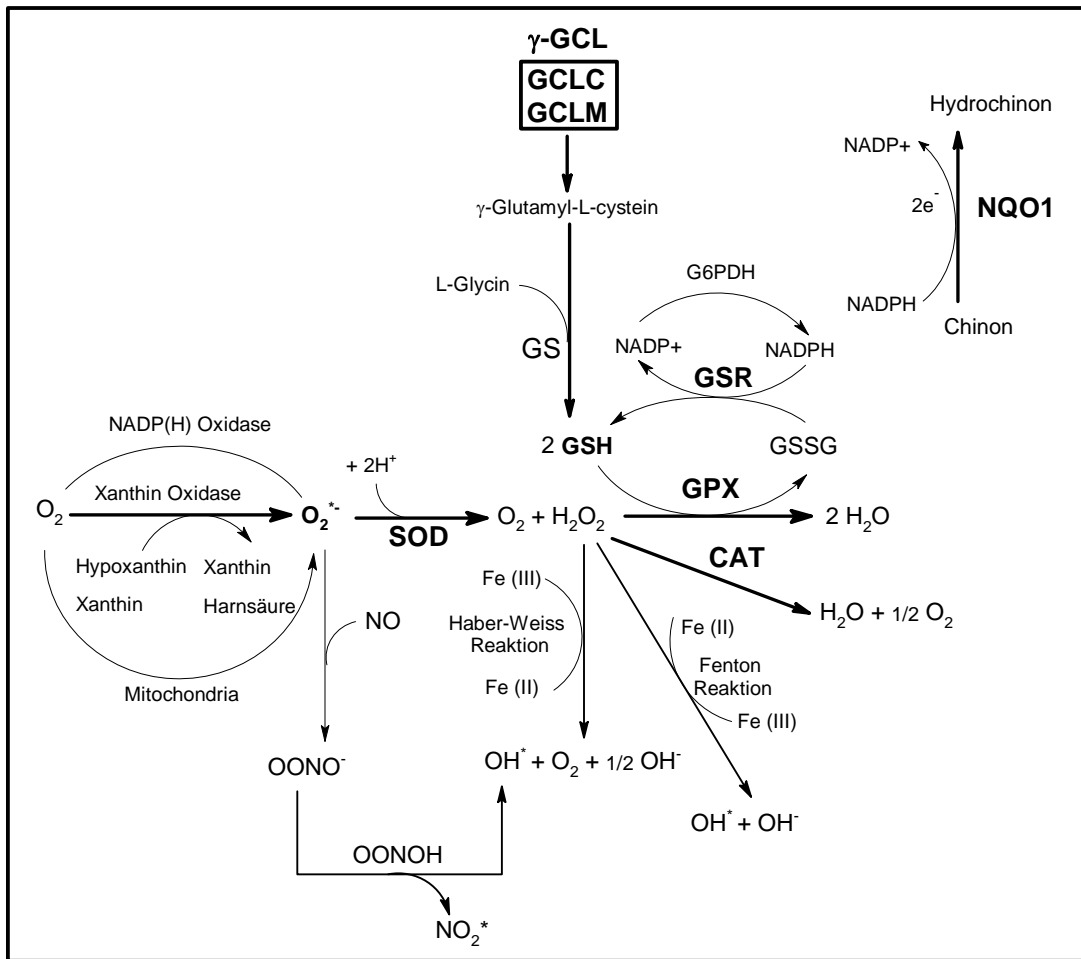


Abbildung 8: Antioxidative Abwehrmechanismen in Säugetierzellen
(modifiziert nach *Halliwell et al. 2006*)

Weiterhin zählen Enzyme wie Glucose-6-Phosphat dehydrogenase, als auch Fremdstoff metabolisierende Enzyme wie Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP450), Chaperone und Stress Response Proteine zu den Nrf2 gesteuerten Enzymen (*Thimmulappa et al. 2002; Kwak et al. 2003*). Die Stabilität und subzelluläre Lokalisation von Nrf2 wird hierbei durch das Aktin bindende kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) reguliert (*Itoh et al. 2003; McMahon et al. 2003*). Die Trennung des Keap-Nrf2 Komplexes durch oxidativen Stress, führt zur Akkumulation von Nrf2 im Zellkern, wo es mit sogenannten kleinen v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian) (Maf) Transkriptionsfaktoren assoziiert und die ARE abhängige Genexpression aktiviert. Verbindungen die unmittelbar ROS generieren, wie z. B. Metallionen (*He et al. 2006, 2007*), oder indirekt durch pathologische Erkrankungen, wie z. B. Arteriosklerose, Diabetes, chronisches Nierenversagen, Präeklampsie und Krebs, können eine Aktivierung letztgenannter Transkriptionsfaktoren bewirken (*Mann et al. 2007; Siow et al. 2007*). Neben direkter ROS vermittelter Induktion, bietet die Aktivierung von Nrf2 durch pflanzliche Inhaltsstoffe aus Lebensmitteln ein präventives Potential, da diese Signale unmittelbar die antioxidative Aktivität der Zelle erhöhen (*Chen et al. 2004; Surh et al. 2005*). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass phenolische Lebensmittelinhaltsstoffe wie z. B. Epigallocatechingallat (EGCG) und Resveratrol, sowie Inhaltsstoffe aus Gewürzen (Capsaicin, Curcumin) Signale pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, AP-1 und β -

Catenin-TcF hemmen können. Dies erfolgt primär durch die Wechselwirkung mit übergeordneten Signalwegen (IKK Phosphorylierung, MAPK Phosphorylierung und PI3K/Akt Phosphorylierung). Parallel hierzu werden pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL, PGE2 und NO, sowie die Aktivität pro-inflammatorischer Enzyme (Cox-2, iNOS) reduziert (**Kundu et al. 2005**). Im Hinblick von Cox-2 geht eine Hemmung durch sogenannte non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDS) mit einem verringerten Dickdarmkrebsrisiko einher (**Chia et al. 2006; Stange 2006**). Im Gegensatz dazu erfolgt die Induktion detoxifizierender Enzyme, durch eine Aktivierung von Nrf2. Typische Vertreter aus Lebensmitteln die eine Nrf2 Induktion bewirken sind Tee-spezifische Phenole, Isothiocyanate (Sulforaphan) (**Kong et al. 2001**), Curcumin (**Kang et al. 2007**) und Flavonoide (**Gonzalez-Gallego et al. 2007; Tanigawa et al. 2007**). Allerdings sind die molekularen Mechanismen zur Wirkung von pflanzlichen Inhaltsstoffen auf die Nrf2 Signaltransduktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass das direkte Abfangen von ROS in eine Herunterregulierung bestimmter Transkriptionsfaktoren resultiert. Bezüglich Nrf2 konnte z. B. gezeigt werden, dass Sulforaphan und synthetische Alkylantien spezifische Cysteinreste (freie Sulfhydrylgruppen) im Keap1 Protein modifizieren und damit eine Nrf2 Induktion stimulieren (**Wakabayashi et al. 2004; Egger et al. 2005**). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine Nrf2 Aktivierung auch aufgrund einer ROS Bildung durch phenolische Verbindungen erfolgt, hierbei ist jedoch die ROS Konzentration entscheidend. Dieser kritische Aspekt findet seit einigen Jahren stets Beachtung, seit prooxidative Effekte polyphenolischer Verbindungen in vitro bekannt geworden sind (**Halliwell et al. 2003; 2005; 2007**).

Tabelle 4: Auswahl ARE abhängiger Gene; modifiziert nach **Moskaug et al., 2004**.

Enzym	Human NCBI Ref Seq	Referenz
NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (NQO1)	NM_000903	(Favreau et al. 1995)
Glutathion S-Transferase Ya (GSTYa)	NM_000853	(Rushmore et al. 1990)
Thioredoxin	NM_003329	(Kim et al., 2001)
Heme Oxygenase 1 (HO-1)	NM_002133	(Inamdar et al. 1996)
Ferritin	NM_177478	(Tsuji et al., 2000)
γ -Glutamylcystein Ligase: katalytische Untereinheit (GCLC)	NM_001498	(Mulcahy et al. 1995)
γ -GlutamylcysteinLigase: modulatorische Untereinheit (GCLM)	NM_002061	(Moinova et al.1998)
Metallothionein 1A	NM_005946	(Ren et al. 1995)
Induzierbare Nitritoxid Synthase (iNOS)	NM_000625	(Kuo et al. 2000)
Glutathionreduktase (GSR)	NM_000637	(Harvey et al., 2009)
Glutathionperoxidase 2, gastrointestinal (GPX2)	NM_002083	(Banning et al. 2005)
Superoxiddismutase 1 (SOD1)	NM_000454	(Zhu et al. 2005)
Katalase (KAT)	NM_001752	(Zhu et al. 2005)
nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)	NM_006164	(Moi et al. 1994)

3.5.1 Das Antioxidant Response Element (ARE)

Die Induktion von antioxidativen Enzymen ist ein wichtiger Bestandteil der zellulären Antwort auf oxidativen Stress und erfolgt u.a. durch elektrophile Verbindungen wie ROS oder freie Radikale. Sie dient der Zelle zum Schutz vor Schädigung von Biomolekülen wie Proteine, Lipide, DNA, RNA und der Zellmembran. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die transkriptionelle Aktivierung des sogenannten Antioxidant Response Elements (ARE). Hierbei handelt es sich um eine spezifische DNA-Promoter Bindungsstelle, welche als Cis-Element die Konsensus Sequenz 5'-(G/A)TGA(G/C)NNNGC(G/A)-3' besitzt und in der 5'-Flankierenden Region einer Vielzahl von Genen lokalisiert ist (**Rushmore et al. 1991**). Die transkriptionelle Aktivierung des ARE-Elements kann durch verschiedene chemische Verbindungen wie elektrophile Michael-Akzeptoren, Diphenole, Chinone, Isothiocyanate, Peroxide, Mercaptane, Schwermetalle, Dithiolethione und trivalente Arsenverbindungen induziert werden (**Prester et al. 1993**). Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an der NQO1 und GST haben gezeigt, dass eine Vielzahl potentieller ARE induzierender Verbindungen sich durch eine hohe Reaktivität mit Sulfhydryl-Gruppen auszeichnen und mit diesen über Oxidation oder Alkylierung reagieren können (**Prochaska et al. 1988**). Zelluläre Proteine mit freien Sulfhydrylgruppen könnten somit als molekulare Sensoren für verschiedene Induktoren dienen, die folglich zu einer Aktivierung des ARE-Elements führen. Yamamoto et al. stellten fest, dass für die Signaltransduktion und transkriptionelle Regulation des ARE-Elements hauptsächlich der Transkriptionsfaktor Nrf2 und das Keap1, welches über endständige Cystein-Gruppen verfügt, verantwortlich sind (**Itoh et al. 1999**).

Eine adequate Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien ist essentiell für die Funktion des zellulären Redoxpotentials. Diese Balance wird jedoch kontinuierlich durch extrinsische Faktoren wie z.B. erhöhte ROS-Level oder oxidierende Verbindungen gestört. Nrf2 stellt daher für die antioxidative Abwehr ein wichtiges funktionelles Protein in Säugetierzellen dar. Aufgrund der relativ hohen Instabilität und Umsatzrate von Nrf2, findet im homeostatischen Zustand eine kontinuierliche Ubiquitinierung durch das Holoenzym Cul3-Rbx1 E3 Ligase statt. Dies führt folglich zu einem Abbau von Nrf2 durch das 26S Proteasom und ermöglicht die Aufrechterhaltung konstant niedriger Proteinlevel im unstimulierten Zustand. Ist die Zelle oxidativen Stress ausgesetzt wird dieser Regelkreis entkoppelt, so dass dies schnell in einer Repletion von Nrf2 und damit verstärkter Transaktivierung ARE abhängiger Zielgene resultiert. An Nrf2 knockout (K.O.) Mäusen konnte eine deutliche Dysregulation der antioxidativen Abwehr und veränderte Sensitivität gegenüber toxischen Effekten durch ROS beobachtet werden. K.O. Mäuse die kurzzeitig Hyperoxie, Zigarettenrauch oder Butylhydroxyanisol (BHA) ausgesetzt wurden, zeigten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Lungenschäden (**Chan et al. 1999**). Es ist darüber hinaus bekannt, dass diese Mäuse eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Krebs aufweisen. Interessanterweise führt ein knockout des zellulären Nrf2 Ankerproteins Keap1 in der Mausleber, zu einer höheren Resistenz von Mäusen gegenüber akuter Acetaminophen Vergiftung. Dies wird mit einer konstitutiven Aktivierung der Nrf2 Expression in der Leber erklärt (**Okawa et al. 2006**). In normalen Zellen stellt die akute Aktivierung von Nrf2 einen

effizienten Schutz vor bestimmten mutagenen Läsionen im Erbgut dar. Für prä-maligne Zellen kann eine permanent abberante Nrf2 Aktivierung jedoch ein Überlebensvorteil darstellen. Insbesondere wenn sich diese Zellen in einer Umgebung mit erhöhtem ROS-Level entwickeln, wie es z.B. für einige Tumorzellen der Fall ist (*Farber et al. 1990*).

3.5.2 Rolle von Nrf2 bei der ARE vermittelten Genexpression

Auf erhöhten zellulären oxidativen Stress kann die Zelle unmittelbar mit der Freisetzung bestimmter Transkriptionsfaktoren der sogenannten Helix-Loop-Helix basic leucine zipper (bZIP)-Familie, wie z.B. NFKB repressing factor (Nrf), jun oncogene (Jun), v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (Fos), FOS-like antigen 1 (Fra), v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian) (Maf) und des Ah-Rezeptors antworten. Nach Heterodimerisierung im Cytosol mit Transkriptionsfaktoren wie MafG werden diese in den Zellkern transloziert, wo sie an die ARE-Sequenz binden und die Transkription von detoxifizierenden Enzymen induzieren können (*Hayes et al. 2009*). In Studien mit Nrf2 defizienten Mäusen, konnte erstmals die essentielle Bedeutung von Nrf2 für die ARE vermittelte Genexpression gezeigt werden (*Itoh et al. 1997*). Nrf2 ist ein Protein von 66 kDa und wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Regulierung der Globin Genexpression in haematopoetischen Zellen nachgewiesen, die durch ein NFE2-DNA bindendes Motif gesteuert wird und mit Nrf2 in Wechselwirkung steht (*Moi et al. 1994*). Es zeigte sich, dass Nrf2 defiziente Mäuse zwar ein normales Wachstum aufwiesen und Nrf2 somit für die Entwicklung, Erythropoese und das Wachstum nicht unbedingt essentiell zu sein schien. Jedoch stellte sich schnell heraus, dass in Nrf2 defizienten Mäusen eine Induktion von Genen zur Detoxifizierung von Karzinogenen und zum Schutz vor oxidativen Stress nicht mehr möglich war (*Thimmulappa et al. 2002*). Eine Deletion des Nrf2 Gens bei Mäusen führte damit zu einer starken Abnahme des basalen Genexpressionslevels antioxidativer Enzyme, insbesondere der γ -GCL (*Chan et al. 2001*). Nrf2 defiziente Mäuse zeigten zusätzlich eine höhere Zahl an Tumoren des Vormagens nach Exposition mit dem ultimativen Kanzerogen Benzo[a]Pyren. Die Funktion von Nrf2 wird mehr durch die intrazelluläre Verteilung kontrolliert, als durch die Induktion der Neusynthese des Transkriptionsfaktors (*Numazawa et al. 2004*). Hierbei spielt das Keap1 Protein eine entscheidende Rolle. Das Keap1 Protein hat ein Molekulargewicht von 66 kDa, ist cytoplasmatisch an Actin gebunden und homolog zum Drosophila Actin-bindenden Protein Kelch (*Itoh et al. 1999*). Das Keap1 Protein ist in fünf wichtige Domänen gegliedert (Abb. 9), welche die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 regulieren.

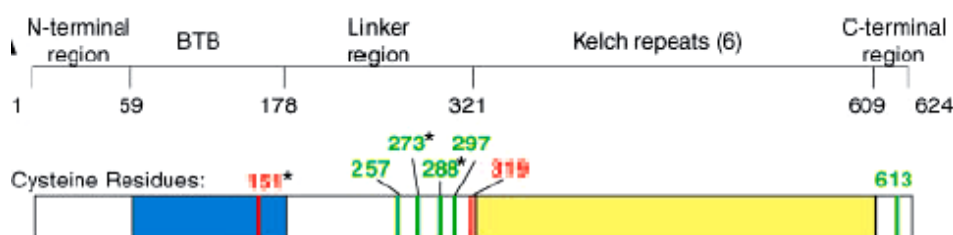


Abbildung 9: Primäre Aminosäuresequenz des humanen und Maus Keap1 Proteins, nach (*Egglar et al. 2005*). grün: Cysteinreste in Maus Keap1; rot: weitere Cystein Gruppen C151 und C319 in humanem Keap1

Aufbau der Domänen:

1. Die N-terminale Region (NTR)
2. Eine BTB-Domäne (Broad-Complex Tramtrack und Bric a Brac), die ein sogenanntes Protein-Protein-Interaktionsmotiv darstellen und im Laufe der Evolution konserviert wurden. Diese Motive finden sich in vielen Actin-bindenden Proteinen, sowie bei Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, die an der Bildung von Komplexen mit anderen BTB-Domänen beteiligt sind.
3. Eine besonders cysteinreiche Intervening Region (IVR),
4. einen double Glycin oder Kelch repeat (DGR), die sechs Kelch Motive beinhaltet und
5. eine C-terminale Region (CTR) (*Dinkova-Kostova 2002; 2007*)

Die Kelch Repeat Motive von Keap1 bilden eine sogenannte x-Propeller Struktur aus und binden an die Neh2 Domäne von Nrf2. Unter normalen zellulären Bedingungen wird Nrf2 im Cytoplasma an Keap1 gebunden und zurückgehalten, wobei eine Unterbrechung von Keap1 zum Verlust dieser Funktion führt (*Zipper et al. 2002*). Nrf2 wird demnach durch die Wechselwirkung mit der Kelch Repeat Domäne von Keap1 und der Neh2 Domäne von Nrf2 im cytoplasmatischen Kompartiment zurückgehalten (*Kang et al. 2004; Katoh et al. 2005*).

3.5.3 Regulation der Nrf2-Keap1 Wechselwirkung

Die Behandlung von Zellen mit ARE induzierenden Verbindungen führt zur Dissoziation von Nrf2 und Keap1, wodurch Nrf2 in den Zellkern transloziert, mit kleinen Maf-Proteinen heterodimerisiert und an die ARE-Sequenz bindet. Dies resultiert in einer transkriptionellen Regulierung von bestimmten Zielgenen (*Numazawa et al. 2004*). Das Keap1 Protein in Nagern enthält 25 Cystein-Reste und ist homolog zu dem des Menschen (*Dinkova-Kostova et al. 2002; 2005*). Verbindungen die eine Induktion von detoxifizierenden Enzymen induzieren, reagieren möglicherweise mit freien Thiol-Gruppen der Cystein-Reste über Oxidation oder kovalente Modifizierung, so dass eine Modifikation der freien SH-Gruppen von Keap1 bzw. Nrf2 oder auch von beiden Proteinen eine Dissoziation des Nrf2-Keap1-Komplexes bewirkt (Abb. 10). In Experimenten mit Fusionsproteinen konnten Dinkova-Kostova et al. zeigen, dass antioxidative Verbindungen schneller mit Keap1 reagieren als mit Nrf2. Dies lieferte den direkten Beweis, dass Cystein-Reste von Keap1 einen molekularen Sensor für den intrazellulären Redoxstatus darstellen und hierdurch die gezielte und zeitliche Expression von Genen zur antioxidativen Abwehr von elektrophilen Verbindungen in der Zelle steuern (*Dinkova-Kostova et al. 2002; 2005*). Eine zusätzliche Stabilität des Nrf2-Keap1-Komplexes erfolgt durch die beiden Cystein Gruppen (C273 und C288) in Keap1 (*Zhang et al. 2002*). Verbindungen die eine Induktion ARE regulierter Gene auslösen, reagieren somit bevorzugt mit freien Thiol-Gruppen von Cysteinresten in der Intervening Region (IVR) von Keap1 durch kovalente Modifizierung oder Oxidation. Dies führt zu Konformationsänderungen von Keap1, wodurch das Protein nicht mehr in der Lage ist Nrf2 zu binden und es zur Translokation von Nrf2 kommt (*Wakabayashi et al. 2004*). Das Nrf2 Protein besitzt in unstimulierten Zellen eine relativ schnelle endogene Umsatzrate, mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 10 bis 30 Minuten und kann nach Freisetzung

durch eine Cullin3-abhängige E3-Ligase über den Ubiquitin-proteosomalen Weg abgebaut werden (*Stewart et al. 2003*). Dies konnte bereits für andere transkriptionellen Regulatoren wie c-Jun, p53, und Ikb α beobachtet werden (*Pahl et al., 1996*). Im Falle einer Stimulation der Zelle, kommt es zur Freisetzung des im Cytosol gebundenen Nrf2 Proteins, das zusätzlich gegen einen proteosomalen Abbau stabilisiert wird (Abb.11). Zwar unterliegt das freigesetzte Nrf2 ebenfalls einem proteosomalen Abbau, doch wird im stimulierten Zustand die Umsatzrate in der Zelle signifikant reduziert (*Itoh et al. 2003*). Dies weist auf eine Regulierung des Nrf2 Protein Umsatzes durch die Keap1 vermittelte intrazelluläre Kompartimentierung hin.

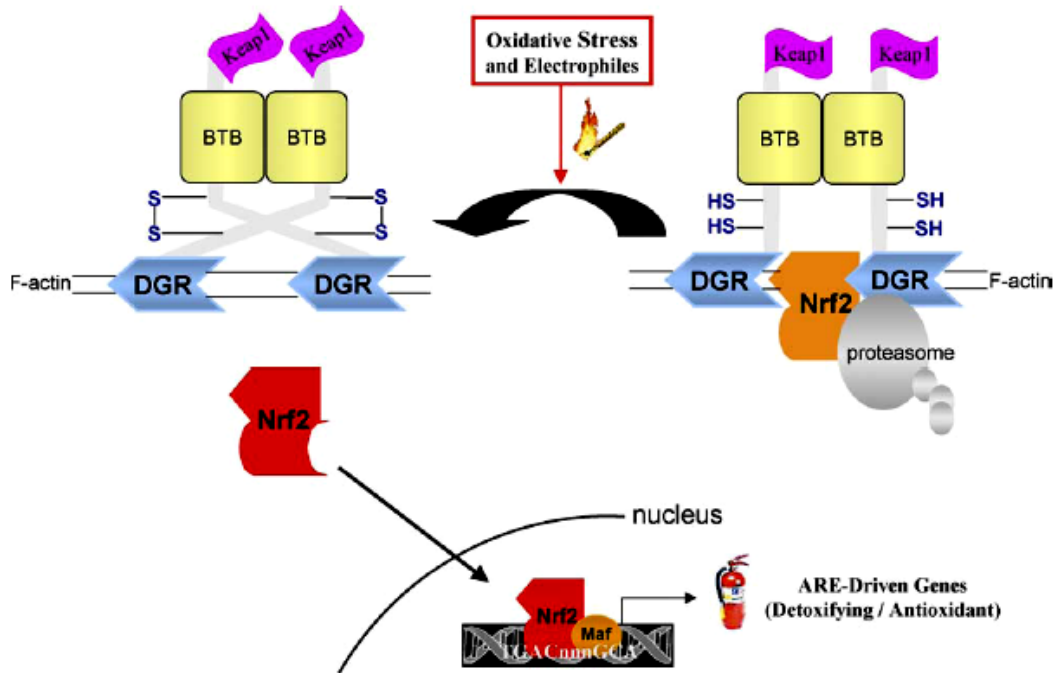


Abbildung 10: Mechanismus der Nrf2-Keap1-Wechselwirkung (*nach Lee et al. 2005*)

Nrf2 wird durch die Wechselwirkung mit zwei Molekülen Keap1 im Cytoplasma sequestriert. Im unstimulierten Zustand sind beide Keap1-Proteine durch ihre BTB-Domäne miteinander dimerisiert und über die Kelch bzw. DGR-Region mit F-Actin an das Cytoskelett verankert. Die Oxidation von Thiol-Gruppen der Cystein-Reste in der Intervening Region (IVR) des Keap1 Proteins führt zur Bildung von Disulfidbrücken (bevorzugt zwischen C 273 und C 288). Dies resultiert in einer Konformationsänderung von Keap1, wodurch die Bindung zu Nrf2 aufgehoben und dessen Translokation in den Zellkern induziert wird (*Manson et al. 2000; Stewart et al. 2003*).

3.5.4 Regulation von Nrf2 durch Upstream Signalwege

Der Nrf2-Keap1-ARE-Signalweg kann außer durch direkte Oxidation oder kovalente Modifikation der Thiol-Gruppen von Keap1 noch zusätzlich durch eine post-transkriptionelle Modifikation von Nrf2 moduliert werden (Abb. 11). Hierfür sind verschiedene Kinasen, wie z.B. die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC), c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) und Extracellular Signal-regulated Protein Kinase (ERK) verantwortlich. Diese Kinasen phosphorylieren bevorzugt Serin und Threonin Seitenketten von Nrf2, wodurch ebenfalls eine Freisetzung von Nrf2 erfolgt und Letzteres in den Zellkern transloziert. Eine weitere Kinase die

p38 Mitogen activated Protein (MAP) Kinase ist je nach Zelltyp in der Lage die Nrf2-Keap1 Dissoziation zu stimulieren oder gar zu hemmen (*Balogun et al. 2003*). In Experimenten mit zellfreien Systemen konnten Huang et al. zeigen, dass Nrf2 durch die Protein-Kinase C (PKC) direkt an Serin 40 phosphoryliert wird und dadurch von Keap1 dissoziiert (*Huang et al. 2002; Nguyen et al. 2003; Numazawa et al. 2004*). In Zellen bei denen durch Behandlung mit tert-Butylhydroquinon (tBHQ) (*Lee et al. 2001*), Peroxynitrit (*Kang et al. 2002*) und Hemin (*Nakaso et al. 2003*) oxidativer Stress ausgelöst wurde, konnte eine Aktivierung von Nrf2 über PI3K beobachtet werden. Der durch PI3K vermittelte Signalweg zur antioxidativen Antwort führt zur Depolymerization von Actin-Mikrofilamenten, wodurch eine Freisetzung und Translokation von Nrf2 in den Zellkern erfolgt (*Kang et al. 2007*). Eine Inhibierung dieser Kinasen führte sowohl in Ratten-Lebertumorzellen, als auch in humanen Neuroblastomzellen zu einer Hemmung der ARE vermittelten transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen (*Kang et al. 2000; Lee et al. 2001*). MAP-Kinasen wie ERK, JNK und p38 sind ebenfalls an der ARE Aktivierung beteiligt. Yu et al. berichten, dass eine Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs in der humanen Lebertumorzelllinie HepG2 zu einer ARE vermittelten Genexpression über den Nrf2 abhängigen Mechanismus führt, wohingegen die p38 MAP-Kinase einen hemmenden Effekt zeigt (*Yu et al., 2000*). Weitere Experimenten zeigten, dass noch andere Faktoren wie z.B. Co-Aktivatoren der p160 Familie, sowie ein sogenanntes cyclic AMP-Response element binding protein (CBP)/p300 in der Lage sind mit dem Nrf2-Maf-ARE-Komplex in Wechselwirkung zu treten, so dass es zu einer verstärkten Transaktivierung von Nrf2 kommt (*Itoh et al. 1997; Katoh et al. 2001; Zhu et al. 2005*). In einer weiteren Studie von Shen et al. konnte gezeigt werden, dass es durch den ERK und JNK-Signalweg zur Auslösung von Co-Aktivatoren kommt, die an den Transkriptions-Initiations-Komplex binden und die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 induzieren (*Shen et al. 2004, 2009*).

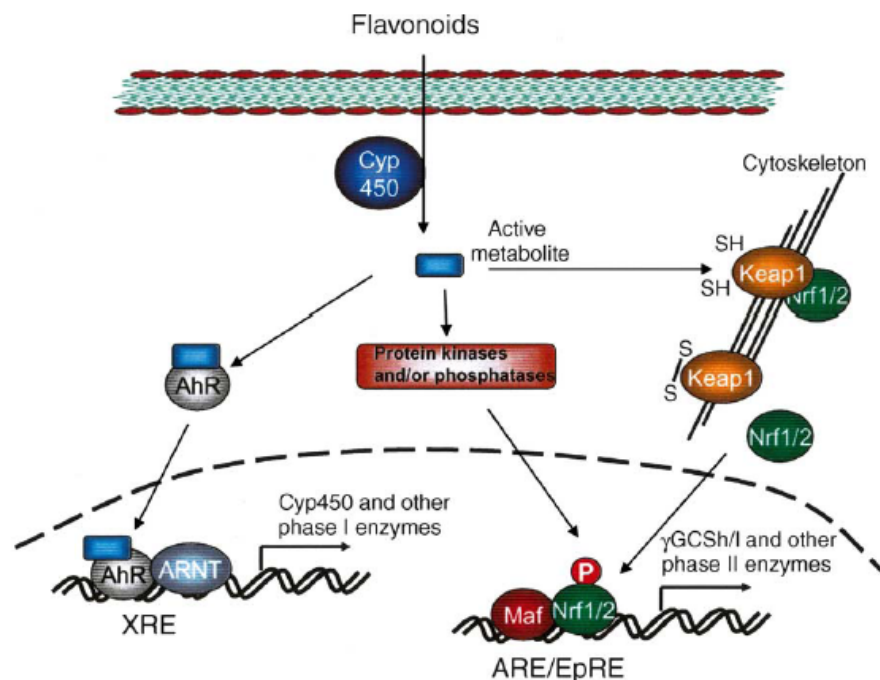


Abbildung 11: Zelluläre Effekte von Flavonoiden, nach *Moskaug et al., 2004*.

Keap1 besitzt eine bestimmte Anzahl von Cystein-Resten mit freien Thiol-Gruppen. Eine Veränderung im zellulären Redox-Gleichgewicht in Richtung eines prooxidativen Status führt zur Oxidation der freien

Thiol-Gruppen an den Cystein-Seitenketten und somit zur Dissoziation des Nrf2-Keap1-Komplexes. Nrf2 transloziert in den Zellkern und bindet an die regulatorische ARE-Sequenz von redoxsensitiven Genen. In ähnlicher Weise führt eine kovalente Modifikation von Cystein-Resten an Keap1 durch elektrophile Verbindungen zur stimulierten Freisetzung von Nrf2. Nach Translokation in den Zellkern heterodimerisiert Nrf2 mit kleinen Maf- Proteinen (MafG, MafK), großen Maf-Proteinen (c-Maf) oder anderen bZIP-Proteinen wie z.B. ECH, c-Fos, Fra1, p45-NF-E2, Bach1 und Bach2 (*Kang et al., 2000*). Nach Aufnahme in die Zelle, können aktive Metabolite der Flavonoide an den Aryl Hydrocarbon Rezeptor binden und die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme aktivieren. Ein weiterer möglicher Mechanismus erfolgt über die Modulation der Proteinkinase Aktivität, oder Beeinflussung des Keap1-Nrf2 Komplexes im Cytosol (*Moskaug et al., 2004*).

Das ARE/EpRE reagiert auf bis zu neun strukturell unterschiedlichen Klassen von Induktoren (*Manson et al., 2000*). Talalay et al. konnten zeigen, dass hierfür molekulare Sensoren verantwortlich sind, welche mit reaktiven Cystein-Gruppen ausgestattet sind (*Talalay et al., 2003*). Diese Cystein Thiol-Gruppen erkennen elektrophile Verbindungen in der Zelle auch noch in Gegenwart von millimolaren Konzentrationen an Glutathion. Die vier Cystein-Reste (C 257, C 273, C 288, C 297) in der Intervening Region von Keap1 werden bevorzugt von elektrophilen Substanzen modifiziert, was schließlich in einer Ablösung aus der Neh2-Domäne von Nrf2 resultiert (*Dinkova-Kostova et al. 2005; 2007*). Da die Neh2-Domäne jedoch keine Cystein-Gruppen enthält, erfolgt die Modifikation somit nur an Keap1. Insbesondere C 273 und C 288 scheinen kritisch auf Elektrophile zu reagieren, was in mehreren Mutationsexperimenten mit veränderten C 273 und C 288 Gruppen gezeigt werden konnte. Eine Modifikation dieser beiden Cystein-Reste führt schließlich zur Disruption von Nrf2 (*Zipper 2002; McMahon et al. 2003*). Die Aktivierung des ARE/ EpRE stellt einen wichtigen molekularen Mechanismus zur Regulierung der zellulären antioxidativen Abwehr von oxidativem Stress dar. Ein weites Spektrum an natürlichen und synthetischen Verbindungen zeigen dabei präventive Eigenschaften und sind als potentielle Induktoren der ARE regulierten Genexpression bekannt. Beispiele hierfür sind vor allem polyphenolische Verbindungen (Quercetin, EGCG), Oltipraz, Anethol Dithiolethione (ADT), 6-(Methylsulphonyl) hexyl Isothiocyanat (6-HITC), t-Butyl Hydroxyanisol (BHA), Curcumin, Kaffeesäure-Phenylethylester (CAPE), 4'-Bromoflavon und Sulforaphan.

3.5.5 Glutathion

Glutathion (L-Gamma-glutamyl-L-cysteinyl-glycin) (Abb.12) ist ein nichtenzymatisches Tripeptid, kommt ubiquitär in den meisten Pflanzen, Mikroorganismen, sowie in allen tierischen Geweben vor und kann intrazellulär hohe Konzentrationen erreichen. Der GSH Spiegel beim Menschen variiert je nach Organ und Gewebe im Bereich von 0,1-10 mM mit der höchsten Konzentration von bis zu 10 mM in der Leber und insbesondere im Gehirn, der Milz, Augenlinse, Erythrozyten und Leukozyten (*Bremer, 1981*). Plasma GSH Spiegel liegen dagegen im mikromolaren Bereich (~ 4,5 µM) (*Chawla et al., 1984*). Das Enzym Glutathionreduktase erhält bis zu 98 % des zellulären Glutathions in reduzierter Form aufrecht, der Rest liegt als gemischtes Disulfid (hauptsächlich als GSS-Protein), oxidiertes Disulfid (GSSG) oder Thioether vor (*DeLeve et al. 1991*). In eukaryotischen Zellen existieren drei Hauptreservoirs für GSH. Fast 90 % des zellulären GSH befindet sich im Zytosol, 10% in den Mitochondrien und ein geringer

Anteil im endoplasmatischen Retikulum (ER) (*Meister 1988*). Im ER ist GSH an die Bindung von Proteinen über die Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt, hier ist ein GSH/GSSG Verhältnis von 3:1 (*Hwang et al. 1992*) üblich. Im Zytoplasma und Mitochondrien wird dagegen sogar GSH/GSSG Verhältnisse $> 10:1$ beobachtet (*Meredith et al. 1982; Meister 1988*). Untersuchungen an der Rattenleber zeigen, dass zytosolisches GSH sehr schnell umgesetzt wird, mit einer Halbwertszeit von 2-3h. Die normale Umsatzrate beim erwachsenen Menschen beträgt etwa 40 mmol/ Tag und liegt damit geringfügig höher als der Cysteinsatz des körpereigenen Proteinpools (*Storch et al. 1988*).

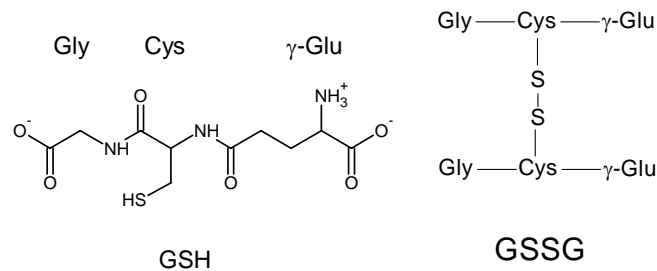
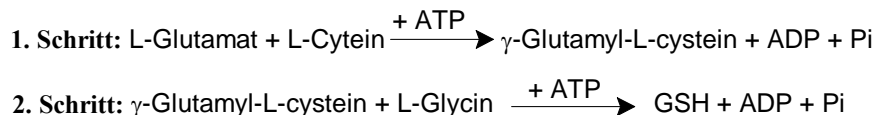


Abbildung 12: Struktur von Glutathion (GSH) und GSSG

Das amino-terminale Glutamat und Cysteine sind über die γ -carboxy Gruppe des Glutamats miteinander verbunden.

Die GSH Neusynthese findet aus den entsprechenden Vorläufer-Aminosäuren (L-Glutamat, L-Cystein und L-Glycin) in nahezu allen Zellen statt und erfolgt dabei in zwei ATP abhängigen enzymatischen Schritten:



Der erste Schritt der GSH-Synthese ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion und wird durch das Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCS) katalysiert, für dessen katalytische Funktion Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor benötigt wird. Die γ -GCS ist ein Heteroenzym, aufgebaut aus einer schweren, katalytischen Untereinheit (GCLC, Mr ~ 73 kDa) und einer leichten, modulatorischen Untereinheit (GCLM, Mr ~ 30 kDa). Beide Untereinheiten werden in Mensch und Ratte über unterschiedliche Gene codiert (*Yan et al. 1990; Gipp et al. 1995*). Unter nicht-denaturierenden Bedingungen (z. B. durch die Behandlung mit Dithiothreitol) dissoziiert das Enzym in beide Untereinheiten, hierbei behält die GCLC weiterhin ihre volle Aktivität im Vergleich zum isolierten Holoenzym und verfügt ebenfalls über die Eigenschaft der sog. Feedback-Hemmung durch GSH (Abb. 16) (*Seelig et al., 1984*). Dennoch unterscheidet sich die GCLC in ihrer katalytischen Aktivität durch einen höheren Km-Wert (18,2 mM) für Glutamat, verglichen mit dem des Holoenzym von 1,4 mM und einen niedrigeren Ki-Wert für GSH (1,8 versus 8,2 mM, physiologischer Level) (*Huang et al. 1993*). Für diesen wichtigen Aktivitätsunterschied von GCLC und dem Holoenzym ist vor allem die Beteiligung der modulatorischen Untereinheit GCLM verantwortlich. Infolgedessen besitzt das Holoenzym sowohl eine höhere katalytische Effizienz, als auch eine schwächere Affinität zur Feedback-

Hemmung durch das GSH Molekül selbst. In diesem Zusammenhang ist bisher noch nicht geklärt, ob GCLC alleine physiologische Aktivität entfalten kann. Die γ -GCS zeigt hohe Spezifität gegenüber der γ -Glutamyl-Einheit und kann diese an eine bestimmte Aminosäure-Brücke (Lys 38) von GCLC binden (**Chang, 1996**). Der zweite Schritt der GSH-Synthese erfolgt über die Glutathionsynthetase. Im Vergleich zur γ -GCS wurde die GS bisher nicht so intensiv untersucht, die Isolierung und Aufreinigung aus der Niere von Ratten zeigt jedoch dass das Enzym ein Molekulargewicht (Mr) von etwa 118 kDa besitzt und aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut ist (**Oppenheimer et al., 1979**). Untersuchungen zur Substratbindung und Charakterisierung der Bindungsstellen haben gezeigt, dass die aktive Bindungsregion hoch spezifisch auf die Bindung von Glycin mit der Cystein-Einheit des γ -Glutamyl-cysteins ausgerichtet ist. Der L- γ -Glutamyl-Rest hingegen kann durch analoge Gruppen ersetzt werden, diese Bindungsregion erscheint daher nicht spezifisch. Die GS wurde bereits aus der Rattenniere kloniert und Studien zeigen, dass das Enzym im Gegensatz zur γ -GCS keine Ausstattung zur Feedback-Hemmung durch GSH verfügt. Untersuchungen am entsprechenden Weizenprotein zeigen, dass die GS weder für das Wachstum, den physiologischen Normalzustand, noch bei erhöhtem oxidativen Stress erforderlich ist. Letzterer wird wiederum durch die Akkumulation von γ -Glutamylcystein verringert (**Grant et al., 1997**). Dagegen führt eine Überexpression der GS nicht zu höheren GSH Werten, was bei der γ -GCS durchaus der Fall ist. Dennoch hat die GS Defizienz beim Menschen pathologische Folgen für den Metabolismus, da das hierdurch angereicherte γ -Glutamylcystein in 5-Oxoprolin umgewandelt wird und zu einer schweren metabolischen Acidose führen kann (**Huang et al., 1995**).

Schließlich verläuft die Regulierung der γ -GCS bei Mensch und Ratte auf physiologischer Ebene und kann über zwei wesentliche Mechanismen erfolgen:

1. Kompetitive Feedback-Hemmung durch GSH (**Misra et al. 1998**).

Die Hemmung durch GSH erfolgt nicht-allosterisch und über eine gleichzeitige Bindung von GSH an die Glutamat-Bindungsstelle und einer weiteren Position im Enzyms (Abb. 13). Durch letztere Bindung findet wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit der Thiolgruppe des GSH statt, woran jedoch Methylgruppen nicht beteiligt sind (**Huang et al., 1988**).

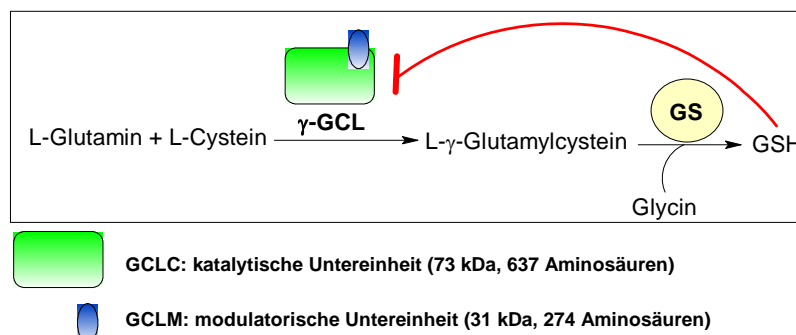


Abbildung 13: Kompetitive γ -GCL Feedbackhemmung durch GSH

2. Die Verfügbarkeit des Prekursors L-Cystein (**Meister 1988; DeLeve et al. 1991**).

Sowohl beim Menschen, als auch bei der Ratte werden vergleichbare K_m Werte für Glutamat (1,8 mM) und für Cystein (0,1-0,3 mM) beobachtet (*Lu et al. 1992; Misra et al. 1998*). Die intrazelluläre Konzentration an Glutamat ist zwar mehrfach höher als der entsprechende K_m -Wert der γ -GCS; die intrazelluläre Konzentration von Cystein aber ähnlich hoch zum entsprechenden K_m -Wert des Enzyms. Hieraus ergibt sich ein signifikanter Einfluss von intrazellulär verfügbarem Cystein und der Aktivität der γ -GCS auf die GSH-Syntheserate.

Die Leber besitzt die höchste Konzentration an GSH und verfügt bezüglich ihrer Synthese über zwei einzigartige Mechanismen. Zum einen besitzen Hepatozyten die einmalige Fähigkeit durch Transsulfurierung Methionin in Cystein umzuwandeln, weiterhin wird in Hepatozyten das Gleichgewicht der GSH Biosyntheserate durch den Export ins Plasma, in die Galle und Mitochondrien über spezifische Transporter gesteuert (*Fernández-Checa 1992*). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl der Plasma GSH-Spiegel, als auch der Cystein-Gehalt hauptsächlich durch den sinusoidalen Efflux von GSH aus Hepatozyten reguliert wird, kommt der Leber eine primäre Funktion für die GSH Homeostase der peripheren Organe zu (*Ookhtens et al. 1998*). Die Fähigkeit zur Transsulfurierung ist den Hepatozyten eigen, aber z. B. im Fetus bzw. Neugeborenen noch nicht ausgebildet. Ferner zeigen andere GSH assoziierte Systeme in normalen und transformierten Geweben keine Transsulfurierungsaktivität (*Finkelstein, 1990*), auch Leberzirrose- und Homocystinemia-Patienten (pathologisch hohe Homocystin-Werte) haben ein Defizit (*Mato 1994*).

Einfluss der Ernährung auf den GSH-Spiegel

Angaben über GSH Mengen die über die Nahrung aufgenommen werden sind sehr begrenzt und die Werte liegen unter 150 mg/Tag (*Bremer, 1981*). In Interventionsstudien mit Ratten konnte ein enger Zusammenhang zwischen der Nahrungsaufnahme und dem GSH Spiegel in der Leber beobachtet werden (*Tateishi et al., 1974*). Die Rattenleber enthält normalerweise 7-8 μmol GSH/g Gewebe überwiegend in reduzierter Form. Tiere die 48h keine Nahrung erhielten, zeigten eine signifikante Erniedrigung der GSH-Level bis auf die Hälfte des Normalwertes. Nach Nahrungsaufnahme stiegen die Gehalte wieder auf den physiologischen Normalwert. Die Enzymaktivität der γ -GCS und GS wurde dagegen nicht beeinflusst, und eine Vorbehandlung mit Cycloheximid (Translationshemmer bei Eukaryonten) oder Actinomycin D (Zytostatikum) führte ebenfalls zu keiner Veränderung des GSH-Spiegels, was möglicherweise auch auf unveränderte Mengen beider Enzyme hindeutet (*Tateishi et al., 1974*). Hieraus wird ein enger Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und GSH-Gehalt der Leber deutlich.

Durch die Peptidbindung zwischen dem amino-terminalen Ende von Glutamat und Cysteine sitzt der Cysteinrest an der gamma Position von Glutamat. Diese besondere Bindung verhindert die Spaltung des Moleküls durch intrazelluläre Peptidasen und wird nur durch ein einziges Enzym, der γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) hydrolysiert. GGT befindet sich auf der äußeren Zelloberfläche bestimmter Zelltypen (*Meister 1988; DeLeve et al. 1991*). Die carboxy-terminale Glycin Einheit bildet einen weiteren Schutz des GSH Moleküls vor der intrazellulären Spaltung durch die sog. γ -glutamylcyclotransferase (*Meister, 1988*), demzufolge kann GSH nur extrazellulär degradiert werden. Zu den wichtigsten Funktionen von GSH zählen u. a.:

- Detoxifizierung von elektrophilen Verbindungen
- Aufrechterhaltung des Thiolstatus von Proteinen durch Schutz von SH-Gruppen vor Oxidation, bzw. durch die Reduktion von Disulfidbrücken
- Abfangen freier Radikale
- Funktion als Cystein-Reservoir
- Modulation kritischer, zellulärer Prozesse, wie z. B. der DNA Synthese, mikrotubulärer Prozesse, sowie der Immunfunktion (*Meister 1988; Suthanthiran et al. 1990; Hutter et al. 1997*)

Die Detoxifizierung von Fremdstoffen oder deren Metabolite bildet hierbei eine Hauptfunktion des GSH. Die zu meist elektrophilen Verbindungen werden in einer spontanen oder enzymatisch katalysierten Reaktion an GSH konjugiert, welche durch sog. Glutathion-S-Transferasen erfolgt (*Meister 1988; DeLeve et al. 1991*). In weiteren Schritten werden die gebildeten GSH-Konjugate aus der Zelle exkretiert oder im Falle von Hepatozyten in die Galle geschleust. Der Metabolismus der Konjugate beginnt mit der Spaltung der γ -glutamyl Einheit des GSH durch GGT, wobei ein Cysteinylglycin Konjugat übrig bleibt (Abb. 14). Die Cysteinylglycin Bindung wird durch eine Dipeptidase gespalten und aus dem hieraus entstandenem Cysteinyl-Konjugat wird durch N-Acetylierung die jeweilige Mercaptursäure gebildet.

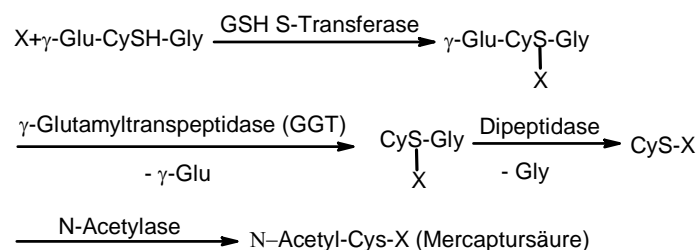


Abbildung 14: Detoxifizierung eines Fremdstoffes (X) zur entsprechenden Mercaptursäure.

Fremdstoff X besitzt ein elektrophiles Zentrum und kann über die Reaktion mit GSH S-Transferase an GSH gekoppelt werden. Über zwei folgende enzymatisch katalysierte Schritte wird schließlich die entsprechende Mercaptursäure gebildet.

Der Metabolismus der GSH-Konjugate erfolgt in erster Linie im Darm, sowie in der Galle oder Niere, wobei die Niere hauptsächlich für die N-Acetylierung verantwortlich ist. Die Konjugierung von Fremdstoffen führt bisweilen zur Detoxifizierung elektrophiler Verbindungen, gelegentlich können hierbei aber auch hochreaktive Zwischenstufen gebildet werden, wie im Falle des Dibrommethans, das mit GSH ein 2-Bromthioether bildet und schließlich in ein hochreaktives, mutagenes und karzinogenes Intermediat (möglicherweise ein Episulfonium) (*DeLeve et al. 1991*) umgewandelt wird. Neben exogenen Fremdstoffen werden auch endogene Verbindungen auf ähnlicher Weise metabolisiert, wie z. B. das 17- β -Estradiol, Leukotriene und Prostaglandine. Die GSH Konjugation erfolgt unter irreversiblen Verbrauch an zellulärem GSH. Für die Aufrechterhaltung des essentiellen Redoxstatus der Zelle, wird ebenfalls GSH benötigt, welches in einer Thiol-Disulfid Austauschreaktion mit oxidierten Thiolgruppen von Proteinen in folgender Weise reagiert:



Die Reaktion wird mit Hilfe einer sog. Thiol-Transferase katalysiert und ist reversibel. Das Gleichgewicht dieser Reaktion wird durch den Redoxstatus der Zelle determiniert und ist abhängig von der Konzentration an GSH und GSSG und proportional zum Log von $[GSH]^2/[GSSG]$ (*Hutter et al. 1997*). Das Thiol-Disulfid Gleichgewicht der Zelle stellt eine wichtige Größe dar und ist u. a. für die Steuerung einer Vielzahl metabolischer Prozesse, wie z.B. der Enzymaktivität, Transportaktivität und Genexpression (durch die Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren) verantwortlich (*DeLeve et al. 1991; Fernández-Checa 1992*). Eine weitere wichtige Funktion des GSH besteht in der Abwehr von freien Radikalen, sowie organischen Peroxiden (Abb. 15). Der Abbau organischer Peroxide, sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erfolgt enzymatisch durch die sog. Glutathionperoxidase (GPX), oder durch die GST. Wasserstoffperoxid kann ebenfalls durch die Katalase abgebaut werden, welche jedoch ausschließlich in den Peroxisomen vorkommen. Hierdurch ergibt sich eine essentielle Aufgabe von GSH in der Abwehr von physiologisch und pathologisch generiertem oxidativen Stress in Mitochondrien, da diese selbst über keine Katalase verfügen. In einer *in-vivo* Studie an Ratten die mit Alkohol gefüttert wurden, konnte eine Abnahme des mitochondrialen GSH Pools beobachtet werden, dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Pathologie von Lebererkrankungen. Ein verstärktes Ausmaß an oxidativem Stress kann zur Erschöpfung der zellulären GSH Kapazität führen, wodurch GSSG im Cytosol akkumuliert. Um die Redoxbalance der Zelle dennoch aufrecht zu erhalten, kann gebildetes GSSG entweder mit Hilfe der Glutathionreduktase zu GSH reduziert, aktiv aus der Zelle exportiert, oder mit Sulfhydrylgruppen von Proteinen zu gemischten Disulfiden umgewandelt werden (*DeLeve et al. 1991; Fernández-Checa 1992; 1997*). Wasserstoffperoxid kann sowohl im Cytosol durch die Glutathionperoxidase, als auch in den Peroxisomen durch die Katalase abgebaut werden. Zur Aufrechterhaltung der Redoxbalance wird GSSG unter Verbrauch von NADPH zu GSH reduziert; es entsteht ein sog. Redoxzyklus unter Beteiligung der Glutathionreduktase (GSR). Ein Überschuss an GSSG kann über aktiven Transport aus der Zelle geschleust werden, oder mit Proteinthiolen (PSH) zu gemischten Protein-Disulfiden (PSSG) reagieren.

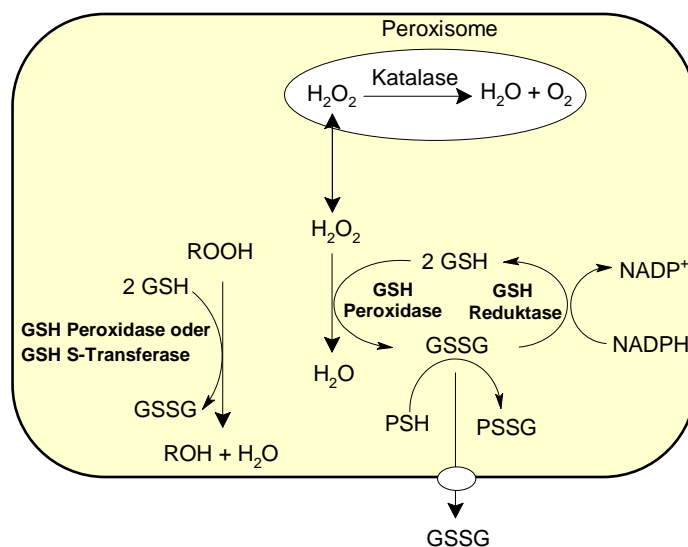


Abbildung 15: Antioxidative Funktion des GSH.

GSH bildet eine kontinuierliche Quelle für Cystein; Letzteres ist extrem instabil und kann extrazellulär direkt zu Cystin auto-oxidieren, wobei potenziell toxische reaktive Radikale entstehen können (*Meister, 1988; Fernández-Checa, 1992*). Der Cystein Metabolismus wurde erstmals von Meister et al. beschrieben (Abb. 16), der exakte Mechanismus ist jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt und es ist nicht bekannt ob die Induktion dieses Transportsystems auch in der intakten Leber stattfindet. Obwohl normale Hepatozyten kein Cystin transportieren, kann extrazelluläres GSH über Thiol-Disulfid-Austausch mit Cystin Cystein freisetzen, wobei Letzteres durch den Hepatozyten wieder aufgenommen werden kann (*Aw et al., 1986*). Dieser Mechanismus konnte in der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 beobachtet werden, obwohl diese im Gegensatz zu Hepatozyten nicht in der Lage sind Methionin in Cystein umzuwandeln (*Lu and Huang, 1994*), dagegen aber Homocystein.

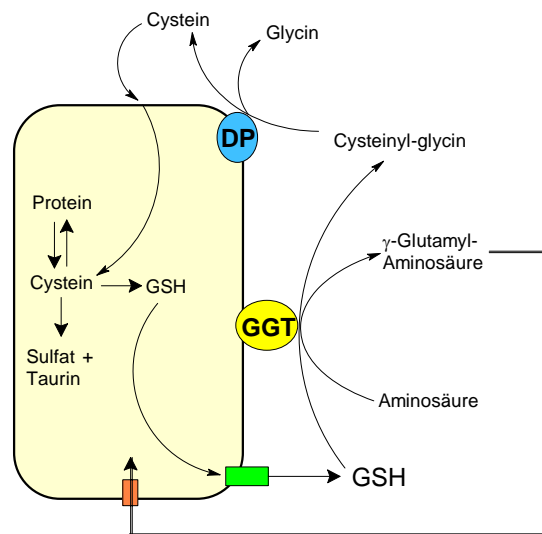


Abbildung 16: γ -Glutamyl-Kreislauf der Zelle.

Der γ -Glutamyl-Zyklus stellt eine effiziente und kontinuierliche Cystein-Quelle dar. GSH kann mittels sog. Carrier-vermitteltem Transport aus der Zelle transportiert werden und wird extrazellulär durch das membranständige Ektoenzym γ -Glutamyl-Transferase (GGT) zu Cysteinylglycin und γ -Glutamyl gespalten. Aus Cysteinylglycin wiederum wird nach Spaltung durch Dipeptidasen (DP) Cystein frei, welches wieder in die Zelle aufgenommen werden kann. Nach Kopplung einer Aminosäure (bevorzugt Cystein) an die γ -Glutamyl-Einheit erfolgt der Rücktransport in die Zelle und der Mechanismus ist geschlossen.

3.5.6 γ -GCS Regulierung

Die γ -GCS Aktivität kann über multiple Wege reguliert werden und für beide γ -GCS Untereinheiten ist eine transkriptionelle bzw. post-transkriptionelle Regulation beschrieben, wobei die post-transkriptionelle Regulation sowohl durch RNA Stabilisierung/ Destabilisierung, als auch über post-translationale Proteinmodifikation erfolgen kann. Eine zusammenfassende Darstellung der Regulierung beider Untereinheiten unter verschiedenen Konditionen ist in Tabelle 5 dargestellt. Oxidativer Stress kann über eine Vielzahl reaktiver Verbindungen regulatorische Mechanismen induzieren. Substanzen wie z. B. Methylquecksilber, Chinone, Wasserstoffperoxid, Menadion, Zytokine (wie z. B. TNF), Buthionin-sulfoxim (BSO), *tert*-Butylhydrochinon (t-BHQ), Diethylmaleat (DEM), Okadasäure, 4-Hydroxy-2-nonenal (4HNE),

sowie ionisierende Strahlung können in vielen Zellen und Organen oxidativen Stress verursachen. Gleichzeitig führt dies zu einer Erhöhung der γ -GCS Aktivität und GCLC Transkription (*Shi et al. 1994; Morales et al. 1998*). Neben einer Erhöhung der Genexpression, ist nach Behandlung mit DEM oder 4-HNE auch eine Stabilisierung der GCLC mRNA beobachtet worden (*Liu et al. 1996; Sekhar et al. 1997*). Eine erhöhte Transkription der modulatorischen Untereinheit (GCLM) der γ -GCS wurde vergleichsweise nach Behandlung mit DEM, BSO, t-BHQ, β -Naphthoflavon (β -NF) und 4-HNE beobachtet (*Cai et al. 1997; Galloway et al. 1997; Mulcahy et al. 1997; Tian et al. 1997*), letztere bewirkt ebenfalls eine Stabilisierung der GCLM mRNA (*Liu et al., 1998*). Bei näherer Betrachtung der molekularen Mechanismen, die der oxidativen stress-induzierten γ -GCS Expression zugrunde liegen, findet man funktionelle Gensequenzen in den 5'-flankierenden Regionen beider γ -GCS Untereinheiten (*Galloway et al. 1997; Moinova et al. 1998; Wild et al. 1998*). In der Promotor-Region des GCLC Gens sind eine Reihe von responsiven Elementen identifiziert worden, unter denen nuclear factor kappa B (NF κ B), Sp-1, activator protein-1 (AP-1), activator protein-2 (AP-2), metal response element (MRE) und das sog. antioxidant response element (ARE), bzw. electrophile response element (EpRE) als wichtigste genannt seien (*Mulcahy et al. 1995; 1997*). Die Promotorregion von GCLM enthält ebenfalls AP-2, MRE, sowie ARE/ EpRE-Elemente (*Galloway et al. 1997*). Das humane GCLC Gen besitzt in einer Region – 817 bis + 48 der Nukleotidsequenz AP-1 und AP-1 ähnliche Elemente die hochsensibel Effekte auf die GCLC Promotoraktivität z. B. nach Einwirkung von Zigarettenrauch-Kondensatlösung, Menadion, Wasserstoffperoxid, TNF oder ionisierender Strahlung vermitteln können (*Morales et al. 1998*). Bei näherer Betrachtung der GCLC Nukleotidsequenz konnte in der Region zwischen -219 und -293 AP-1 als wichtigstes Element für die Menadion bzw. Wasserstoffperoxid induzierte GCLC Transkription lokalisiert werden (*Rahman et al. 1998*). Interessanterweise ist dasselbe Element für die GCLC Induktion in BSO resistenten Zellen verantwortlich und Studien von Sekhar et al., sowie Morales et al. bestätigen die Bedeutung der AP-1 vermittelten GCLC Transkription durch oxidativen Stress (*Sekhar et al. 1997*). Mulcahy et al. beschreiben zudem ein weiteres ARE-Element (ARE4) das etwa 3,1 kb oberhalb der Transkriptionsstartseite lokalisiert ist und sowohl für die konstitutive, als auch β -NF induzierte GCLC Expression in HepG2 verantwortlich ist (*Mulcahy et al., 1997*). ARE's werden auch als EpRE's bezeichnet, letzterer Begriff erscheint jedoch zutreffender, aufgrund der klaren Tatsache, dass diese Elemente durch Pro-Oxidantien aktiviert werden (*Wild et al. 1998*). Das ARE4 in der Promotorregion des humanen GCLC Gens hat eine spezielle ARE Konsensussequenz (5'-GTGACTCAGCG-3'), in die zugleich ein Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) responsives Element (TRE, unterstrichen) eingebettet ist, an die AP-1 Proteine binden können. Daher wird auch eine mögliche Beteiligung von AP-1 Protein an der Aktivierung des ARE4 Elements diskutiert. Wild et al. haben diese Möglichkeit untersucht und konnten zeigen, dass an der ARE4 vermittelten konstitutiven Expression des GCLC Promotors, die AP-1 Bindungssequenz eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu wurde dies nach Induktion mit β -NF nicht beobachtet, ein dem ARE4 angrenzendes (34 Basen unterhalb) ARE3 Element war für die durch β -NF ausgelöste GCLC Induktion auch nicht erforderlich, so dass weitere bis dato unbekannte Proteinkomplexe hieran beteiligt zu sein scheinen (*Wild et al. 1998*). EpRE und AP-1 Elemente sind ebenfalls an der durch β -NF ausgelösten GCLM Induktion beteiligt. Das EpRE

ist etwa 300 Basenpaare oberhalb der Translationsstartseite des GCLM Gens lokalisiert und das AP-1 Element 33 Basenpaare oberhalb der EpRE Sequenz. Beide Elemente können durch die β -NF vermittelten Effekte aktiviert werden, wobei das EpRE stärker beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wird die basale Expression überwiegend durch AP-1 beeinflusst und das EpRE ist für die maximale Basalexpression nicht erforderlich (*Moinova et al. 1998*). Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass beide γ -GCS Untereinheiten über funktionelle EpRE und AP-1 Sequenzen verfügen, die auf prooxidative Effekte mit einer Regulation der Genexpression antworten und somit entscheidend die GCLC und GCLM Transkription steuern (Tab. 5). Die am Aktivierungsmechanismus zusätzlich beteiligten trans-aktivierenden Proteine müssen allerdings noch charakterisiert werden. Trotz dieser Gemeinsamkeit in der Expression beider γ -GCS Untereinheiten, liegen als Beispiel der Induktion durch 4-HNE offenbar zwei unterschiedliche molekulare Signalwege zugrunde. Zwar konnte in beiden Fällen eine erhöhte Transkription, sowie mRNA Stabilisierung beider Untereinheiten festgestellt werden, eine Neusynthese des Proteins war jedoch nur für GCLM notwendig (*Liu et al., 1998*).

Tabelle 5: Modulation der γ -GCS Aktivität, sowie der GCLC und GCLM Expression

Behandlung	Effekt auf GCLC	Effekt auf GCLM
oxidativer Stress ^a	Transkription mRNA Stabilisierung	Transkription
arzneimittelresistente Tumorzelllinien (humane Kolontumoren, Lungenkrebs, cis-Platin resistente Lungenkrebs-Zelllinie (SBC-3))	Transkription	
Zytokine (TNF, IL-1 β)	Transkription	
Hitzeschock	mRNA Level	
Antioxidanzien	mRNA Level	
Schwermetalle	mRNA Level	
GSH-konjugierende Verbindungen ^b	Transkription mRNA Stabilisierung	Transkription mRNA Stabilisierung
Kupfer-Defizienz	mRNA Level	
Hormone ^c (Insulin, Hydrokortison)	Transkription	Kein Effekt
Wachstum, Zellzyklus	Transkription	Kein Effekt
Nitritoxid	zelltypabhängig	mRNA Level vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta
Esai Hyperbilirubinemic Ratten	mRNA Level	
GSH-Spiegel	kontrovers	
hohe Glucose-Level	Transkription	
TGF β 1	Transkription	

^a erhöhte Transkription und mRNA Stabilisierung beider γ -GCS Untereinheiten durch 4-Hydroxy-2-Nonenal

^b erhöhte Transkription und mRNA Stabilisierung beider γ -GCS Untereinheiten durch Diethylmaleat (DEM)

^c Erhöhte GCLC Transkription nach Hormonzusatz zu kultivierten Hepatozyten, jedoch erniedrigte GCLC mRNA-Level unter Hormon-Defizienz *in-vivo*.

Das GCLC Gen ist beim Menschen auf Chromosom 6p12 lokalisiert, umfasst 16 Exons und erstreckt sich über eine DNA-Sequenz von näherungsweise 48 kB; das GCLM Gen dagegen liegt auf Chromosom 1p22 und umspannt 7 Exons mit einer Länge von 22 kB (*Walsh et al. 2001*). Die kodierenden Regionen beider Gene sind bei Eukaryonten hoch konserviert, so dass die entsprechenden Aminosäuresequenzen unter Säugetieren nur geringe Unterschiede aufweisen. Zwischen Mensch und Maus zeigt sich eine 97,6 %ige Übereinstimmung für das GCLC Gen und 98,2 % für die GCLM Gensequenz. Die Promotorregionen beider Gene können durch eine Vielzahl unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren reguliert werden, hierzu zählt in erster Linie die Gruppe der Nrf2 Familie, AP1, AP3, NFκB, die Gruppe der Maf-Proteine, JunD, Fra, sowie CREB und andere (*Lu, 2009*).

3.5.7 Oxidativer Stress und redox-abhängige Änderungen der γ -GCL Aktivität

Die relativen Level der γ -GCL Untereinheiten bestimmen maßgeblich die zelluläre γ -GCL Aktivität und werden transkriptionell, sowie post-transkriptionell in Erwiderung auf oxidativen Stress reguliert (*Griffith et al. 1999; Rahman et al. 2000; Wild et al. 2000*). Während diese transkriptionellen Ereignisse immer mit einer erhöhten Protein Translation einhergehen, konnte erst in den letzten Jahren durch direkte und funktionelle Quantifizierung der γ -GCL Proteinlevel, die limitierende Wirkung der GCLM auf die γ -GCL Holoenzym-Bildung für die meisten Zelltypen und Geweben demonstriert werden (*Krzywanski et al. 2004; Chen et al. 2005; Lee et al. 2006*). Der GCLC Level ist nach wie vor eine wichtige Einflussgröße auf die γ -GCL-Aktivität, eine erhöhte GCLM Expression alleine, stellt jedoch ebenfalls einen effektiven Mechanismus zur Erhöhung der zellulären γ -GCL Aktivität dar (*Lee et al. 2006*).

Oxidativer Stress führt zu einer direkten Stimulation der γ -GCL Aktivität, ohne gleichzeitiger Proteinexpression der beiden Untereinheiten. Diese Art transientser Stimulation der γ -GCL Aktivität konnte anhand Untersuchungen mit sub-toxischen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid, Menadion, Phoron, sowie anderen oxidativen Verbindungen belegt werden (*Ochi 1995; 1996*). Aufgrund der Tatsache dass die γ -GCL Aktivierung (10 min – 1h) sehr schnell erfolgt und eine Hemmung der Protein Neusynthese die Wasserstoffperoxid bzw. Menadion-induzierte γ -GCL Aktivität nicht beeinträchtigt, ist eine Beteiligung der Expression der γ -GCL Untereinheiten ausschließen (*Ochi 1995; 1996*). Oxidativer Stress nimmt demnach unmittelbaren Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der GCLC bzw. GCLM Gene und führt offenbar zu einer verstärkten γ -GCL Aktivität über direkte post-translationale Modifikation einer oder beider γ -GCL Untereinheiten. Reduzierende Verbindungen führen dagegen zu einer reversiblen Dissoziation des γ -GCL Holoenzym. Dies verdeutlicht zudem die wichtige Funktion intermolekularer Disulfidbrücken für die Holoenzym-Bildung (*Seelig et al. 1984; Tu et al. 1998; Fraser et al. 2002; 2003*). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der zellulären γ -GCL Aktivität durch einen sogenannten Redox-Schaltmechanismus erfolgt. Das hieraus entstandene Konzept basiert auf der Beobachtung, dass oxidierende Bedingungen die γ -GCL Holoenzym-Formation stimulieren, während reduzierende Bedingungen in eine Dissoziation beider Untereinheiten resultierten (*Huang et al. 1993*). Untersuchungen mit sulfhydryl

modifizierenden Verbindungen, sowie Mutationsanalysen zur humanen GCLC (*Tu et al. 1998*) und GCLM aus *Drosophila Melanogaster* (*Fraser et al. 2003*) konnten die Bedeutung von funktionellen Cysteinresten in beiden Untereinheiten für die Regulierung der γ -GCL Holoenzym Bildung und Aktivität demonstrieren. Eine zusammenfassende Darstellung der in diesem Zusammenhang wichtigsten Beobachtungen aus der Literatur ist in nachfolgender Tabelle 6 gegenübergestellt.

Tabelle 6: Einflussfaktoren auf die Regulation der γ -GCL Aktivität

Verbindung	Wirkung	Referenz
Cystamin	Inaktivierung der γ -GCL durch Interaktion mit kritischen Cysteinresten in der aktiven Seite der γ -GCL (in den meisten Spezies)	(<i>Seelig et al., 1984</i>); (<i>Huang et al., 1988</i>); (<i>Lueder et al. 1996</i>); (<i>Fraser et al. 2002</i>); (<i>Jez et al. 2001</i>)
N-ethylmaleimide	Aufhebung muriner γ -GCL und GCLC Aktivität	<i>Backos et al. (unpublizierte Daten)</i>
Dithiothreitol (50 mM)	Bewirkt Dissoziation des γ -GCL Holoenzym, dennoch 10-25 % des Enzyms bleibt als Komplex bestehen.	(<i>Seelig et al., 1984</i>)
DL-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO)	Hemmung der γ -GCL Aktivität durch irreversible Bindung an die aktive Seite des Holoenzym	(<i>Griffith et al. 1979a</i>)
L-Glutamat, L- α -Aminobutyrat	Kompetitive hemmung der GCLC Autophosphorylierung	
Mutation an Cysteinrest	Funktion	Referenz
Cys ⁵⁵³ (GCLC, Mensch)	Signifikante Reduktion der Aktivität des γ -GCL Holoenzym	(<i>Tu et al. 1998</i>)
Cys ^{213/264/267} (GCLM, <i>Drosophila melanogaster</i>) Cys ¹⁹³ , Cys ¹⁹⁴ (GCLM, Mensch)	Funktionelle Rolle für die kovalente Interaktion der Disulfidbindungen zwischen beiden Untereinheiten. Mutation führt zur Hemmung der sog. Intersubunit Disulfidbindungen unter reduzierenden Bedingungen, jedoch nicht zu einer vollständigen Depletion der γ -GCL Aktivität.	(<i>Fraser et al. 2003</i>)
Post-transkriptionelle Faktoren	Mechanismus	Referenz
GSH Feedback Hemmung	γ -GCL Konformationsänderung durch Reduktion von Intersubunit Disulfidbindungen, erfolgt kompetitiv zur Bindung von Glutamat	(<i>Huang et al. 1993</i> ; <i>Fraser et al. 2002</i> ; <i>2003</i>)
GSH	Keine Dissoziation des γ -GCL Holoenzym bei hohen Konzentrationen (5-10 mM)	(<i>Tu et al. 1998</i> ; <i>Yang et al. 2002</i>)
Cystein-Mangel	Bildung eines gegenüber Reduktion und Hitzedenaturierung stabilen Fraktion des Holoenzym	(<i>Lee et al. 2006</i>)
GCLC Autophosphorylierung	50 %ige Erniedrigung der Vmax der γ -GCL Aktivität, jedoch kein Effekt auf Km für	

	Glutamat.	
Proteinkinase C (PKC); cAMP abhängige Proteinkinase (PKA); Ca ²⁺ -calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CMKII)	Hemmung der γ -GCL Aktivität in kultivierten Rattenhepatozyten, durch direkte Phosphorylierung der GCLC	(<i>Lu et al., 1991</i>)
Dibutyryl cAMP, Phenylephrine	Induzierbare Phosphorylierung der GCLC	(<i>Sun et al., 1996</i>)
NADPH/NADP ⁺	NADPH bewirkt in-vitro eine bis zu zweifache Erhöhung der γ -GCL-Aktivität (aus <i>Drosophila Melanogaster</i>), NADP ⁺ dagegen eine Erniedrigung. Mechanismus bisher ungeklärt, da keine spezifische NADPH Bindungsstelle existiert. Vergleich mit Aldo-Keto-Reduktase (AKR) zeigt jedoch ähnliche Elemente einer NADPH-Bindungstasche in GCLM	(<i>Griffith 1999; Soltaninassab et al. 2000; Jez et al. 2001; Toroser et al. 2006</i>)
Caspase-vermittelte Spaltung der GCLC	Depletion intrazellulärer GSH Level bei apoptotischem Zelltod. Einhergehend mit GSH Efflux und GCLC Protein-Spaltung durch Caspase-3	(<i>Ghibelli et al. 1999; Coppola 2000; Franklin et al. 2002</i>)
Multiple Apoptose Stimulii	Chemotherapeutika, TNF α und FAS-Antikörper, TGF β 1, UV Strahlung, Arsen	(<i>Fraser et al. 2002, 2003; Franklin et al. 2003; Zhu et al. 2004</i>)

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen verdeutlichen die Bedeutung multipler kovalenter und nicht-kovalenter intermolekularer Wechselwirkungen für die Formation und Stabilität des γ -GCL Holoenzym-Komplexes. Eine vollständige Strukturaufklärung des γ -GCL Proteins wird ein besseres Verständnis über die molekularen Regulationsmechanismen dieses Schlüsselenzyms liefern können.

3.5.8 GCLC und GCLM Polymorphismen

Bezüglich der Induktion der γ -GCL nach Exposition durch GSH depletierende Medikamente, existiert eine hohe Variabilität unter den Menschen (*O'Dwyer et al. 1996*). Die individuellen Unterschiede in der γ -GCL Expression und Aktivität zwischen den Menschen beschränken sich hierbei jedoch nicht nur auf gewöhnliche Polymorphismen der Aminosäuresequenzen der γ -GCL Untereinheiten (*Beutler et al. 1990; Hamilton et al. 2003*). Polymorphismen die in einer verminderten γ -GCL Aktivität resultieren, können zu ernsthaften Krankheitsbildern wie der Hämolytischen Anämie, Aminoacidurie oder zur spinocerebraler Degeneration führen (*Ristoff et al. 2000*) (Tab. 7). Untersuchungen von Walsh et al. konnten zeigen, dass die Anzahl an Trinukleotid-Polymorphismen in der untranslatierten 5'-Region (5'-UTR) der humanen GCLM mRNA einen funktionellen Einfluss auf den GSH Spiegel, sowie die Arzneimittel-Sensitivität in einer Vielzahl humaner Tumorzelllinien hat (*Walsh et al., 2001*).

Weiterhin konnte eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der CAG Wiederholungen im GCLC Gen und der Lungenfunktion (FEV1) bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) und schwacher CF Mutation beobachtet werden (*McKone et al. 2006*). GCLC und GCLM Polymorphismen sind darüber hinaus mit der Pathogenese der chronischen Beryllium-Erkrankung assoziiert (*Bekris et al., 2007*) und weitere Studien zeigen einen Einfluss auf das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (*Nakamura et al. 2003*). Hierbei wird sowohl ein verringerter Plasma GSH Spiegel, als auch eine gehemmte γ -GCL Induktion bei oxidativem Stress beobachtet. Patienten mit GCLM (-588 C/T) oder GCLC (-129 C/T) oder T/T Genotyp zeigen darüber hinaus eine beeinträchtigte Vasodilatation nach Acetylcholin Aufnahme. Polymorphismen in der Promotor-Region dieser beiden Gene können das Erkrankungsrisiko für eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten beeinflussen, wie z. B. Schizophrenie (*Gysin et al. 2007*), Schlaganfall (*Baum et al. 2007*), Arzneimittelmisbrauch (*Hashimoto et al. 2008*), Schwefelkohlenstoff-Metabolismus (*Jonsson et al. 2007*), Quecksilber Belastung (*Custodio et al., 2005*), Diabetes Mellitus (*Bekris et al. 2007*) und Asthma (*Polonikov et al. 2007*). Um den Effekt dieser Polymorphismen auf die GCLC / GCLM mRNA Expression, γ -GCL Aktivität und GSH Synthese zu ergründen, wurden in den genannten Studien unterschiedliche Zelltypen und Gewebe von Patienten untersucht. In diesem Zusammenhang wurde u. a. mit kultivierten Fibroblasten (*Gysin et al. 2007*), Blutmonocyten (*Nakamura et al. 2003*), sowie mit Plasma und Blut (*Nichenametla et al. 2008*) experimentiert. In Abhängigkeit vom Zell- und Gewebetyp zeigte sich hierbei eine gewisse Variabilität, dennoch konnte ein genereller Zusammenhang zwischen dem GCLC Allel (7 GAG Repeat) und einem erhöhten GSH Spiegel bzw. GCLC Expression beobachtet werden, aber nicht für GCLC Allele (8 und 9 GAG Repeat). Die GCLM (-588T) und GCLC (-129T) Allele sind dagegen mit einer verminderten Expression/Induzierbarkeit und einem verringerten GSH-Spiegel assoziiert. In Anbetracht der funktionellen Bedeutung dieser Polymorphismen, sind weitere Untersuchungsmodelle erforderlich, die den kritischen Einfluss variabler γ -GCL Expression auf die Suszeptibilität pathologischer Erkrankungen ergründet.

Tabelle 7: Pathologie der GSH Defizienz

GSH Defizienz und Erkrankungsform	Literatur
Vererbte GSH Defizienz: Hämolytische Anämie, Spinocerebrale Degeneration, Periphere Neuropathie, Myopathie, Aminoacidurie, Neurologische Komplikationen in der zweiten Lebenshälfte	(Sen, 1997)
Erniedrigte GSH Gehalte in Erythrocyten oder Plasma bei vererbbare Nichtspherocytische lymphatische Leukämie, Glucose-6-Phosphat dehydrogenase (G6PD) Defizienz, Patienten mit Leberzirrhose oder akute/ chronischer Alkoholkonsum	(Chawla et al. 1984; Altomare et al. 1988; Meister 1995; Loguercio et al. 1996; Gul et al. 2000)
Nichtalkoholische Lebererkrankungen, Acetaminophen und andere Arzneimittel, Virale Hepatitis; Depletion der GSH Level in Monocyten von Hepatitis C Patienten	(Altomare, Vendemiale et al. 1988)
Systemische GSH Depletion bei HIV-Infektion (erniedrigte GSH Werte in Plasma, Erythrocyten, T-Zellen, Lymphocyten und anderen Monocyten)	(Pace et al. 1995)
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary	(Suter et al. 1994;

disease; COPD) Atemnotsyndrom (Acute Respiratory Distress Syndrom; ARDS) GSH Depletion im Lungeneithelschleim bei idiopathischer Lungenfibrose, perinataler Hypoxie	Anderson 1997)
Niedrige GSH Level in der Darmmukosa bei älteren Menschen, bei <i>Helicobacter pylori</i> induzierter Gastritis oder Zwölffinger-darmgeschwüren und in den Ileumzonen von Morbus Chron Patienten	(Iantomasi et al. 1994; Loguercio et al. 1996; Gul et al. 2000)
Patienten mit akutem Myokardinfarkt, Männer mit familiärer Herzkranzgefäß-Erkrankung, GSH Infusion bei Atherosklerose Patienten führt zu verstärkter mikrovaskulärer Dilatation in Erwiderung auf Acetylcholin Gabe, S-Nitrosobehandlung verhindert die Thrombozytenaggregation. Der vasodilatative Effekt wird auf eine durch GSH ausgelöste, versärfte Stickoxid Freisetzung zurückgeführt	(Usal et al. 1996; Prasad et al. 1999)
Kupferspeicherkrankheit (Morbus Wilson) führt zu deutlicher GSH Abfall in der Leber,	(Kidd, 1997)
Bauchspeicheldrüsenentzündung (Pankreatitis) in Zusammenhang mit Alkoholmissbrauch	(Kidd, 1997)
Niedrige GSH Werte in Erythrozyten bzw. Thrombozyten bei Diabetikern und im Blut bei Patienten mit früher Hyperglykämie	(Gul et al., 2000)
Neurodegenerative Erkrankungen : Verringerte GSH Level in Lymphoblasten von Alzheimer-Patienten und GSH Depletion in der Substantia Nigra von Parkinson-Patienten	(Kidd, 1997; Sen, 1997)
Der Alterungsprozess ist mit einer verminderten GSH Homeostasis assoziiert, wohingegen unabhängig vom Alter, höhere GSH Level mit einem besseren Gesundheitsstatus korrelieren	(Anderson 1997; Cai et al. 2000)

Der akut toxische Wirkung einer GSH-Depletion bei dem die Zelle ihre Viabilität verliert liegt bei einem Wert von etwa 70-80 Prozent (**Kidd 1997; Gul et al. 2000**). Mitochondrien werden durch diesen Vorgang als erstes getroffen, da sie durch den hohen Sauerstoff-Radikalfluss im Organell geschädigt werden können. Ein starker mitochondrialer Defekt ist vor allem mit einer Pathogenese der Retina-Degeneration, sowie Morbus Parkinson assoziiert (**Meister 1995; Cai et al. 2000; Kidd 2000**).

3.5.9 Glutathion Therapie

Bei einer Vielzahl Glutathion assoziierter Erkrankungen wird eine GSH Repletion als Möglichkeit zur therapeutischen Behandlung genutzt. Die systemische Bioverfügbarkeit von GSH nach oraler Gabe ist jedoch wahrscheinlich unzureichend, um im Zielorgan eine therapeutische Dosis erreichen zu können. Allerdings weisen umfangreiche Studien darauf hin, dass GSH entlang des intestinalen Epithels über spezifische Transportsysteme aufgenommen wird (**Vincenzini et al. 1992**). Nach Absorption gelangt GSH ins Pfortaderblut, wo es unwillkürlich katabolisiert wird, bevor es die Leber erreicht und gerade dieser Umstand hat zu den paradoxen Resultaten geführt (**Aw et al., 1986**). Dennoch ist eine Behandlung mit GSH bei gastrointestinalen Erkrankungen wie z. B. Morbus Chron durchaus indiziert (**Iantomasi et al. 1994**). Perlmutter berichtet über erfolgreiche Fälle von GSH Repletion bei der Behandlung unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen mit GSH. Eine intravenöse Gabe von GSH bei Parkinson Patienten, sowie die orale Applikation orthomolekularer GSH Prekursoren bei Alzheimer, Schlaganfall, Multiple Sklerose (MS), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und dem

Post-Polio Syndrom konnte eine leichte Verbesserung der Krankheitssymptome bewirken (*Perlmutter, 2000*). Wie bereits erwähnt stellt Cystein in-vivo einen limitierenden Faktor für die GSH Biosynthese dar. Die Substanz N-Acetylcystein (NAC) stellt eine weitere Cysteinquelle dar und wird aufgrund der guten oralen Bioverfügbarkeit bei vielen Krankheiten appliziert. NAC ist ein potentes Antioxidanz mit antimutagener und antikarzinogener Eigenschaft und ein sehr effektives Antidot zur Behandlung akuter Acetaminophen Vergiftungen (*Faintuch et al., 1999*). Nach intestinaler Absorption wird NAC in Cystein konvertiert und macht die GSH Depletion wieder reversibel (*Traber et al., 1992*). Einen klinischen Nutzen konnte NAC vor allem bei der Behandlung von Patienten mit HIV/AIDS, sowie bei intravenöser Gabe nach septischem Schock zur Verbesserung der Lungenfunktion erzielen (*Sen, 1997*). Die orale Gabe von NAC (1800 mg/Tag) bei Patienten mit Lungenerkrankung bewirkte dagegen keine Verbesserung (*Bridgeman et al., 1994*).

3.6. Enzymatische Abwehrmechanismen

3.6.1 Glutathionperoxidase (GPX)

Bei der Glutathionperoxidase (GPX) (EC 1.11.1.9) handelt es sich um ein selenabhängiges Enzym, von der im Menschen bislang sechs Isoformen identifiziert worden sind. Alle GPX teilen die gemeinsame Eigenschaft Peroxide zu reduzieren und damit potentielle Substrate für die Fenton Reaktion zu eliminieren (Abb. 17). Die GPX benötigt GSH als Kofaktor und H₂O₂ bzw. organische Peroxide als Substrat, infolge deren Abbaus Wasser bzw. das entsprechende Alkohol gebildet wird.



Die GPX hat eine Schlüsselfunktion im Schutz vor niedrigen Level an oxidativen Stress. Es existiert jedoch eine signifikante Konkurrenz zwischen GPX und Katalase um das gemeinsame Substrat H₂O₂.



Abbildung 17: Biochemische und physiologische Rolle von Selenoproteinen

Die Beteiligung an Oxidoreduktase-Reaktionen ist eine charakteristische Eigenschaft dieser Proteinfamilie, allerdings existiert eine starke Diversität in der Verteilung in Geweben und in den physiologischen Reaktionen, an denen diese Proteine beteiligt sind (Tab. 8).

Tabelle 8: Funktion und Expression ausgewählter humaner Selenoproteine. Modifiziert nach (Moghadaszadeh et al. 2006)

Protein (Glutathion Peroxidase)	Gen	Transkript Expression	Protein	Funktion	Knockout Phänotyp (Maus)
Cytosolische GPX (cGPX, GPX1)	GPX1	ubiquitär	Cytosol	antioxidativ, katalysiert die Reduktion von H ₂ O ₂ und diversen löslichen organischen Peroxiden	Kein Unterschied im Phänotyp, jedoch bis zu achtfach geringere Lebenserwartung in Mäusen nach Exposition von lethalen Dosen von Prooxidantien. Höhere Suszeptibilität gegenüber Myokarditis., nach Coxsackievirus Infektion.
Gastro-intestinale GPX (GI-GPX, GPX2)	GPX2	Gastro-intestinaltrakt	Cytosol	antioxidativ, katalysiert die Reduktion sämtlicher Peroxide	Kein veränderter Phänotyp, selbst nach g-Bestrahlung. GPX1 und GPX2 doppelt knockout zeigt Symptome und Histoptahologie vergleichbar mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
Plasma GPX (pGPX, GPX3)	GPX3	Niere, Plasma	extrazellulär	antioxidativ, katalysiert die Reduktion sämtlicher Peroxide. Besitzt nur 10% der enzymatischen Aktivität von GPX1	
Phospholipid - hydroperoxid GPX (PHGPX, GPX4)	GPX4	Sämtliche Gewebe, sowie im Gehirn.	Cytosol und membran-assoziiert	antioxidativ, reduziert direkt Phospholipid und Cholesterin Hydroperoxide	Homozygote Mutanten zeigen Embryoletalität. Heterozygote dagegen fruchtbar und scheinbar normal, haben aber erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativen Stress.
Sperma GPX4 (snGPX)	GPX4	Spermien	Zellkern	An der Spermienentwicklung und männlichen Fruchtbarkeit beteiligt	
Epididymal secretory glutathione peroxidase	GPX5		Epididymis	Spermiogenese	
GPX6	GPX6	n.d.	n.d.	Expression nur im Embryo und Riechepithel nachgewiesen	n.d.

Mit Ausnahme der GPX5 (Epididymal secretory glutathione peroxidase) werden die antioxidativen Selenoproteine GPX1 bis GPX6 durch strukturell verwandte Gene kodiert (Moghadaszadeh et al. 2006). GPX1 wird ubiquitär exprimiert und detoxifiziert Wasserstoffperoxid (Behne et al. 2001). GPX1 knockout Mäuse zeigen zwar kein Unterschied

im Wachstum bzw. der Empfindlichkeit gegenüber einem chronischen Selenmangel im Vergleich zum Wildtyp, haben jedoch eine um bis zu achtfach geringere Lebenserwartung nach Exposition mit lethalen Dosen von Prooxidantien wie Paraquat oder Diquat (**Cheng et al. 1998; Lei et al. 1998**). Hu et al. berichteten, daß der Verlust der Heterozygotität im GPX1 Genlokus ein primäres Ereignis für die Entstehung von Brust-, Lungen-, Nacken- und Darmkrebs darstellt. Gerade die Genvariante mit Leucin (statt Prolin) im Codon 198 zeigt eine höhere Frequenz an Brustkrebs-Inzidenz (**Hu et al. 2003**). Am GPX1 defizienten (i⁶A⁻/Tag)-Mausmodell, welche zusätzlich das Prostatakrebs spezifische SV40 t und T Onkogen expremiert, konnte eine verstärkte Prostata-Krebsentstehung beobachtet werden. Dies stützt die Vorstellung, dass die GPX1 auch anti-onkogene Eigenschaften besitzt. Es ist unlängst bekannt, dass alle bekannten Selenoproteine über enzymatische Eigenschaften verfügen (**Ursini et al. 1999**). Die GPX4 hat allerdings neben ihrer enzymatischen Aktivität auch eine spezielle strukturelle Funktion. In ausgereiften Spermien ist die GPX4 unlöslich und bleibt enzymatisch inaktiv. Diese besondere Form ist für die Stabilität der helikoidalen Form der Mitochondrien in den Spermien von struktureller Bedeutung (**Ursini et al. 1999**). Eine stark erniedrigte GPX4 Expression wird daher unmittelbar mit der männlichen Unfruchtbarkeit in Zusammenhang gebracht und konnte auch in infertilen Spermien beobachtet werden (**Imai et al. 2003**). Ein vollständiger GPX4 knockout führt zu einer frühen Embryoletalität bei Mäusen. Die heterozygote GPX4^(+/-) Maus dagegen ist zwar lebens- und fortpflanzungsfähig, zeigt jedoch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einer Exposition von γ -Strahlung, Paraquat, tert-Butylhydroperoxid, oder Wasserstoffperoxid (**Yant et al. 2003**). Selenoproteine sind wohlmöglich an der Entstehung weiterer Erkrankungen die das Gehirn, Immun- oder endokrine System betreffen beteiligt. Eine Selendefizienz ist ein weiterer wichtiger Faktor und ebenfalls mit der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen assoziiert. So ist die sogenannte Keshan-Krankheit in Gebieten mit selenarmen Böden (bestimmte Regionen in China) endemisch und äußert sich in Herzbeschwerden, Herzinsuffizienz, Arrhythmie, EKG-Veränderungen und schlimmstenfalls in einem kardiogenen Schock (**Ge et al. 1993**). Keshan-Patienten zeigen darüber hinaus noch einen Befall mit dem Cocksackie-Virus. Die Supplementierung von Selen in Speisealz, stellte hierbei eine einfache und effiziente Präventionsmaßnahme für die betroffene Bevölkerung dar und führte schnell zum Rückgang der Erkrankungshäufigkeit (**Cheng et al. 1990**). Interessanterweise entwickeln GPX1 knockout Mäuse die mit dem Cocksackie-Virus infiziert werden, trotz Selenzufütterung eine ähnliche Form der Keshan-Erkrankung mit typischen Symptomen der Kardiomyopathie. Die GPX1 Depletion ermöglicht die Akkumulation von Mutationen im viralen RNA Genom, was die Entwicklung besonders virulenter und kardiotoxischer Stämme ermöglicht (**Beck et al., 1998**). Die Keshan Erkrankung wird daher unmittelbar mit einer verminderten GPX1 Aktivität in Zusammenhang gebracht. Ein Selenmangel wird darüber hinaus mit der Pathogenese weiterer Erkrankungen, wie z. B. Versagen des Immunsystems, Myokardinfarkt, Muskelschwund, Depression, Diarrhoe, Demenz und Psychosen, sowie mit einer höheren Krebs susceptibility assoziiert (**Foster, 2004**). Die Selenaufnahme ist nach epidemiologischen Studien zufolge mit einer verringerten Krebsinzidenz korreliert, allerdings sind die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen nicht vollständig ergründet (**Combs et al. 1998; Brenneisen et al. 2005**). Da die meisten Selenoproteine funktionell über eine antioxidative Aktivität verfügen liegt die Vermutung nahe,

dass eine höhere Selenaufnahme mit einer verstärkten Expression von Selenoproteinen einhergeht und dies in der Folge gegen ROS, sowie DNA-Schäden schützt.

3.6.2 Superoxiddismutase 2 (SOD2)

Vorkommen:

Die Superoxiddismutase (SOD; EC 1.15.1.1) ist ein ubiquitäres Enzym und existiert in allen lebenden Organismen. Die bekanntesten SODs besitzen entweder Kupfer und Zink (Cu/ZnSOD; SOD1), Mangan oder Eisen (Mn oder FeSOD; SOD2), oder auch Nickel (NiSOD) und katalysieren alle die gleiche Reaktion. Fe- und MnSODs sind strukturell ähnliche Enzyme mit geringfügig unterschiedlicher biologischer Bestimmung. Die induzierbare MnSOD wird durch das *sodA* Gen kodiert und die Regulation erfolgt gezielter als bei der FeSOD oder Cu/ZnSOD (*Hassan et al. 1994*).

Funktionelle Klassifikation:

Die Superoxiddismutase 2 (SOD2) ist eine Oxidoreduktase mit dimerer bzw. tetramerer Konformation und besitzt je ein Manganion pro Untereinheit. Bei Prokaryonten existiert die Mangan-SOD (MnSOD) in der Regel als dimere Form, bestehend aus zwei monomeren Einheiten mit einer hochkonservierten Verbindungsregion. In Eukaryonten dagegen liegt das Enzym generell in tetramerer Form vor. Jede Untereinheit dieses Oligomers besitzt wiederum eine metallbindende aktive Stelle, welche an der Verbindungsstelle der zwei Domänen lokalisiert ist, aus denen wiederum das Monomer aufgebaut ist (*Wagner et al. 1993*). Das Manganion selbst liegt hierbei in der Oxidationsstufe +III vor, zeigt ein Absorptionsmaximum bei 478 nm und ein Extinktionskoeffizienten von $850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ je aktive Seite. Die SOD2 katalysiert die sequentielle Reduktion und Oxidation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid. Das Enzym beeinflusst somit kritische Konzentrationen des Superoxidanion-Radikals ($\text{O}_2^{\cdot -}$) und von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in prokaryotischen Zellen bzw. eukaryotischen Mitochondrien.

Biologische Funktion:

Die primäre Funktion der MnSOD besteht in erster Linie im Schutz der Zelle und Mitochondrien vor Schäden durch freie Radikale wie das Superoxidanion. MnSOD wird bei Eukaryoten im Nucleus expremiert (*Ho et al. 1988*) und daraufhin gezielt in die mitochondriale Matrix gerichtet, da hier über 90 % des Sauerstoffs vom Organismus in der Atmungskette verarbeitet wird (*Chance et al., 1979*). Unter bestimmten Umständen kann eine MnSOD Überexpression allerdings auch Zellen schädigen. *E. coli* Bakterien die MnSOD überexpremierten, zeigten erniedrigte Wachstumsraten nach Behandlung mit Paraquat im Vergleich zu Zellen mit normalem MnSOD Level. Diese Bakterienzellen zeigen zudem eine Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase Defizienz, das durch ein Gen im sogenannten Superoxid Response Regulator (SoxR) des Bakteriums reguliert wird (*Privalle et al. 1992*). Die Untersuchungen unterstreichen die Hypothese, dass eine MnSOD Überexpression detrimental Effekte auslöst, was in einer unvollständigen Antwort auf zellulären Stress resultiert. Die dadurch erhöhten H_2O_2 Konzentrationen und das gleichzeitige Fehlen von Superoxidradikalanionen (Induktor des SoxR Regulons) macht die Bakterienzellen für oxidative Schäden angreifbar (*Liochev et al. 1991*).

Bei Mäusen mit cytosolischer Cu/ZnSOD Defizienz konnte eine hohe Mutationsrate beobachtet werden, Tiere mit einem sodA gen knockout hingegen überlebten nur die ersten drei Wochen. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass MnSOD eine lebenserhaltende Aufgabe für das Überleben in aerober Umgebung erfüllt (*Li et al. 1995*).

Direkte oxidative Schäden können jedoch auch durch andere Radikalspezies wie Peroxonitrit (OONO⁻) erfolgen und somit die MnSOD Aktivität beeinträchtigen. Peroxonitrit ist in der Lage humane MnSOD durch spezifische Nitrierung an der Aminosäure Tyr34 zu inaktivieren (*Yamakura et al. 1998*). Nitriertes hMnSOD wird darüber hinaus in einigen Fällen mit der chronischen Abstoßung von Nierentransplantaten in Zusammenhang gebracht (*MacMillan-Crow et al., 1996*). Unabhängig davon zählt die MnSOD zu den effektivsten antioxidativen Enzymen mit anti-Tumor Aktivität. Eine Gruppe von Studien mit unterschiedlichen Zelllinien konnte einen Zusammenhang zwischen MnSOD Überexpression und verzögertem Tumor-Wachstum belegen (*Behrend et al., 2003*). Die Schlussfolgerung, dass es sich bei der MnSOD auch um ein Tumorsuppressor-Protein handelt, konnte aus diesen Untersuchungen jedoch nicht gezogen werden. In vielen Krebsarten konnte eine erniedrigte MnSOD Aktivität festgestellt werden, obgleich auch dabei eine merklich erhöhte Expression beobachtet wurde (*Behrend et al., 2003*). Die erniedrigte Aktivität in bestimmten Tumoren wird dabei auf ein Defekt in der Genexpression zurückgeführt und nicht auf dessen Deletion. Dies stimmt wiederum mit der Tatsache überein, dass in einigen Tumoren die Konzentrationen der Übergangsmetallionen signifikant reduziert vorliegen. In bestimmten Tumorzellen konnte ebenfalls eine reduzierte Gesamtaktivität der SOD (Cu,Zn-SOD und MnSOD) festgestellt werden (*Oberley et al. 1988*). Allerdings konnte in Tumoren des Gastrointestinaltraktes eine erhöhte Expression der MnSOD detektiert werden und eine hohe MnSOD Expression korrelierte hierbei mit einer schlechten Überlebensprognose, fortgeschrittenem Stadium und einem invasivem, metastatischen Phänotyp. Abnormal hohe MnSOD Level, sowie unterdrücktes Zellwachstum stellen damit ein invasives Potential für Tumorzellen dar. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen der Superoxidradikal-Bildung und Wasserstoffperoxid Degradierung in Verbindung mit einer MnSOD Überexpression, ist möglicherweise an der Aktivierung des metastatischen Potentials von Krebszellen beteiligt.

Die extrazelluläre Superoxid Dismutase (EC-SOD) ist ein sekretorisches, tetrameres Glycoprotein, das Zink und Kupfer enthält. Es hat eine hohe Affinität für bestimmte Glycosaminoglykane wie Heparin und Heparinsulfat (*Mates et al., 1999*). Die Regulation in Säugerzellen erfolgt in erster Linie über Zytokine und nicht etwa unmittelbar durch oxidative Stimulii.

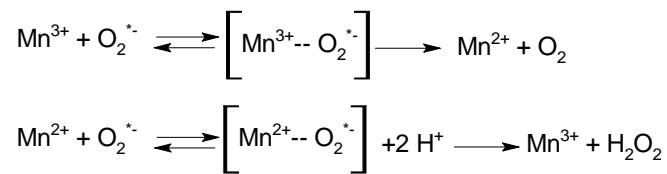
Mechanismus:

Alle SODs katalysieren den Abbau des Superoxidradikalanions (O₂^{*-}) zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, unabhängig welches katalytische Metallion gebunden ist.



Betrachtet man die Gesamtreaktion, so handelt es sich hierbei um einen Redoxprozess mit alternierender Oxidation und Reduktion des katalytisch aktiven Metallions. Im ersten Schritt bindet ein O₂^{*-} an das MnSOD Enzym und wird dabei zu molekularem Sauerstoff oxidiert. Das

Manganion wechselt hierbei die Oxidationsstufe von +III zu +II. Im zweiten Schritt bindet ein weiteres $O_2^{\cdot-}$ an das reduzierte Mn (+II) und wird daraufhin zu Wasserstoffperoxid reduziert, das Manganion erhält dabei die Oxidationsstufe (+III) zurück).



Sowohl die kinetische Rate, als auch das Absorptionsmaximum von MnSOD zeigen eine sigmoidale pH-Abhängigkeit. Dieses Verhalten wird auf eine ionisierbare Gruppe mit einem pKa-Wert von 9,4 im Molekül zurückgeführt und konnte der Aminosäure Tyr34 in der Nähe der aktiven Mangansseite zugeordnet werden. In weiteren Untersuchungen wurde die wichtige Rolle von Tyr34 für den katalytischen Zyklus belegt werden (*Hsu et al., 1996*).

Cu, Zn-SOD

Die Cu,Zn-SOD hat die molekulare Masse von 32 kDa und ist aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut (Homodimer) (*Mates et al., 1999*). Dieses Enzym katalysiert spezifisch die Dismutation von Superoxidanion-Radikalen zu Sauerstoff und Wasser. Jede Untereinheit enthält eine aktive Seite aus einem zweikernigen Metallcluster, aufgebaut aus Kupfer und Zinkionen. Die Enzymaktivität ist in einem Bereich von 5 bis 9,5 relativ unabhängig vom pH-Wert.

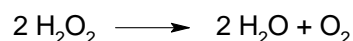
3.6.3 Katalase

Vorkommen:

Katalasen sind ubiquitäre Enzyme und kommen praktisch in allen aeroben Prokaryonten bzw. Eukaryonten vor, aber auch in einigen fakultativ anaeroben Organismen. In eukaryotischen Zellen ist das Enzym im Cytosol, in Mitochondrien und vor allem in den Peroxisomen lokalisiert (*Masters et al. 1995; Mates et al. 1999*). Bei den meisten Säugetieren wird die Katalase durch ein einziges Strukturgen kodiert, posttranskriptionelle Modifikationen führen allerdings zu einer breiten Heterogenität in der Enzymstruktur (*Pegg et al. 1986*).

Funktionelle Klassifikation: Hydrogenperoxid Oxidoreductase (EC 1.11.1.6.)

Katalasen können als Art Peroxidasen aufgefasst werden die darauf spezialisiert sind, die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser zu katalysieren. Die katalytische Reaktion selbst ist in diesem Fall ein exothermer Prozess:



Enzyme mit Katalase-Aktivität werden in vier Kategorien eingeteilt, aus denen drei Enzyme gut charakterisierten Genfamilien zugeordnet werden können:

- a) Die klassische monofunktionelle Häm-Katalase ist ein tetrameres Enzym, mit Variationen der kleinen oder großen Untereinheit. Diese Katalasen zählen zu der am meisten untersuchten Gruppe, insbesondere auf struktureller Ebene (*Bravo, 1997*).
- b) Katalasen die kein Häm, aber Mangan enthalten und bisher nur in Prokaryoten beobachtet wurden (*Beyer et al. 1985; Zamocky et al. 1999*).
- c) Die unter Prokaryoten weit verbreitete Häm-enthaltende Katalase-Peroxidase, wurde aber auch in niederen Eukaryoten entdeckt (*Fraaiji et al. 1996; Ruis 1997*).
- d) Schließlich eine Gruppe diverser Häm-enthaltender Enzyme, die Sekundärreaktionen mit geringer katalytischer Aktivität ausüben. Unter diese Enzyme zählt das Moglobin, Metmyoglobin und die Chlorperoxidase aus dem Pilz *Caldariomyces fumago*.

Biologische Funktion:

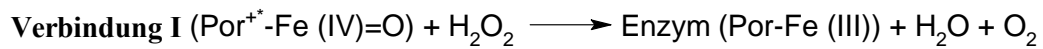
Obwohl das gesamte Spektrum an biologischen Funktionen der Katalase nicht vollständig geklärt ist, liegt ihre wichtigste Aufgabe in der Beseitigung niedermolekularer Peroxide wie Wasserstoffperoxid, welche direkt oder über mögliche Zerfallsprodukte, zelluläre Schaden anrichten können. Im Hinblick auf ihre protektive Rolle wird die Katalase in erster Linie durch oxidativen Stress induziert, was jedoch stark speziesspezifisch variiert. Bei Prokaryoten stellt die Antwort auf oxidativen Stress eine generelle Stressantwort dar, die ebenfalls auf Änderungen der Temperatur, des Salzgehaltes oder der Nährstoffzufuhr reagiert (*Scandalios, 1965*). Bei Eukaryoten hingegen können Faktoren wie z. B. allgemeine metabolische Veränderungen, Entwicklungsstörungen, Pathogenese, Strahlung, Hormone, extreme Temperaturen, hohe Sauerstoffkonzentrationen, sowie Wasserstoffperoxid in einer Aktivierung der Katalase resultieren. Neben dieser Schutzfunktion hat die Katalase auch physiologische Relevanz für die metabolische Oxidation von Methanol und Ethanol in einer Vielzahl lebender Organismen (*Oshino et al., 1973*). Unter physiologischen Bedingungen spielt die Katalase vermutlich auch eine Rolle bei der Kompartimentierung von Wasserstoffperoxid, dem eine potentielle Funktion als Second Messenger in bestimmten Signalwegen zugesprochen wird (*Burdon 1995; Khan et al. 1995*).

Mechanismus:

Die katalytische Dismutation von Wasserstoffperoxid durch Häm-Katalase erfolgt in zwei diskreten Stufen, in der jeweils ein Wasserstoffperoxid-Molekül beteiligt ist (*Schonbaum, 1976*). Das erste Substratmolekül wird zu Wasser reduziert und Katalase dabei zu einer Oxyferryl Spezies (Verbindung I) oxidiert (*Chance et al. 1950; Nicholls 1963*). Hierbei wird ein Oxidationsäquivalent auf das Eisen übertragen, das Zweite ist als Porphyrin Kation-Radikal delokalisiert (*Dolphin et al. 1971*).



Ein zweites Wasserstoffperoxidmolekül vervollständigt den katalytischen Zyklus und reduziert Verbindung I zurück zum nativen Fe (III) Zustand unter gleichzeitiger Freisetzung von Wasser und molekularem Sauerstoff (*Nicholls, 2001*).



Die Katalase zeigt unter den Enzymen eines der höchsten Umsatzraten und kann pro Enzym/Minute ungefähr 6 Millionen Moleküle Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandeln. Eine Vielzahl von Tumorzellen zeigt eine signifikant reduzierte Kapazität Wasserstoffperoxid zu detoxifizieren, was auf veringerte Katalase-Level zurückgeführt wird.

3.7 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Unter physiologischen Bedingungen wird eine übermäßige Bildung von ROS durch Antioxidantien abgefangen. Die direkte antioxidative Abwehr durch niedermolekulare Antioxidantien hat ebenfalls eine lebenswichtige Funktion für die Zelle, denn ein Mangel an Antioxidantien führt unmittelbar zu einer Zell- und Gewebeschädigung. Neben GSH (siehe Kap. 3.5.5) kommt unter den wasserlöslichen Antioxidantien besonders dem Vitamin C eine wichtige Rolle zu. Vitamin C stellt ein wichtiges Coenzym für die Prolyl-Hydroxylase dar, welches für die Kollagen-Biosynthese benötigt wird. Auch bei der Hydroxylierung von Steroiden und im Aufbau von Aminosäuren (L-Tyrosin) ist Vit. C ein wichtiger Cofaktor. Ein Vitamin C Mangel führt zu Skorbut. In der folgenden Tabelle (Tab. 9) sind weitere nicht-enzymatische Antioxidantien und ihre Konzentration im menschlichen Plasma aufgeführt:

Tabelle 9: Nicht-enzymatische niedermolekulare Antioxidantien im menschlichen Blutplasma. (*Stocker, 1991*).

Antioxidanz	Konzentration im Plasma
wasserlöslich:	
Glukose	4500 µM
Pyruvat	30-70 µM
Harnsäure	160-450 µM
Ascorbinsäure	30-150 µM
Bilirubin	5-20 µM
GSH	< 2 µM
Albumin	35 – 53 g/L
fettlöslich:	
Alpha-Tocopherol	15 – 40 µM
Ubiquinol-10	0,4 – 1 µM
Lycopene	0,5 – 1 µM
beta-Carotin	0,3 – 0,6 µM
Lutein	0,1 - 0,3 µM

4. Polyphenole

Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und sind mit über 8000 strukturellen Vertretern die am häufigsten vorkommenden Verbindungen in einer Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wie Obst, Gemüse, Hülsenfrüchte, Getreide, Schokolade, sowie in Getränken wie z. B. Tee, Kaffee, Wein und Fruchtsäften (auch Apfelsaft). Als sekundäre Metabolite in Pflanzen besteht ihre Funktion in erster Linie im Schutz vor UV-Strahlung und oxidativem Stress, sowie in der Abwehr von Pathogenen und Fraßfeinden und als Signalmoleküle. Neben ihrer antioxidativen Eigenschaften bilden eine Vielzahl polyphenolischer Verbindungen auch Pigmente, die in der äußeren Schicht bzw. Schale von Früchten lokalisiert sind und zu deren Farbgebung, Geschmack, Aussehen, sowie Stabilität der Zellwände beitragen. Zu den Polyphenolen gehört eine große Anzahl von Verbindungen, die je nach Anzahl der Phenolringe im Grundgerüst in unterschiedliche chemische Klassen eingeteilt werden. Hydroxybenzoesäure-Verbindungen haben einen C1-C6-Grundkörper, die Hydroxyzimtsäure-Verbindungen einen C3-C6-Grundkörper und die Flavonoide einen C6-C3-C6-Grundkörper (Abb. 18). Letztere Gruppe wird nochmals in sechs Unterklassen (Flavanole, Flavone, Isoflavone, Flavanone, Anthocyane und Flavanole) unterteilt (Abb. 19). Darüber hinaus können die Polyphenole mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zuckerreste, organischen Säuren und auch miteinander verbunden sein, was ihre biologische Vielfalt beträchtlich erhöht. Im Folgenden werden einige ausgewählte polyphenolische Vertreter etwas näher vorgestellt.

Flavan-Grundkörper

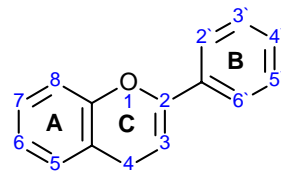


Abbildung 18: Flavan Grundgerüst

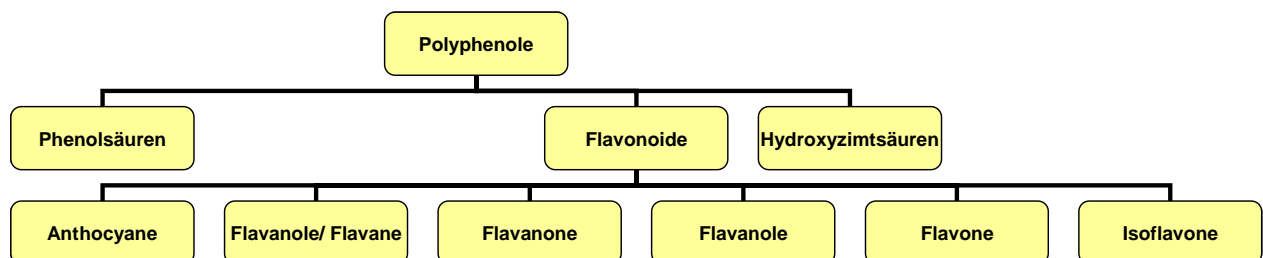
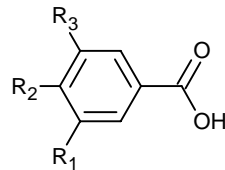


Abbildung 19: Einteilung der Polyphenole

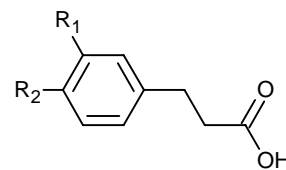
4.1 Phenolsäuren

Hydroxybenzoesäure-Derivate



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Protocatechusäure
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallussäure
 $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: Vanillinsäure
 $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: p-Hydroxybenzoesäure

Hydroxyzimtsäuren

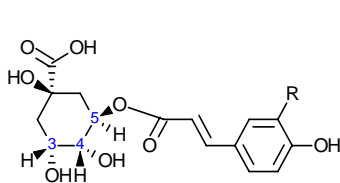


$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$: Coumarsäure
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Kaffeesäure
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ferulasäure

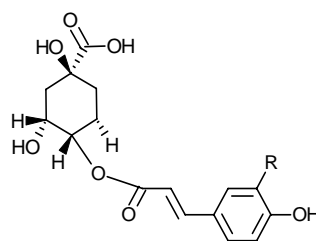
Abbildung 20: Chemische Struktur ausgewählter Phenolsäuren

Unter den Phenolsäuren werden u.a. Hydroxybenzoesäure-Derivate aufgefasst, zu denen die Protocatechusäure und Gallussäure zählen (Abb. 20). Sie kommen generell nur in relativ geringen Mengen in essbaren Pflanzen vor, mit der Ausnahme bestimmter roter Früchte, schwarzem Rettich und Zwiebeln, in denen sie durchaus Konzentrationen in zweistelligem mg-Bereich pro kg Frischgewicht erreichen können (Naczka *et al.* 2006; Crozier *et al.* 2009). Tee stellt eine wichtige Quelle für Gallussäure dar, welche in den Blättern Gehalte bis 4,5 g/ kg Frischgewicht erreichen kann (Tomas-Barberan *et al.* 2000). Als Hydroxyzimtsäure-Verbindungen kommen hauptsächlich Caffeoylchinasäuren, p-Coumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure vor, welche in Pflanzen üblicherweise in gebundener Form vorliegen. Hydroxybenzoesäuren sind darüber hinaus am Aufbau komplexer Strukturen, wie z. B. hydrolysierbare Tannine (Gallotannine in Mangos, und Ellagtannine in roten Früchten, wie Brombeeren, Erdbeeren und Himbeeren) beteiligt (Clifford, 2000).

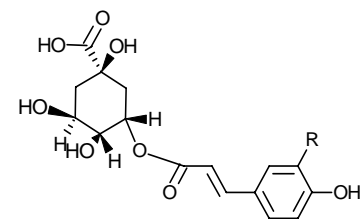
4.2 Hydroxyzimtsäuren



$R = \text{H}$: 5-Coumaroyl-L(-)-Chinasäure
 $R = \text{OH}$: 5-Caffeoyl-L(-)-Chinasäure
 (Chlorogensäure)
 $R = \text{OCH}_3$: 5-Feruloyl-L(-)-Chinasäure



$R = \text{H}$: 4-Coumaroyl-L(-)-Chinasäure
 $R = \text{OH}$: 4-Caffeoyl-L(-)-Chinasäure
 (Kryptochlorogensäure)
 $R = \text{OCH}_3$: 4-Feruloyl-L(-)-Chinasäure



$R = \text{H}$: 3-Coumaroyl-L(-)-Chinasäure
 $R = \text{OH}$: 3-Caffeoyl-L(-)-Chinasäure
 (Neochlorogensäure)
 $R = \text{OCH}_3$: 3-Feruloyl-L(-)-Chinasäure

Abbildung 21: Chemische Grundstruktur ausgewählter Hydroxyzimtsäure-Derivate

Die Hydroxyzimtsäuren sind verbreiteter als die Benzoesäuren und kommen in der Regel als p-Coumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure vor. Die Verbindungen liegen zumeist als glykosylierte Derivate oder Ester mit Chinasäure, Shikimisäure oder Weinsäure vor und sind in freier Form in verarbeiteten Lebensmitteln zu finden (Abb. 21). Chlorogensäure ist in zahlreichen Früchten, sowie in hohen Konzentrationen in Kaffee (70-350 mg/Tasse) und im Apfelsaft zugegen. Blaubeeren, Kiwis, Pflaumen, Kirschen und Äpfel haben mit 0,5-2g/ kg Frischgewicht die höchsten Gehalte an Hydroxyzimtsäuren (*Macheix, 1996*). In einer humanen Interventionsstudie lag die Absorption von Chlorogensäure bei etwa 33%, wohingegen im Urin nur Spuren gefunden werden konnten (*Olthof et al., 2001*). Der mengenmäßig größte Anteil erreicht den Dickdarm und ist dort unmittelbar dem Metabolismus durch die Darmflora ausgesetzt. In einer Rattenstudie konnten Gonthier et al. in diesem Zusammenhang ebenfalls eine sehr geringe Ausscheidung im Urin der Ratten beobachten, die mit Chlorogensäure gefüttert wurden. Dagegen konnte eine Exkretion hoher Mengen mikrobiell produzierter Metabolite der Chlorogensäure, wie Hippursäure und Coumarsäure nachgewiesen werden (*Gonthier et al., 2003a*). In einer anderen humanen Interventionsstudie konnten Olthoff et al. demonstrieren, dass die Hälfte der im Kolon aufgenommenen Chlorogensäure durch den mikrobiellen Metabolismus in Hippursäure umgewandelt wurde (*Olthof et al., 2003*).

4.3 Dihydrochalkone

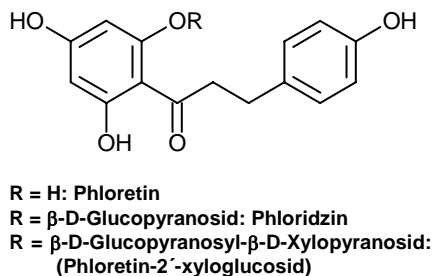
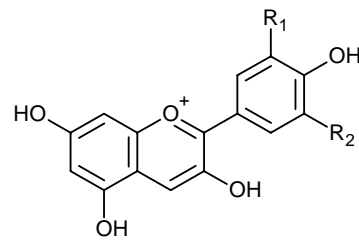


Abbildung 22: Chemische Grundstruktur ausgewählter Dihydrochalkone

Unter den Dihydrochalkonen zählt Phloretin zu den Hauptvertretern und ist glykosidisch gebunden mengenmäßig in Äpfeln zu finden (Abb. 22). Das Glycosid Phloridzin wird wahrscheinlich erst nach Hydrolyse durch das intestinale Enzym Laktase Phlorizin Hydrolase (LPH) in die Zellen aufgenommen. In einer Interventionsstudie mit Ratten, die mit Phloretin und Phloridzin gefüttert wurden, konnte im Plasma nur glukuronidiertes und sulfatiertes Phloretin nachgewiesen werden, wohingegen kein Phloridzin zugegen war (*Crespy et al., 2001*). Dies bestärkt die Annahme, dass Phloridzin erst nach Hydrolyse in die Zelle aufgenommen und anschließend glukuronidiert wird. Einerseits ist Phloridzin ein potenter SGLT1 Inhibitor, kann andererseits jedoch auch SGLT1 vermittelt in die Zelle transportiert werden. Für Phloridzin und Quercetin-Glucoside ist allerdings auch ein durch Multidrug resistance Proteine (MRP1) vermittelter Efflux aus der Zelle beschrieben (*Walle et al. 2003*).

4.4 Anthocyane



$R_1 = H; R_2 = H$: Pelargonidin
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Cyanidin
 $R_1 = R_2 = OH$: Delphinidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = H$: Päonidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OCH_3$: Malvidin

Abbildung 23: Chemische Grundstruktur ausgewählter Anthocyanidine

Als Anthocyane werden Polyhydroxy- bzw. Polymethoxyderivate des 2-Phenylbenzopyrylium-Salzes bezeichnet (Abb. 23). Anthocyane kommen in Obst und Gemüse in glykosylierter Form vor, das Aglykon wird als Anthocyanidin bezeichnet. Das Aglykon liegt in der Regel an Glucose, Galactose, Rhamnose, Xylose oder Arabinose gebunden vor (*Harborne et al. 2001; Mazza 1995*). In saurer Lösung tragen Anthocyanidine eine positive Ladung (*Mazza, 1993, 1995*). Anthocyanidine zeigen darüber hinaus in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Gegenwart chelatierender Metallionen eine intensive blaue, rote oder purpurne Färbung. Bei geringen pH-Werten (pH 1–3) überwiegt das rot-gefärbte, mesomeriestabilisierte Benzopyrylium- oder Flavylium-Kation (Abb. 24). Dieses ist nur in sehr saurem Milieu stabil und geht mit steigendem pH-Wert durch Anlagerung eines Hydroxid-Anions an das C2-Atom in die farblose Carbinolbase (Chromenol) über. Bei pH-Werten > 6 kommt es durch Wasserabspaltung zur Bildung der chinoiden Form bzw. der ionischen Anhydrobase, was zu einer Farbvertiefung zu Purpur führt. Bei pH-Werten oberhalb von 7 kann die tiefblau gefärbte, ionische Anhydrobase durch Ringöffnung in das gelbe Chalkon übergehen. Dieser Farbumschlag tritt bei den einzelnen Anthocyanen bei verschiedenen pH-Werten ein (*Mazza et al. 1993; Belitz et al. 2001; Fleschhut et al. 2006*). In der Natur kommen Anthocyane in der Regel im moderat sauren Zellsaft als Flavyliumsalz oder als Pseudobase vor.

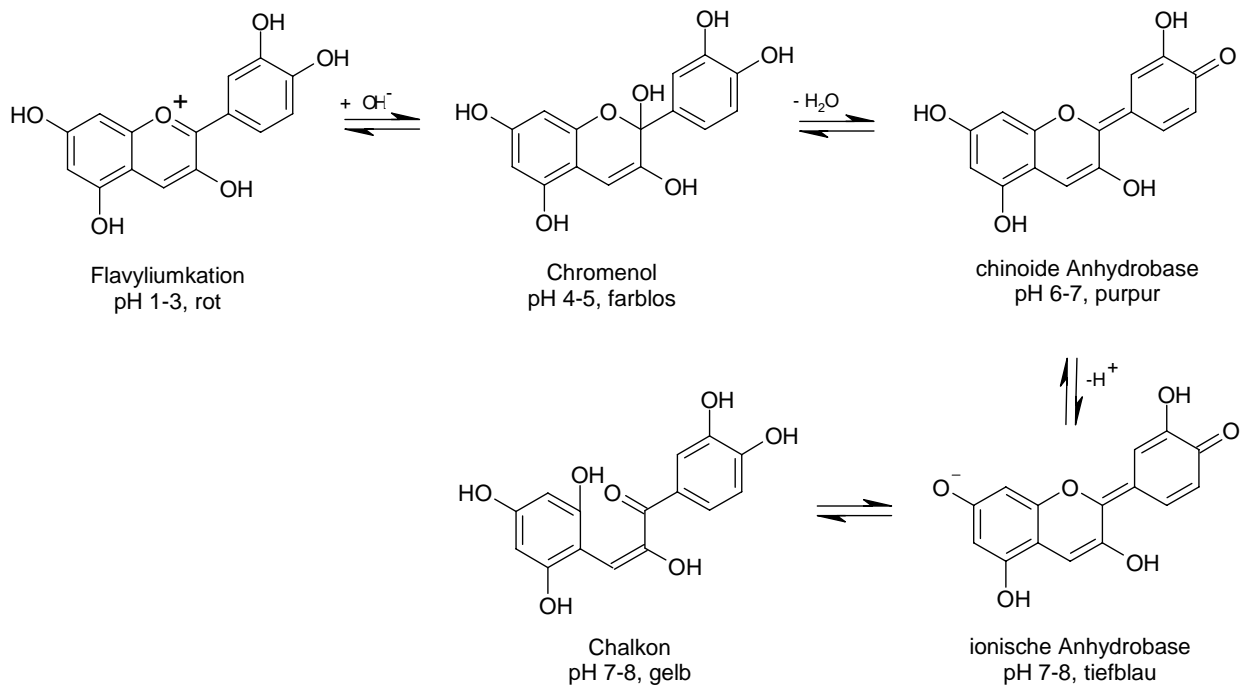


Abbildung 24: pH-Abhängigkeit der Struktur der Anthocyane (*Fleischhut 2006*)

Aufgrund der geringen Stabilität bei höheren pH-Werten zerfallen Anthocyane sehr leicht und reagieren nach Ringöffnung über die Zwischenstufe eines α -Diketons zum jeweiligen Aldehyd und der entsprechenden phenolischen Carbonsäure (Abb. 25).

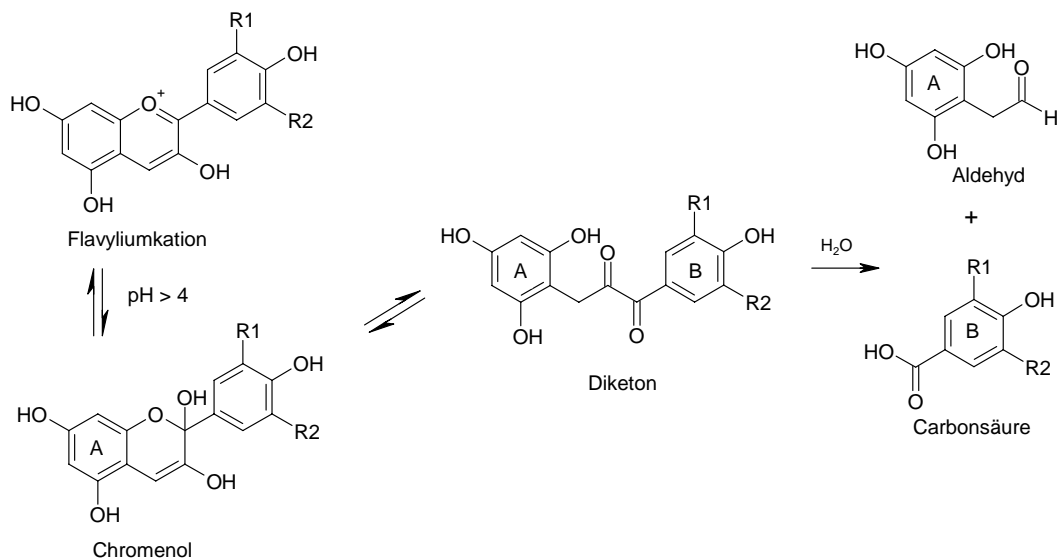


Abbildung 25: Mechanismus des Zerfalls von Anthocyanidinen

Zu den bekanntesten Aglyca zählen Cyanidin, Delphinidin, Pelargonidin, Päonidin, Petunidin und Malvidin. Der Zuckerrest ist in der Regel über die C3 Hydroxylgruppe an den C-Ring gebunden, es sind jedoch mehrere Hundert glycosylierter Anthocyanidine bekannt, die zudem an unterschiedlichen Positionen Zuckerreste tragen (*Harborne et al. 1957*). Die tägliche Aufnahme von Anthocyanen über die Nahrung beträgt in den USA etwa 200 mg. Die Aufnahme von Genistein, Quercetin und Apigenin liegt dagegen vergleichsweise nur bei etwa 20-25 mg/Tag

(*Hertog et al. 1993*). Die Aufnahme von Anthocyanen über die Nahrung wird in epidemiologischen Studien mit einem verringerten Erkrankungsrisiko für Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes, Arthritis und Krebs korreliert (*Prior et al. 2005, 2006*).

Aufgrund der phenolischen Struktur haben Anthocyane antioxidative Eigenschaften und können effektiv ROS abfangen (*Jiao et al. 2000; Wang et al. 2000*). Die antioxidative Wirksamkeit von Anthocyanen in-vitro konnte bereits anhand unterschiedlicher Zellkulturmodelle, u.a. des Kolons (*Parry et al. 2006; Renis et al. 2008*), des Endothels (*Bagchi et al., 2004*), der Leber (*Meyers et al. 2003; Shih et al. 2007*), Brust (*Olsson et al. 2004*), an Leukämiezellen (*Feng et al. 2007*) und an Keratinozyten (*Afaq et al. 2007*) demonstriert werden. Anthocyane entfalten antikanzerogene und antioxidative Wirkungen, die sich u.a. in Folgenden Eigenschaften äußern (*Kong et al., 2003*):

- Direkte radikalabfangende Aktivität
- Steigerung der ROS-abfangenden Kapazität der Zelle
- Induktion antioxidativer Enzyme
- Reduktion der Bildung oxidativer DNA-Addukte
- Hemmung der Lipidperoxidation
- Hemmung der durch Toxine und Kanzerogene ausgelösten Mutagenese
- Hemmung der Zellproliferation durch Modulation von Signalwegen
- Chelatierung von Übergangsmetallionen
- Bindung an Proteine (regulatorische Enzyme)

Die direkte radikalabfangende Wirksamkeit wird hierbei in erster Linie durch die Anwesenheit von Hydroxylgruppen in 3'-Position des C-Rings, sowie in 3'-, 4'-, und 5'-Position des B-Rings verursacht. Diese Eigenschaft ist für die Akylya am stärksten und nimmt mit zunehmender Glycosylierung ab. Darüber hinaus konnten Shih et al. *in-vitro* zeigen, dass Anthocyane die Expression antioxidativer Enzyme induzieren (*Shih et al., 2007*). So konnte in Rattenleber Klon 9 Zellen (*Shih et al., 2007*), sowie in nicht-malignen Brustkrebszellen (*Meyers et al., 2003*) mit Anthocyanen eine Induktion Glutathion-assoziiierter Enzyme (GSR, GPX, GST), sowie der NQO1 beobachtet werden. Als Mechanismus wird die Aktivierung über das antioxidant response elements (ARE) diskutiert. Die Autoren folgern hieraus, dass der ARE-vermittelten Enzymexpression durch Anthocyane ein wichtiger Beitrag in der zellulären Abwehr von oxidativem Stress zukommt (*Shih et al., 2007*). Für bestimmte Anthocyanidine ist eine selektive Proliferationshemmung in Tumorzellen beobachtet worden, die bei normalen Zellen nicht auftritt (*Galvano et al. 2004; Hakimuddin et al. 2004*). Delphinidin hemmt z.B. die Phosphorylierung der Extracellular regulated MAP kinase (ERK), sowie die des c-jun N-terminal kinase (JNK) Signalwegs, wohingegen p38 nicht inhibiert wird. In der Folge wird die Aktivierung des mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalwegs blockiert, was schließlich in einer Hemmung der Tumorgenese resultiert (*Hou et al. 2003, 2004*). Eine Antitumorwirkung kann sich auch in Form von Apoptoseinduktion in prämaligen und malignen Zellen äußern. Anthocyanreiche-Extrakte aus Beeren und Trauben, sowie isolierte Anthocyane und Anthocyanidine haben das Potenzial in-vitro proapoptotische Effekte in einer Vielzahl von Zelltypen zu entfalten (*Olsson et al. 2004; Chen et al. 2005, 2006; Seeram et al. 2006; Afaq et*

al. 2007). Die Apoptose kann dabei sowohl durch intrinsische (mitochondrial), als auch extrinsische (TNF receptor superfamily, member 6; FAS) Signalwege ausgelöst werden (Reddivari et al. 2007).

4.5 Flavonole

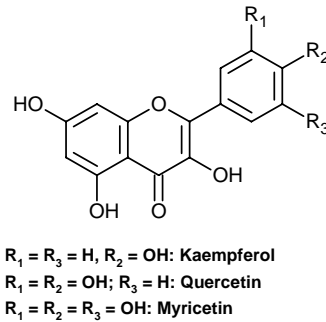


Abbildung 26: Chemische Grundstruktur ausgewählter Flavonole

Flavonole bilden die häufigste Gruppe von Flavonoiden in Pflanzen, zu den Hauptvertretern zählen hierbei Quercetin und Kaempferol (Abb. 26). In der Regel kommen diese in niedrigen Gehalten von ungefähr 15-30 mg/ kg Frischgewicht vor. Die Hauptquelle bilden Zwiebeln (bis zu 1,2g/ kg Frischgewicht), Grünkohl, Brokkoli, Porree und Heidelbeeren. Rotwein und Tee können zudem bis zu 45 mg/ L Flavanole enthalten. Die Verbindungen liegen in erster Linie in glykosylierter Form mit unterschiedlichen Zuckern wie Glucose, Rhamnose, Galaktose, Arabinose, Xylose oder Glucuronsäure vor. Aufgrund der lichtabhängigen Biosynthese von Flavonoiden in Pflanzen sind diese hauptsächlich in den äußeren Randgeweben (Schale, Haut, Blätter) lokalisiert. Je nach Lichtexposition können daher bereits innerhalb einer Frucht Unterschiede in der Flavonoid-Konzentration herrschen (Price, 1995). Die Glykosidkonzentration in den äußeren grünen Blättern von Kohl und Kopfsalat ist z. B. zehnmal größer als in den inneren hellen Blättern (Starke et al. 1976). Dieses Phänomen ist auch für die höheren Flavonol-Gehalte in Cherry-Tomaten verantwortlich, da diese ein unterschiedliches Größenverhältnis von Haut zur Frucht im Vergleich zu normalen Tomaten aufweisen.

4.6 Flavone

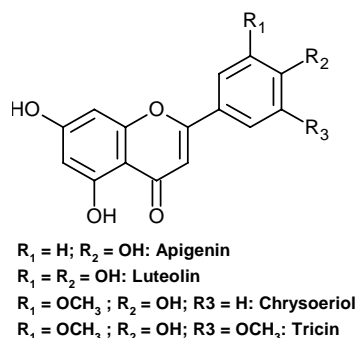


Abbildung 27: Chemische Grundstruktur ausgewählter Flavone

Unter den Flavonen findet man hauptsächlich Glykoside von Luteolin und Apigenin (Abb. 27). Die wichtigste Quelle aus Lebensmitteln stellen nachwievor Petersilie und Sellerie dar. In Weizen und Hirse findet man überwiegend C-Glykoside von Flavonen. Die Schale von Zitrusfrüchten enthält hohe Mengen an polymethoxylierten Flavonen, wie z. B. Tangeretin, Nobiletin und Sinensetin (bis zu 6,5 g/L aus Mandarinenöl), diese zählen zu den am wasserunlöslichsten Flavonoiden.

4.7 Flavanole

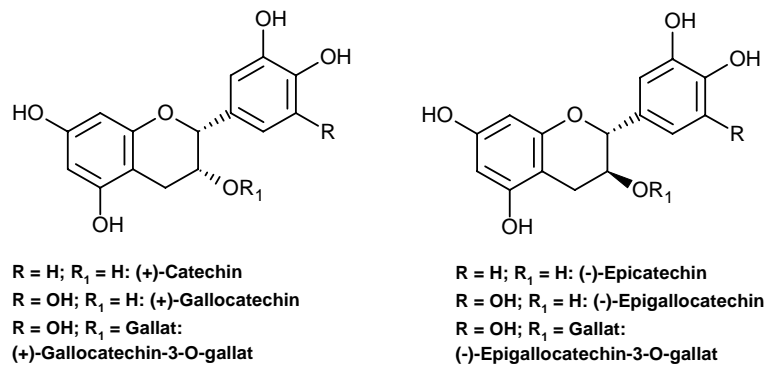


Abbildung 28: Chemische Grundstruktur der Flavan-3-ole und ausgewählte Vertreter

Flavanole existieren sowohl in monomerer Form (Catechine), als auch in polymerer Form (Proanthocyanidine) (Abb. 28). Catechine sind in vielen Früchten präsent und beispielsweise Aprikosen enthalten mit bis zu 250 mg/kg Frischgewicht die höchsten Gehalte. Auch Rotwein (bis zu 300 mg/L), Schokolade und Grüntee (bis zu 200 mg/ Aufguss) zählen zu den reichsten Catechinquellen. Schwarztee enthält dagegen weniger monomere Flavanole, da diese bereits durch die Fermentation der Teeblätter zu komplexeren Polyphenole wie Theaflavin (Dimer) und Thearubigin (Polymer) kondensiert werden. Gallocatechin, Epigallocatechin und Epigallocatechin-Gallat (Abb. 24) werden in Samen von Hülsenfrüchten, Trauben und besonders in Tee gefunden (*Arts et al., 2001*). Catechin und Epicatechin werden beide durch die Dünndarmepithelzellen absorbiert (*Spencer et al., 2001*). Im Gegensatz zu Quercetin wird Epicatechin jedoch nicht glukuronidiert. Eine Glukuronidierung konnte weder mit humanen Lebermikrosomen, noch durch den Dünndarm, oder das Dickdarmgewebe beobachtet werden. Obwohl die Leber und auch das Darmgewebe mit sogenannten UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) ausgestattet ist, erfolgt der Metabolismus von Epicatechin primär über Sulfatierung in der Leber und im intestinalen Zytosol (*Vaidyanathan et al. 2003*).

4.8 Proanthocyanidine

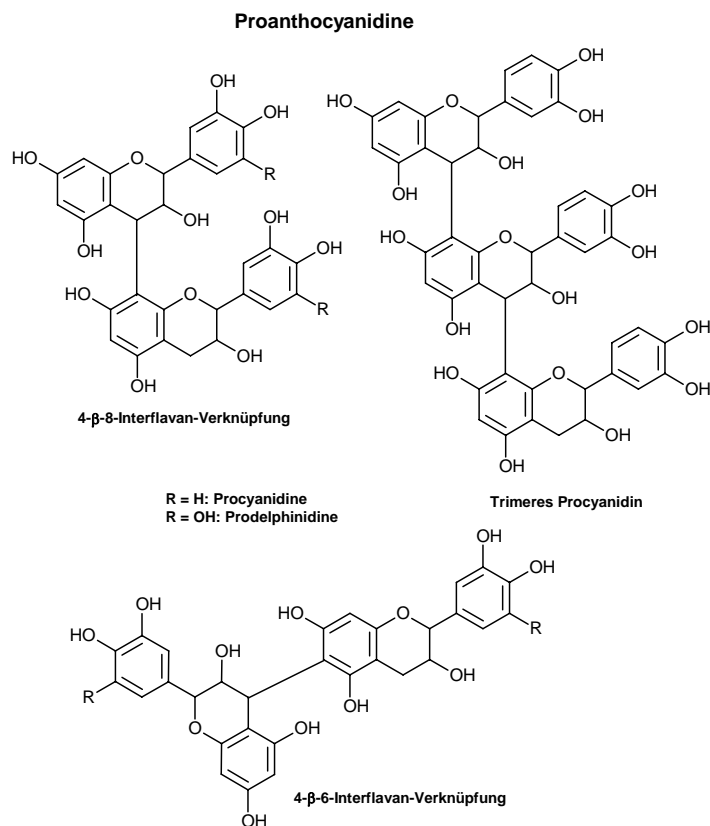


Abbildung 29: Chemische Strukturen ausgewählter Proanthocyanidine

Proanthocyanidine, auch als kondensierte Tannine bekannt, liegen als Dimere, Oligomere und Polymere von (Epi)Catechin-Einheiten vor, die durch C4 und C8 (oder C6) miteinander verknüpft sind (Abb. 29). In Tab. 10 ist beispielhaft für Apfel und Apfelsaft der Gehalt an Proanthocyanidinen dargestellt, eine detaillierte Aufzählung weiterer Lebensmittel ist von Gu et al. beschrieben (*Gu et al., 2004*). Die Flavan-3-ol Untereinheiten können Acyl oder Glycosyl-Substituenten aufweisen. Die häufigste Acylgruppe bildet hierbei die Gallussäure, welche mit der Hydroxylgruppe an C3 Position verestert ist und z. B. in Tee oder Wein vorkommt (*Plumb et al., 1998*).

Tabelle 10: Gehalt von Proanthocyanidinen in Apfel und Apfelsaft¹⁾; nach (*Gu et al., 2004*)

Lebensmittel	Monomere	Dimere	Trimere	4-6 mer	7-10 mer	>10 mer	Gesamt	Typ ²⁾
Apfel ³⁾	9,6 ± 0,9	13,8 ± 0,6	9,3 ± 0,4	30,2	25,4 ± 1,2	37,6 ± 2,6	125,8 ± 6,8	PC
Apfelsaft	1	2	1	4	1	N.D.	9	PC

¹⁾ Alle Angaben bezogen auf mg/ 100g Frischgewicht Lebensmittel, oder mg/L Getränk

²⁾ PC: Procyanidine

³⁾ Red Delicious mit Schale

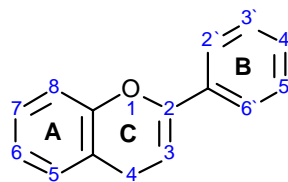
ND: nicht bestimmt; Mittelwert ± SD, n= 4-8

Proanthocyanidine findet man insbesondere in Früchten, Beeren, Bohnen, Nüssen, Kakao und Wein. Durch die Bindung an Speichelproteine entsteht beim Verzehr von Früchten (Trauben,

Pfirsiche, Äpfel, Birnen, Beeren, etc.), Getränken (Wein, Most, Tee, Bier, etc.) oder Schokolade der typische bittere Geschmack bzw. die adstringierende Wirkung. Die Wirkung kann jedoch je nach Reife der Frucht oder Verarbeitungsgrad des Lebensmittels unterschiedlich stark sein (*Deprez et al., 2000; Scalbert et al., 2000*). Die Mehrzahl der Studien über die Aufnahme und den Metabolismus von polymeren Proanthocyanidinen deuten darauf hin, dass diese unverändert den Dünndarm passieren und erst durch die Mikroflora im Kolon in Monophenole und Phenolsäuren gespalten werden (*Manach et al., 2004*). Déprez et al. konnten nach einer 48 stündigen in vitro Inkubation von Procyanidinen mit humaner Darmmikroflora einen vollständigen Abbau zu niedermolekularen Phenolsäuren demonstrieren (*Deprez et al., 2000*). Unter den Abbauprodukten wurden Phenylacetat, Phenylpropionsäure, und Phenylvalerinsäure identifiziert. Ähnliche Metabolite wurden auch von Gonthier et al. in vivo im Urin von Ratten gefunden, die über fünf Tage entweder Catechin Monomere, Procyanidin B3, C3, oder eine Polymermischung aus einer Fraktion des Weidenbaums ins Futter gemischt bekamen (0,1% w/w) (*Gonthier et al., 2003b*).

4.9 Strukturelle Voraussetzungen für das antioxidative Potenzial von Flavonoiden

Die antioxidative Aktivität von Flavonoiden wird vor allem durch ihre strukturellen Eigenschaften bestimmt. Dieser Aspekt wurde bereits gründlich von Rice-Evans et al. und van Acker et al., sowie von vielen anderen Autoren eingehend diskutiert (*Rice-Evans et al. 1995; Brown et al. 1998; Kerry et al. 1998; van Acker 1998*). Eine Übersicht der wichtigsten Erkenntnisse aus diesen Studien wird im Folgenden kurz aufgeführt. Als wesentliche Merkmale für das antioxidative Potenzial wurden folgende Faktoren charakterisiert:



- Die Catechol- (o-dihydroxy) Gruppe im B-Ring zeigt sehr gute radikalabfangende Wirksamkeit.
- Eine Pyrogallol- (trihydroxy) Gruppe, wie es z. B. im Myricetin der Fall ist, resultiert in einer besonders hohen antioxidativen Wirksamkeit.
- Die C2-C3 Doppelbindung im C-Ring trägt ebenfalls entscheidend bei, durch Stabilisierung des Phenoxy-Radikals.
- Zusammen mit der C2-C3 Doppelbindung im C-Ring, bewirkt die 4-Oxogruppe (Keto-Doppelbindung an Position 4 des C-Rings) eine zusätzliche Steigerung des antioxidativen Potenzials, da hieraus eine Delokalisation der Elektronen im B-Ring resultiert.
- Die 3-OH-Gruppe im C-Ring generiert einen extrem aktiven Radikalfänger.
- Die Kombination aus C2-C3 Doppelbindung und einer 4-oxo Gruppe, erweist sich als wirksamste Konfiguration innerhalb der Catecholgruppe.
- Eine 5-OH und 7-OH Gruppe kann unter Umständen ebenfalls radikalabfängendes Potenzial entfalten.

Bezüglich dieser Kriterien erweist sich Myricetin als besonders potenter Radikalfänger, gefolgt von Quercetin. Obwohl z.B. Kaempferol nur eine Hydroxygruppe im B-Ring (4'-OH) aufweist, entfaltet es dennoch ein hohes antioxidatives Potenzial. Verantwortlich hierfür ist die strukturelle Kombination der C2-C3 Doppelbindung, 3-OH Gruppe, sowie 4-oxo Gruppe im C-Ring des Kaempferol-Moleküls. Im Vergleich dazu ist Catechin dagegen ein schwacher Radikalfänger, trotz Catecholgruppe im B-Ring und 3-OH Gruppe im C-Ring. Hier fehlt die C2-C3 Doppelbindung, sowie die 4-oxo Gruppe im C-Ring (*Alexandrakis et al. 1999; Middleton et al. 2000*).

5. Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

Aufgrund starker struktureller Diversität, existieren große Unterschiede in der Bioverfügbarkeit polyphenolischer Inhaltsstoffe (*Prasain et al. 2007*). Es zeigt sich, dass die Flavonoide mit dem höchsten Vorkommen im Lebensmittel nicht zwingend die größte Bioverfügbarkeit aufweisen. Mit Ausnahme einiger Vertreter der Flavanole kommen die Flavonoide ausschließlich in glykosylierter Form vor. Das Schicksal von Glykosiden im Magen trakt ist bisher noch nicht geklärt. Die überwiegende Mehrheit der Glykoside widersteht vermutlich einer sauren Hydrolyse im Magen und gelangt in intakter Form in den Darm (Abb. 30). In experimentellen Studien an Ratten konnte z.B. eine Absorption von Quercetin bereits im Magen beobachtet werden, dagegen nicht für das entsprechende Glykosid. Erreichen polyphenolische Verbindungen die Enterozyten, werden sie durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme bevorzugt glucuronidiert, methyliert oder auch sulfatiert. In Abb. 31 ist eine vereinfachte Darstellung des Metabolismus von Flavonoiden im Enterozyten dargestellt. Durch sogenannte Multidrug resistance Proteine kann ein Rücktransport von β -Glucosiden auf die basolaterale Seite erfolgen (*Walle et al., 1999*), allerdings konnte dies bislang nur an Caco-2 Zellen demonstriert werden (*Andlauer et al. 2000; 2004*).

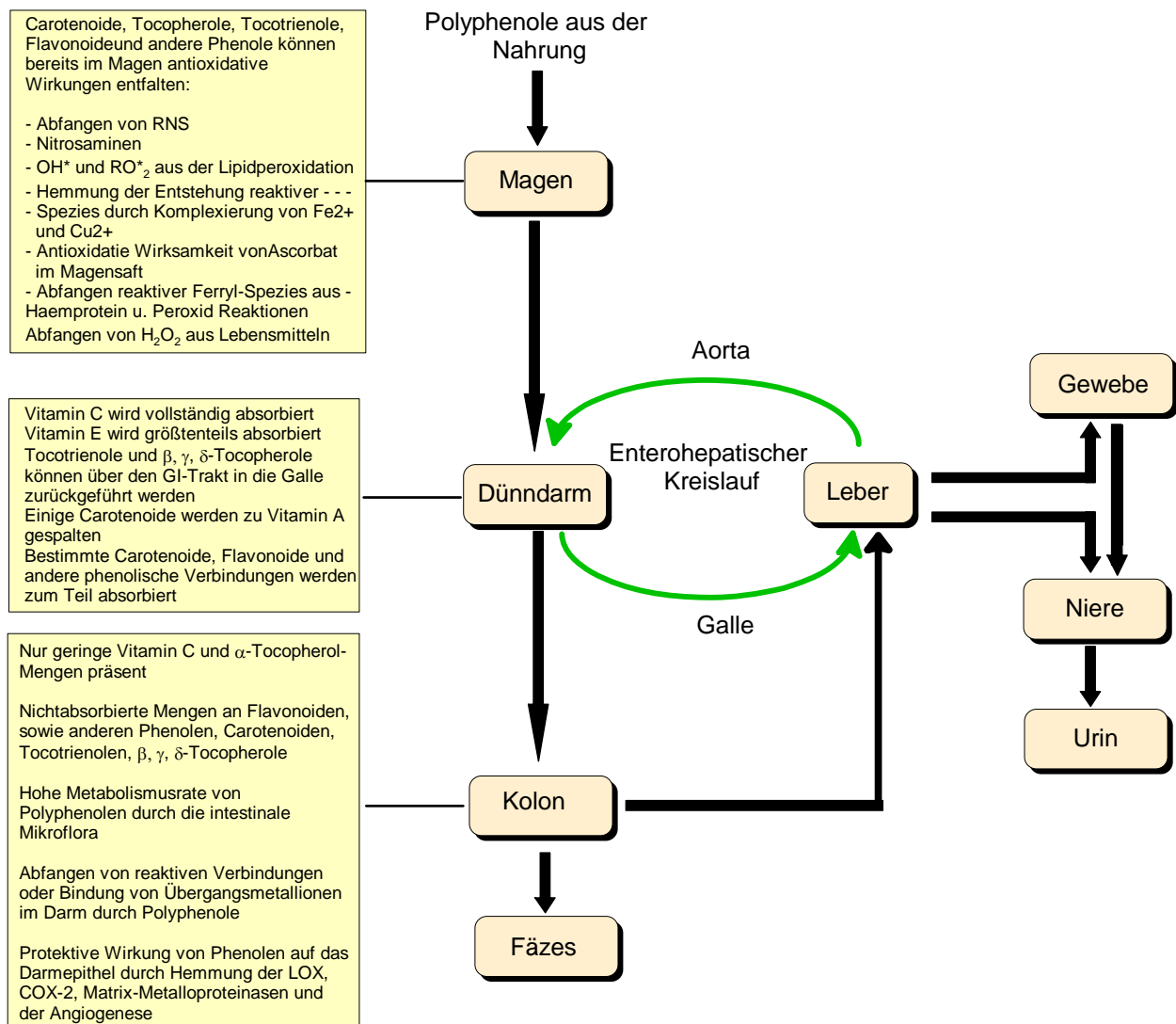


Abbildung 30: Schicksal von Polyphenolen und anderen Lebensmittelinhaltsstoffen im menschlichen Gastrointestinaltrakt (modifiziert nach *Scalbert et al. 2002*).

Die Abbildung ist ein repräsentatives Modell bei normaler Ernährung. Wasserstoffperoxid kann bereits schon im Mundraum durch Katalase und Peroxidase im Speichel zersetzt werden, oder nach Aufnahme und Katabolismus im oesophagalen Epithel. Abkürzungen: RNS: Reaktive Stickstoffspezies; OH^* : Hydroxyleadikal; RO^* : Alkoxyradikal; RO^*_2 : Peroxylradikal; LOX: Lipoxygenase; COX-2: Cyclooxygenase-2.

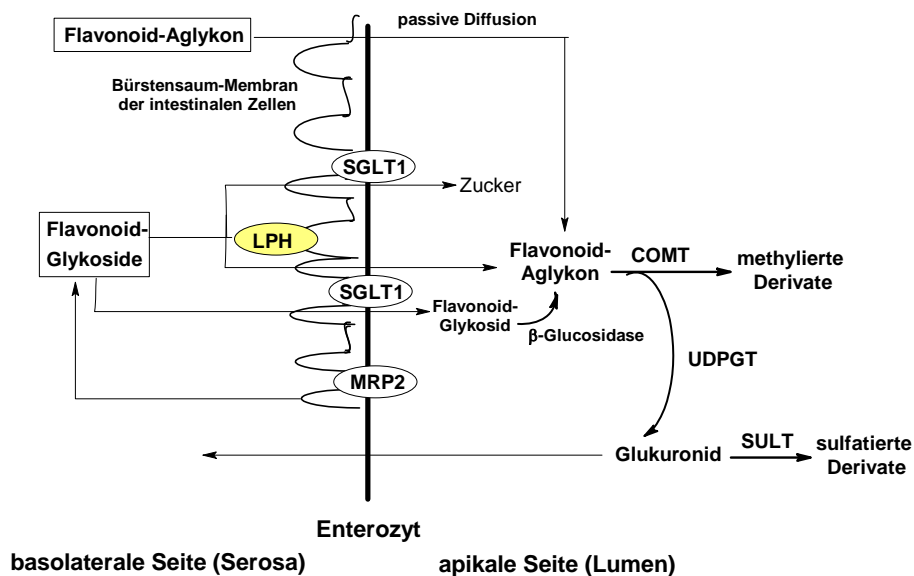


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Transports und Metabolismus von Flavonoiden im Enterozyten. Modifiziert nach (*Prasain et al. 2007*). Abkürzungen: COMT: Catechyl-o-methyltransferase; SGLT1: Sodium-dependent glucose transporter (Na-abhängiger Glukosetransporter); LPH: Lactase phlorizin hydrolase; UDPGT: Uridine diphosphate glucuronosyl transferase; MRP2: multidrug resistance protein 2; SULT: Sulfotransferase.

Für die Charakterisierung biologischer Effekte polyphenolischer Inhaltsstoffe ist eine Aussage über deren Bioverfügbarkeit und Metabolismus im Organismus von entscheidender Bedeutung. Bislang existieren nur wenige in-vivo Studien über die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen. In einer Humanstudie wurde die Bioverfügbarkeit phenolischer Inhaltsstoffe aus einem alkoholischen Apfelmost untersucht (*DuPont et al., 2002*). Nach Aufnahme von 1,1 L Apfelmost konnte im Plasma kein Quercetin nachgewiesen werden. Dagegen wurden 60 Minuten nach Verzehr geringe Mengen an 3'-Methyl-Quercetin und 4'-Methyl-Quercetin identifiziert. Kaffeesäure wurde schnell absorbiert und war noch innerhalb der ersten 90 Minuten nachweisbar. Catechin, Epicatechin und Phloridzin waren dagegen im Plasma nicht mehr nachweisbar, möglicherweise auch aufgrund bereits zu geringer Gehalte im Mostsaft. Dagegen wurden im Urin erhöhte Gehalte an Hippursäure und Phloretin beobachtet, Quercetin, Catechin und Epicatechin waren dagegen nicht nachweisbar (*DuPont et al., 2002*). In einer anderen humanen Interventionsstudie konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Äpfeln nur etwa 30 % der aus Zwiebeln betrug (*Hollman et al. 1997*). Das Maximum im Plasma wurde hierbei erst nach 2,5 h erreicht, da die Verbindungen vor der Identifizierung erst hydrolysiert werden mussten, blieb der genaue Gehalt an Quercetin-Konjugaten unklar. Die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Äpfeln oder aus Zwiebeln, sind möglicherweise auf unterschiedliche Quercetin-Konjugate in den beiden Lebensmitteln zurückzuführen. Demnach enthalten Zwiebel Quercetin-Aglyka, wie auch Glykoside, wohingegen in Äpfeln Quercetin-Monoglykoside und Quercetin-Rutinosid vorherrschen (*Hollman et al. 1997*). Wurden Caco-2 Zellen mit Apfelschalenextrakten inkubiert, konnte keine Akkumulation von Quercetin in den Zellen beobachtet werden, das Quercetin-3-Glucosid wurde dagegen in geringen Mengen (4%) absorbiert worden. In Apfelschalen ist kein freies Quercetin

gegenwärtig und wie sich zeigte, war die Absorption von Quercetin aus Zwiebeln deutlich höher (*Boyer et al., 2004, 2005*). Walle et al. konnten in einer humanen Interventionsstudie mit Ileostoma-Patienten, freies Quercetin in der Ileostoma-Flüssigkeit nachweisen. Hierbei wurde eine Spaltung der Quercetin-Glucoside durch die β -Glucosidase diskutiert, wodurch die Aglyka passiv transportiert werden können (*Walle et al., 2000*). Intakte Glykoside könnten über sogenannte SGLT1-Transporter vermittelt in die Zelle aufgenommen werden. Beispielweise wurden Quercetin-3-Glucoside bevorzugt nach Hydrolyse durch die LPH aufgenommen, wohingegen Quercetin-4-Glucoside beide Transportwege nutzen können (*Day et al., 2003*). In Äpfeln sind darüber hinaus noch viele andere Quercetin-Konjugate enthalten, wie z.B. in Form von Rhamnosid-, Xylosid-, oder Galactosid-Zuckerresten. Letztere Glykoside werden jedoch nicht so leicht durch die LPH gespalten und daher auch nicht ohne Weiteres in die Dünndarmzellen aufgenommen. Im menschlichen Intestinaltrakt sind zudem zahlreiche unterschiedliche Bakterienstämme gegenwärtig, die ihrerseits den Metabolismus von Glykosiden beeinflussen. So konnte in humanen Faeces-Bakterien der Stämme *Enterococcus casseliflavus*, sowie *Eubacterium ramulus* isoliert werden. Diese Bakterien sind z.B. in der Lage Quercetin-3-Glucosid als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen und über mehrere Zwischenstufen bestehend aus niedermolekularen phenolischen Verbindungen bis hin zum Butyrat abzubauen (*Schneider et al., 1999*) (Abb. 28). *Enterococcus casseliflavus* z.B. verwertet nur das Zuckergerüst des Glukosids, wogegen *Eubacterium ramulus* auch das phenolische Ringsystem metabolisiert und dabei Phloroglucinol als Zwischenstufe produziert (*Blaut et al., 2003; Schoefer et al., 2003*).

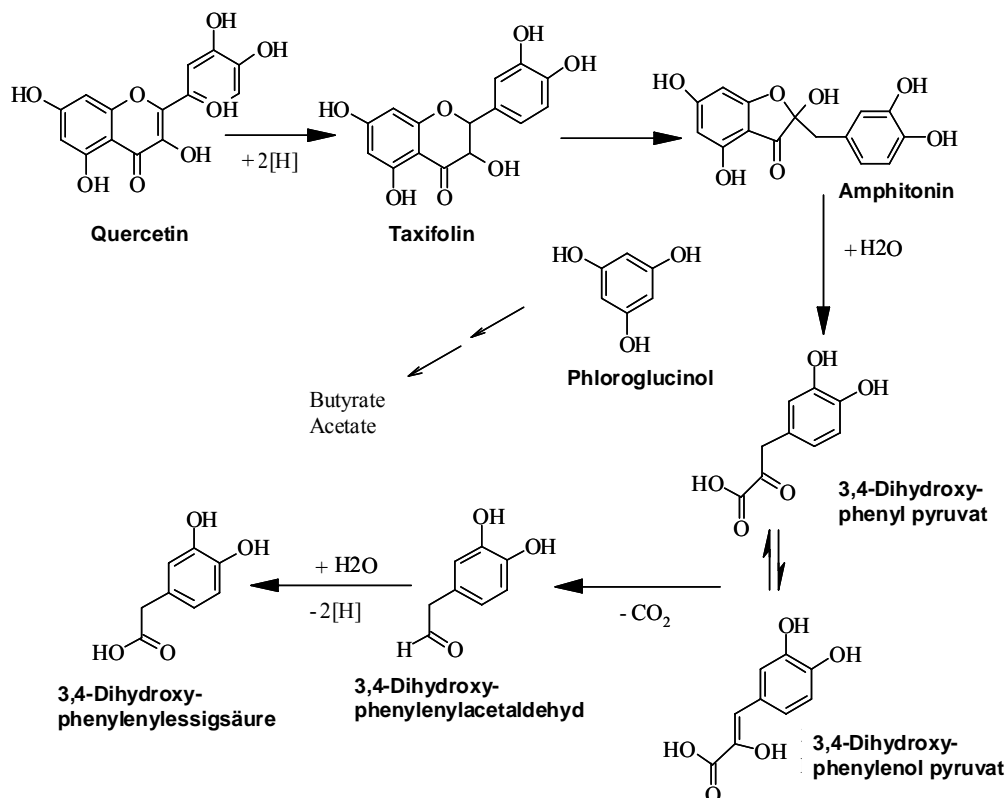


Abbildung 32: Quercetin-Abbau durch *Eubacterium ramulus*.
Vorgeschlagener Mechanismus nach *Blaut et al., 2003; Schoefer et al., 2003*.

Zusammengefasst lässt sich für die genannten Beispiele festhalten, dass die meisten Flavonoid-Aglyka in die intestinalen Epithelzellen aufgenommen werden können, wo sie weiteren Konjugationsschritten unterliegen. Flavonoid-Glycoside werden zudem nur in sehr geringen Mengen absorbiert, dagegen vermehrt nach Hydrolyse durch das LPH-Enzym. Für die Aufklärung der Bioverfügbarkeit und des Metabolismus sind daher weitergehende Untersuchungen erforderlich. Gerade im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit polyphenolischer Inhaltsstoffe nach dem Verzehr ganzer Früchte, wie es z.B. für den Apfel der Fall ist, müssen weitere Faktoren wie Lebensmittelmatrix/ Beschaffenheit, Wechselwirkung mit anderen Apfelinhaltsstoffen und die Verdauung berücksichtigt werden (*Boyer and Liu, 2004*).

5.1 Wirkung von Flavonoiden im Gastrointestinaltrakt

Es ist durchaus möglich, dass Flavonoide und andere phenolische Verbindungen ihre antioxidativen und protektiven Effekte bereits im Magen, Dünndarm und Kolon vor der Absorption entfalten können (*Halliwel, 2000*). Dies bietet eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt flavonoidreicher Lebensmittel im Schutz gegen Magen- und Darmkrebs. Kyle et al. konnten in einer Fall-Kontroll Studie mit 264 Darmkrebspatienten und 408 gesunden Probanden eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von Flavonolen (insbesondere quercetin-haltige Lebensmittel) und dem Kolonkrebsrisiko belegen (*Kyle et al., 2009*). Hierbei muß jedoch auch beachtet werden, dass ein präventives Potenzial nicht unbedingt nur auf die antioxidative Wirksamkeit der Flavonoide zurückgeführt werden kann, sondern auch weitere Inhaltsstoffe möglicherweise hierzu beitragen. Zum Beispiel konnte nach Aufnahme von grünem Tee eine rapide Abnahme an Prostaglandin E₂ Konzentration in der humanen rektalen Mukosa beobachtet werden, was gleichzeitig mit einer Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität einhergeht (*August et al., 1999*), ein potentiell krebspräventiver Mechanismus. Die Grundlage für diese Hypothese ist die Tatsache, dass die Plasmakonzentration unkonjugierter polyphenolischer Verbindungen zwar sehr gering ist ($\leq 1 \mu\text{M}$), jedoch im Magen und Darm nach Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel und Getränke durchaus höhere Konzentrationen gegenwärtig sein können (*Jenner et al. 2005*). Es ist jedoch bekannt, dass die polyphenolischen Metabolite eine geringere antioxidative Wirksamkeit aufweisen, da potenziell radikalabfangende OH-Gruppen durch Methylierung, Sulfatierung oder Glucuronidierung blockiert vorliegen können (*Manach et al. 2004; Williamson et al. 2005*). Die antioxidative Kapazität im Plasma liegt im Bereich von 1 mM Trolox oder höher, es erscheint daher schwer vorstellbar, dass die zusätzlichen 1 μM der Polyphenolkonzentration in vivo eine deutliche antioxidative Wirkung entfalten können (*Halliwel, 2006b*). In einigen Humanstudien konnte jedoch eine deutliche Erhöhung der total antioxidant capacity (TAC) durch eine polyphenolreiche Ernährung beobachtet werden. Doch man darf hierbei nicht außer Acht lassen, dass diese Lebensmittel die Harnsäure-Spiegel im Plasma erhöhen können und Harnsäure wird durch die meisten antioxidant capacity Assays miterfasst (*Halliwel 2003; Lotito et al. 2004*). Erhöhte Harnsäure-Spiegel stellen wiederum auch ein Risikofaktor für bestimmte Erkrankungen (wie z. B. Gicht) dar, der antioxidative Zugewinn ist im Fall der Harnsäure daher nicht unbedingt gesundheitsförderlich (*Halliwel, 2003*). Da die Absorption phenolischer Verbindungen im Dünndarm nur unvollständig geschieht, können diese den Kolon erreichen und dort unmittelbar oder nach

bakteriellem Metabolismus eine präventive Wirksamkeit entfalten. In der Tat enthält Fäceswasser micromolare Konzentrationen an Flavonoiden und relativ hohe Gehalte an Monophenolen, so dass im Magen und Darm weit höhere Gehalte zu erwarten sind (*Jenner et al. 2005*). Nun warum ist das von besonderer Bedeutung? Tatsache ist, dass der Gastrointestinaltrakt (GIT) stets reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) endogen (z. B. Superoxid bzw. H₂O₂ Produktion durch NADPH Oxidasen in Epithelzellen) (*Ha et al. 2005; Kawahara et al. 2006*) oder aus Lebensmitteln ausgesetzt ist. Besonders der Magen ist durch seine spezielle Funktion als „Bioreaktor“ den unverdauten Lebensmitteln unmittelbar ausgesetzt (*Kanner et al. 2001*). Die Mischung aus Eisen und Ascorbat bilden hierbei ROS Quellen im Magen, welche in Lebensmitteln gegenwärtig sind und Ascorbat ist normalerweise auch im Magensaft enthalten. Hämproteine (potenzielle Prooxidanzien), Lipidperoxide, zytotoxische Aldehyde, sowie Isoprostane aus Lebensmitteln stellen weitere ROS Quellen dar. Desweiteren kann Nitrit im Speichel oder aus der Nahrung durch Magensaft in salpetrige Säure (HNO₂) umgewandelt werden und dadurch nitrosierende bzw. DNA deaminierende Spezies freisetzen. Bestimmte Getränke wie z. B. Kaffee verfügen zudem hohe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (H₂O₂), wodurch prooxidative phenolische Verbindungen wie z. B. das Hydrochinon gegenwärtig sein können (*Halliwell, 2007*). Auch die Aktivierung von Immunzellen durch Bakterien aus Lebensmitteln kann schließlich zu einer erhöhten ROS Bildung im GIT führen (*Halliwell, 2007*). Flavonoide und andere phenolische Verbindungen können protektive Effekte im GIT entfalten, indem sie direkt ROS abfangen oder eine Hämprotein-induzierte Peroxidation im Magen inhibieren (*Kanner et al. 2001*). Sie können eine Deaminierung der DNA Basen durch reaktive Stickstoffspezies verhindern, Übergangsmetallionen komplexieren, sowie Toxin-metabolisierende und antioxidative Abwehrenzyme induzieren (*Halliwell et al., 2005*). Eisen wird normalerweise nicht vollständig absorbiert, dies ist besonders in der westlichen Ernährung der Fall und nicht absorbiertes Eisen wiederum gelangt ins Fäces und kann prooxidative Effekte im Kolon und Rektum entfalten (*Babbs, 1990*), gleichzeitig kann fettreiche und ballaststoffarme Nahrung diesen Effekt noch verstärken.

6. Polyphenole des Apfels

Apfel- und Apfelsaftprodukte (Saft, Smoothie) zählen zu den am häufigsten konsumierten Früchten bzw. Fruchtsäften in Deutschland. Der jährliche pro Kopf Verbrauch an Äpfeln liegt bei etwa 18,4 kg, sowie 11-13 Liter an Apfelsaft (*AFG-Markt, 2007*). Aufgrund ihrer zahlreichen antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe, stellt der Verzehr von Äpfeln und Apfelprodukten einen gesundheitsfördernden Beitrag für die Ernährung dar. Das breite Spektrum an biologisch aktiven Verbindungen bildet möglicherweise auch ein präventives Potential im Schutz vor chronischen Erkrankungen wie Diabetes, Asthma, Darmkrebs, sowie Herz-Kreislauf- und neurodegenerativen Erkrankungen (*Boyer et al. 2004; Willers et al. 2007; Gerhauser 2008; Jedrychowski et al. 2009*). Neben einer Vielzahl physiologischer Nährstoffe wie Kohlenhydrate, Proteine, Vitamine und Mineralstoffe, enthalten Äpfel zugleich komplexe unverdauliche Bestandteile wie Ballaststoffe, Pektine und höhermolekulare Verbindungen, deren ernährungsphysiologische Relevanz ebenfalls von hoher Bedeutung ist. Die durchschnittliche Nährstoffzusammensetzung von Äpfeln und Apfelsaft ist vergleichbar, mit Ausnahme der Protein-, Ballaststoff- und Vitamin C Gehalte.

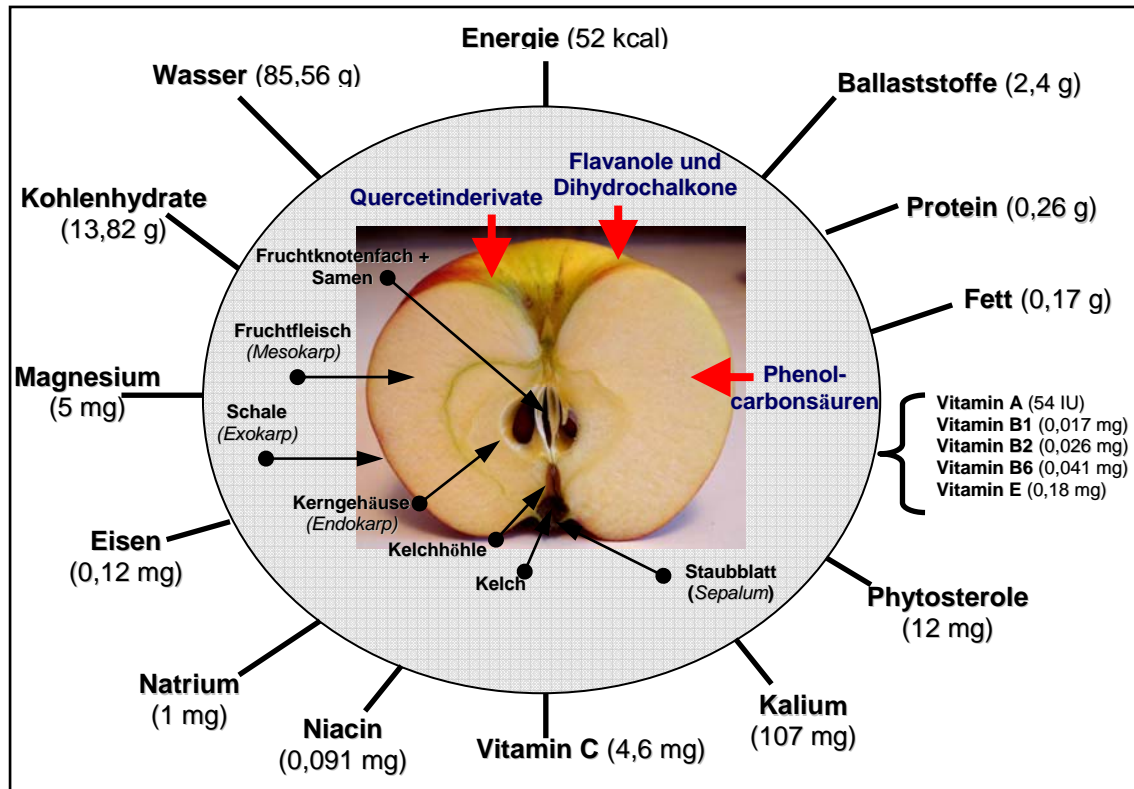


Abbildung 33: Aufbau (Querschnitt) und durchschnittliche Nährstoffgehalte in einer Apfelfrucht (alle Mengenangaben sind bezogen auf 100 g Frischgewicht und stellen nur eine Auswahl der Hauptinhaltsstoffe dar). Quelle: (*USDA Agricultural Research Service, 2008*)

Äpfel enthalten reichlich viele polyphenolische Inhaltsstoffe, die primär in der Schale, im Kern, sowie im Mark lokalisiert sind (Abb. 33) (*Thielen et al. 2004; Lata et al. 2007*). Der Gehalt und die Zusammensetzung dieser Inhaltsstoffe variiert jedoch stark nach Apfelsorte, Erntejahr und Anbaugebiet (*Guyot et al. 2003; Kahle et al. 2005*). Der Gesamtpolyphenolgehalt in Äpfeln spiegelt ungefähr 0,01 bis 1% des Frischgewichts wieder. Zu den polyphenolischen Hauptinhaltsstoffen zählen Hydroxyzimtsäuren, Dihydrochalkone, Flavonole (Quercetin-Glykoside), Catechine, sowie oligomere Procyanidine und auch Anthocyane in roten Äpfeln (*Pearson et al. 1999; Schieber et al. 2001; Tsao et al. 2003*). Ein besonderes Augenmerk in der Ernährungsforschung haben in den letzten Jahren u. a. die oligomeren Procyanidine erhalten, deren höhermolekulare Strukturen in erster Linie aus Catechin- bzw. Epicatechineinheiten (*Yanagida et al. 2007*) aufgebaut sind und die im Gesamtpolyphenolgehalt des Apfels einen Anteil von 63-77 % ausmachen können (*Vrhovsek et al., 2004*). Umfangreiche Studien weisen hierbei auf ein krebspräventives Potential dieser Verbindungen hin (*Aron et al. 2008; Zessner et al., 2008*). Hohe Polyphenolgehalte finden sich vor allem in traditionellen Mostapfelsorten (wie z. B.: Boskoop, Bohnapfel, Börtlinger Weinapfel, Bittenfelder, Gehrers Rambour und Hauxapfel). Demnach enthalten frisch gepresste naturtrübe Apfelsäfte besonders hohe Mengen der vier polyphenolischen Hauptinhaltsstoffe, im Vergleich zu kommerziell erhältlichen klaren Apfelsäften und Letztere werden zudem oftmals nur aus Konzentraten hergestellt (*Kahle et al., 2005a*). Dieser deutliche Unterschied im Polyphenolgehalt spiegelt sich ebenfalls im Procyanidingehalt von klarem- und trübem Apfelsaft (AS) bei der Herstellung polyphenolischer

Apfelsaftextrakte (AE) aus den jeweiligen Säften wieder. Phenolischer Apfelsaftextrakt aus trübem Apfelsaft wies hierbei einen Procyanidinanteil von 48-61 % auf, der entsprechende AE aus klarem Apfelsaft zeigte dagegen nur einen Anteil von 28-49 % (*Huemmer et al., 2008*). Neben den Kohlenhydraten bilden die Triterpenoide eine weitere Gruppe nicht-polyphenolischer Inhaltsstoffe und sind aufgrund ihrer Fettlöslichkeit bevorzugt in der kutikularen Wachsschicht der Apfelschale konzentriert. Ein interessanter Vertreter aus dieser Substanzklasse ist die Ursolsäure, die in einem durchschnittlich großen Apfel Konzentrationen bis zu 50 mg erreichen kann (*Frighetto, 2008*). In mehreren in-vitro Untersuchungen konnte eine deutliche antiproliferative bzw. antikanzerogene Wirksamkeit beobachtet von Ursolsäure (*He et al. 2007*) beobachtet werden.

6.1 Absorption, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Apfelsaftinhaltsstoffen

Untersuchungen zur Absorption, Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus polyphenolischer Apfelsinhaltsstoffe im menschlichen Darm zeigen, dass Flavonoid-Aglyka die Darmepithelzellen passieren und dort nachfolgende Konjugationsreaktionen erfahren, wohingegen die entsprechenden Glykoside nur zu einem sehr geringen Anteil absorbiert werden (*Scalbert et al. 2000; Yang et al. 2001; Manach et al. 2005*). Die Absorption erfolgt bereits schon im Dünndarmepithel nach Spaltung des Zuckerrestes von der Polyphenoleinheit durch spezielle Hydrolasen, wie z. B. die β -Glucosidase oder Laktase Phloridzin Hydrolase (LPH) (*Morand et al. 2000; Crespy et al. 2001; Donovan et al. 2001; Boyer et al. 2004*). In einem umfangreichen Review haben Manach et al. Ergebnisse aus 97 Studien zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen beim Menschen zusammengestellt und die hieraus wichtigsten Resultate zusammengefasst. Demnach können Polyphenol-Metabolite nach Aufnahme von 50 mg Aglykon-Äquivalenten Konzentrationen von 0-4 μ M im Plasma erreichen. Die Metabolite werden auch durch den Harn ausgeschieden und können hier abhängig vom jeweiligen Polyphenol bis zu 43 % der aufgenommenen Dosis betragen (*Manach et al., 2005*). Zu den am besten absorbierten Polyphenolen zählen dabei die Gallussäure und auch die meisten Isoflavone, beide kommen jedoch in Äpfeln nicht vor. In dieser Reihe folgen unmittelbar Catechine und Quercetin-Glykoside, jedoch mit Unterschieden in der jeweiligen Kinetik. Procyanidine und Anthocyane (falls vorhanden) zählen schließlich zu den am geringsten absorbierten Polyphenolen. Aufgrund der begrenzten Datenlage sind Aussagen über die Absorption von Hydroxyzimtsäuren und anderen polyphenolischen Verbindungen begrenzt, zumal die meisten Studien nur mit reinen Einzelstoffen durchgeführt wurden. Ein Rückschluss auf die Aufnahme aus komplexen Lebensmitteln wie z.B. Äpfeln ist daher nur bedingt möglich. Denn hierbei müssen zudem weitere Effekte wie Lebensmittelbeschaffenheit, Verarbeitung, Verdauung und gleichzeitige Wechselwirkung mit anderen Lebensmittelbestandteilen bei der Aufnahme berücksichtigt werden (*Boyer and Liu, 2004*). Diese komplexen Bedingungen können oftmals nur annähernd simuliert werden, dennoch werden erfolgreich unterschiedliche Modelle vorgestellt, die spezielle Aspekte, wie z.B. den Metabolismus, die Absorption oder Bioverfügbarkeit von Apfelpolyphenolen aufgreifen.

Neben umfangreichen *in-vitro* Studien bieten Experimente mit Tiermodellen oder insbesondere humane Interventionsstudien geeignete Möglichkeiten spezielle Fragestellungen genauer zu überprüfen. Ileostoma-Patienten stellen hierbei in vielerlei Hinsicht eine besondere Studiengruppe dar. Interventionsstudien mit Ileostoma-Patienten können sowohl Aufschluss über die Bioverfügbarkeit polyphenolischer Inhaltsstoffe und ihrer Metabolite geben, als auch die Charakterisierung besonders antioxidativ wirksamer polyphenolischer Verbindungen ermöglichen. Ileostoma-Patienten haben in der Regel einen intakten Dünndarm und bieten daher die Möglichkeit die *in-vivo* Fermentation von Lebensmitteln in diesem Darmabschnitt zu erfassen, denn alles was den Ileostomabeutel erreicht, würde auch den nachfolgenden Dickdarmabschnitt passieren und dort möglicherweise auch präventive Wirksamkeit entfalten. In einer humanen Interventionsstudie an elf Ileostoma-Patienten konnten Kahle et al. die Absorption und den Metabolismus polyphenolischer Apfelsaftinhaltsstoffe erfassen und analytisch charakterisieren. Die freiwilligen Patienten nahmen nach einer 24 stündigen, polyphenolfreien Diät ein Liter trüben Apfelsaft zu sich und wurden gebeten unmittelbar vor der Saftaufnahme, als auch 1, 2, 4, 6 und 8h nach Saftverzehr ihren Ileostomabeutel abzugeben. Der jeweilige Ileostomabeutel-Inhalt wurde dann nach Gefriertrocknung analytisch auf polyphenolische Inhaltsstoffe und Metabolite untersucht. Kahle et al. konnten demnach zeigen, dass die maximale Exkretion an polyphenolischen Inhaltsstoffen unmittelbar zwei Stunden nach Saftaufnahme erreicht wird. Weiterhin ergab die analytische Charakterisierung der polyphenolischen Inhaltsstoffe/ Metabolite, dass 0-33 % der aufgenommenen Hydroxyzimtsäuren und 10 % Chlorogensäure (ungefähr 11 mg) in den Ileostomabeutel-Inhalten identifiziert werden konnten (**Kahle et al. 2005; Kahle et al. 2007**). In einer vergleichbaren Interventionsstudie mit Ileostoma-Patienten, aber anderem Studiendesign, konnten Olthof et al. zeigen, dass nach einmaliger Aufnahme von 2,8 mmol Chlorogensäure (~ 992,1 mg), bzw. 2,8 mmol Kaffeesäure (~ 504 mg) an unterschiedlichen Tagen und anschließender Untersuchung der Ileostomabeutel-Inhalte etwa 65 % an Chlorogensäure und höchstens 5 % an Kaffeesäure wiedergefunden werden konnten. Die höhere Ausbeute an Chlorogensäure in der von Olthof et al. durchgeführten Studie hängt höchstwahrscheinlich mit der verabreichten hohen Chlorogensäure Konzentration zusammen. Interessanterweise sind bei täglichem Kaffeegenuss durchaus hohe Konzentrationen (0,5 - 1g) an Chlorogensäure erreichbar (**Olthof et al., 2001**). Der Vergleich mit gesunden Probanden mit intaktem Kolon zeigt hingegen, dass etwa 50 % der aufgenommenen Chlorogensäure durch die Mikroflora im Kolon zu Hippursäure metabolisiert wird (**Olthof et al., 2003**). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einer Studie mit Ratten beobachtet werden, mit der Schlussfolgerung dass die Bioverfügbarkeit von Chlorogensäure unmittelbar von dessen Metabolismus in der Darmflora abhängt (**Gonthier et al., 2003a**). Apfelsaft enthält darüber hinaus fünf bekannte Vertreter aus der Gruppe der Quercetin-Glycoside, von denen zwei Derivate (Quercetin-3-O-arabinosid und Quercetin-3-O-rhamnosid) in den Ileostomabeutel-Inhalten lediglich in Höhe von 6 bzw. 10 % der aufgenommenen Dosis wiedergefunden werden konnten (**Kahle2005; Kahle et al. 2007**).

Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen aus einer früheren Ileostoma-Studie von Walle et al., in der vier Ileostoma-Patienten 75-150 g einer gekochten Zwiebelzubereitung zu sich nahmen. Obwohl diese spezielle Zubereitung hohe Mengen an Quercetin- mono bzw. - diglycosiden (10,9 bis 51,6 mg) enthielt, konnten diese in den Ileostomabeutel-Inhalten nicht

nachgewiesen werden. Dagegen konnten darin beträchtliche Mengen des Aglykons Quercetin (2,9 – 11,3 mg) identifiziert werden. Hieraus schlossen die Autoren, dass Quercetin- mono und – diglycoside bereits im Dünndarm durch β -Glucosidasen hydrolysiert werden und das dabei freigesetzte Quercetin effektiv absorbiert wird (*Walle et al., 2000*). In einer weiteren Studie mit gesunden Probanden haben Walle et al. speziell diesen Aspekt der Absorption nochmals aufgegriffen. Hierzu erhielten die Probanden ^{14}C -markiertes Quercetin entweder als orale Gabe (100 mg, 330 μM) oder eine intra-venöse (0,3 mg, 1 μM) Applikation. Sie stellten dabei fest, dass unabhängig von der Dosis und Applikation etwa 23 – 81 % des radioaktiv markierten Quercetins als $^{14}\text{CO}_2$ ausgeatmet wurde. Dies verdeutlicht u. a. die komplexe Biotransformation einer Substanz am Beispiel des metabolischen Schicksals von Quercetin (*Walle et al., 2001*).

In diesem Zusammenhang liegt auch ein besonderer Fokus auf oligomeren Procyanidinen, da diese reichlich in Äpfeln und anderen Lebensmitteln enthalten sind (*Gu et al. 2004; Prior et al. 2005*). In-vitro Untersuchungen zur Simulation der Magenpassage legen die Vermutung nahe, dass oligomere Procyanidine bereits im Magen in ein Gemisch aus monomeren und dimeren Epicatechin-Einheiten gespalten werden, wodurch ihre Absorption im nachfolgenden Dünndarm möglicherweise erhöht wird (*Spencer et al., 2001*). Allerdings konnte diese Annahme weder durch die von Rios et al. durchgeführte humane Interventionsstudie mit gesunden Probanden (*Rios et al., 2002*), noch in der bereits vorgestellten humanen Interventionsstudie von Kahle et al bestätigt werden. Dagegen konnten Kahle et al. zeigen, dass 90 % der aufgenommenen oligomeren Procyanidine bereits zwei Stunden nach Verzehr von einem Liter trüben Apfelsaft in den Ileostomabeutel-Inhalten erscheinen (*Kahle et al., 2007*). Dennoch konnte innerhalb dieses Zeitfensters eine Abnahme des mittleren Polymerisationsgrades der oligomeren Procyanidine von 5,7 (Saft) auf 3,4 festgestellt werden, die mit der Zeit weiter abnahm. Die polyphenolischen Inhaltsstoffe in den Ileostomabeutel-Inhalten zeigten dennoch eine antioxidative Wirksamkeit gegenüber Peroxylradikalen und konnten DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)-Radikale potentiell abfangen (*Gerhauser, 2008*). Bezüglich der DPPH-Radikal reduzierenden Aktivität stellten Okawa et al. nach Untersuchung zahlreicher Flavonoide eine starke Struktur-Wirkungsbeziehung fest, mit dem Resultat dass hauptsächlich die Position der Hydroxylgruppen (Catechol oder Pyrogallol) und weniger deren Anzahl im Flavonoidmolekül zur antioxidativen Wirksamkeit beitragen und ein besonders hohes Potential von Catecholgruppen ausgeht. Ferner konnten sie in der Gruppe der Flavanole eine Reihenfolge in der DPPH-Radikal abfangenden Wirksamkeit beobachten, in der Gallocatechin \geq Procyanidin C1 \geq Procyanidin A2 $>$ Epicatechin \approx Procyanidin B2 zugeordnet werden konnte (*Okawa et al., 2001*). In-vitro Inkubationen oligomerer Procyanidine mit humaner Darmmikroflora lassen allerdings darauf schließen, dass diese Verbindungen im Darm durchaus zu niedermolekularen Phenolsäuren abgebaut werden können, wenn sie den Darm erreichen (*Deprez et al., 2000*). Die biologischen Eigenschaften dieser niedermolekularen Metabolite sind daher ebenfalls von wesentlicher Bedeutung und darüber hinaus sind lokale Effekte oligomerer Procyanidine nach metabolischer Umwandlung im Darm nicht ausgeschlossen.

6.2 Präventive Wirksamkeit polyphenolischer Apfelinhaltsstoffe *in-vitro*

6.2.1 Modulation antioxidativer Enzyme

Eine verstärkte Elimination von kanzerogenen Verbindungen durch Induktion von Phase II Enzymen wird als wirksame Strategie zur Krebsprävention betrachtet. Pohl et al. konnten nach Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit Apfelsaftextrakt eine deutliche Reduktion der CYP 1A1 Expression auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene beobachten (**Pohl et al., 2006**). Und Zessner et al. konnten durch Fraktionierung polyphenolreicher Apfelsaftextrakte, Quercetin als potentesten CYP 1A1 Inhibitor identifizieren. Das Aglykon war bereits im nanomolaren Bereich effektiv und somit um einige Größenordnungen potenter als das entsprechende Glukosid, Letztere waren aber wirksamer als Hydroxyzimtsäuren und Dihydrochalkone (**Gerhauser et al. 2003; Zessner et al. 2008**). In humanen Lymphozyten konnte sowohl *in-vitro* mit Quercetin, als auch *ex-vivo* mit einem quercetin-reichen Fruchtsaft eine deutliche Abnahme der DNA-Adduktbildung mit B[a]P-Diolepoxid (7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrene 9,10-oxide) festgestellt werden, Letztere Verbindung ist ein aktiver Metabolit von B[a]P und kann durch CYP 1A1 Aktivität gebildet werden (**Wilms et al. 2007**). Eine CYP 1A1 Hemmung konnte neben Quercetin auch mit procyanidinhaltigen Apfelsaftextrakt-Fractionen in einem zellfreien Assay beobachtet werden, bei dem ein Zellhomogenat als Enzymquelle diente (**Zessner et al. 2008**). Allerdings könnten diese Effekte aus einer unspezifischen Proteinbindung resultieren. In einem auf Microarray basierten Screening, konnten Veeriah et al nach 24 h Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 mit einer Mischung von Apfelpolyphenolen eine 1,6 bis 2,1 fache Induktion der mRNA Level der Glutathion S-Transferasen (GSTP1, GSTT2, und MGST2) und auch der Sulfotferasen (CHST5, CHST6 und CHST7) beobachten. Gleichzeitig war die mRNA Expression der Epoxidhydrolase signifikant auf 50 % erniedrigt. Letzteres Enzym spielt bei der metabolischen Aktivierung von B[a]P, sowie bei anderen potentiellen karzinogenen Verbindungen ebenfalls eine Rolle (**Veeriah et al. 2006**). In einer ähnlichen Untersuchung mit Apfelsaftextrakten an der preneoplastischen Adenokarzinomzelllinie LT97 konnte ebenfalls ein protektives Potential beobachtet werden, was sich sowohl in einer erhöhten mRNA Induktion ausgewählter Zielgene (GSTP1, GSTT2, GSTA4, UGT1A1, UGT2B7), als auch in einer Erhöhung der Gesamtzymaktivitäten äußerte (**Veeriah et al. 2008**). Neben polyphenolischen Inhaltsstoffen aus Apfelsaftextrakten, konnten mit Hilfe eines einfachen kolorimetrischen Tests zur NQO1 Induktion in der Maushepatomzelllinie Hepa1c1c7 auch Apfelaromen (Ester, höhere Alkohole) als weitere potentielle Phase II Induktoren identifiziert werden (**Zessner et al. 2008**).

6.2.2 Antioxidative Aktivität

Exzessive ROS Produktion kann zur Bildung hochreaktiver Oxidationsprodukte, Aktivierung von Kanzerogenen und oxidierten DNA-Basen bzw. DNA Strangbrüchen führen (**Valko et al. 2007**). Eberhardt et al. konnten zeigen, dass die radikalabfangende Wirksamkeit (gemessen in $\mu\text{Mol Vit. C \u00c4quivalente/ g Frischgewicht}$) von frischen \u00c4pfeln prim\u00e4r durch den Gehalt an polyphenolischen Inhaltsstoffen bestimmt wird und weniger durch das Vitamin C (**Eberhardt et al., 2000**). Mehrere Studien belegen zudem, dass die h\u00f6chste antioxidative Aktivit\u00e4t st\u00e4rker von der Apfelschale ausgeht als vom Fruchtfleisch. Als potentielle Verbindungen wurden hierbei die

Quercetin-glycoside identifiziert, welche hauptsächlich in der Schale lokalisiert sind (*Burda et al. 2001; Lee et al. 2003; Wolfe et al. 2003; McGhie et al. 2005*). Ein umfangreicher Vergleich der radikalabfangenden Aktivität von Apfelsaftextrakten, sowie deren Fraktionen und Subfraktionen mit den Inhaltsstoffen ergab, dass alle phenolischen Hauptklassen zur antioxidativen Wirksamkeit gegenüber Peroxyl-Radikalen im ORAC Assay beitragen, wohingegen DPPH und das Superoxidradikalanion besonders durch lipophile Fraktionen, die reich an Quercetin-glycosiden und oligomeren Procyanidinen sind abgefangen werden (*Zessner et al. 2008*).

Neben der radikalabfangenden Wirksamkeit *in-vitro*, gibt es auch zahlreiche Hinweise auf die Inhibierung der Lipidperoxidation. Apfelsaftextrakte und einzelne polyphenolische Inhaltsstoffe zeigen eine hemmende Wirkung gegenüber Kupfer-induzierter Oxidation humaner LD- (low density) Lipoproteine, gegen Ascorbinsäure und FeSO₄ induzierte Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen, sowie gegenüber der Peroxidation von Linolsäure im micellaren System (*Pearson et al. 1999; van der Sluis et al. 2000; Vanzani et al. 2005*). Eine signifikante Verringerung oxidativer DNA-Schäden, sowie eine Reduktion des intrazellulären ROS-Levels nach Induktion mit *tert*-Butylhydroperoxid konnte ebenfalls *in-vitro* durch die Inkubation mit Apfelsaftextrakten, sowie phenolischen Inhaltsstoffen gezeigt werden (*Schaefer et al. 2006; McCann et al. 2007*). In der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 Zellen bewirkten phenolische Apfelsaftextrakte darüber hinaus eine protektive Wirkung gegenüber H₂O₂ induzierter Zytotoxizität und zeigten in humanen Lungenepithelzellen einen Schutz vor Cr(VI)-induzierter Lipidperoxidation, oxidativen DNA-Schäden, sowie NF-κB-Aktivierung (*Shi et al. 2002*). Es wird angenommen, dass H₂O₂, sowie andere nicht-genotoxische Faktoren die Tumorpromotion über eine Hemmung der intrazellulären Kommunikation durch Blockierung sog. Gap-junctions zwischen den Zellen auslöst (*Trosko 2006*). Lee et al. konnten in diesem Zusammenhang demonstrieren, dass Apfelsaftextrakte in Leberepithelzellen von WB-F344 Ratten diesen Mechanismus verhindern (*Lee et al., 2004*). Eine Behandlung mit 500 µM H₂O₂ führte zu einer 90 %igen Erniedrigung der interzellulären GAP-junction Kommunikation, wohingegen eine gleichzeitige Inkubation mit Apfelsaftextrakten in höheren Konzentrationen (äquivalent zu 15-25 mg/ml frischer Äpfel) die interzelluläre Kommunikation wieder auf Kontrollwerte erhöhte. Ähnliche Effekte wurden auch mit abnehmender Stärke durch Quercetin, (-)-Epicatechin, Procyanidin B2 und Vitamin C beobachtet. Chlorogensäure und Phloretin erwiesen sich dagegen als inaktiv.

6.2.3 Antiinflammatorische Mechanismen

Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion proinflammatorischer Enzyme wie z. B. der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1, COX-2). NF-κB wiederum kann durch Zytokine wie dem tumor necrosis factor (TNFα), bakterielle Lipopolysaccharide, sowie dem Tumorpromotor 12-O-tetradecanolyphorbol-13-acetate (TPA) und auch andere Mediatoren induziert werden (*Ahn et al., 2007*). Davis et al. konnten mit Hilfe eines NF-κB Reportergenkonstruktes in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur eine signifikante Reduktion der TNFα vermittelten Expression des Reportergens nach 24 stündiger Vorinkubation mit phenolischen Apfelsaftextrakten beobachten (*Davis et al., 2006*). In einer anderen Studie von Yoon et al., konnte nach einer zweistündigen Vorinkubation von MCF-7

Zellen mit Apfelsaftextrakten und anschließender Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, ebenfalls eine NF- κ B Reduktion gezeigt werden (*Yoon et al. 2007*). Als zugrunde liegender Mechanismus wird hierbei die Hemmung der proteasomalen Aktivität gesehen, welche die Freisetzung von NF- κ B aus dem Inhibitor-Komplex I κ B ermöglicht.

6.2.4 Hemmung von Signalwegen

Eine unkontrollierte Zellproliferation ist in der Regel durch eine Dysbalance in den zellulären Signalwegen gekennzeichnet. Wachstumsfaktoren wie z. B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) binden an ihre Rezeptoren, welche auf der Zellmembran lokalisiert sind und stimulieren dadurch Signalkaskaden. Wachstumstimulierende Signale werden hierbei in den Zellkern (Nukleus) transduziert, indem mehrere Phosphorylierungs- und Aktivierungsschritte angeschaltet werden. Diese werden wiederum durch sog. Proteinkinase Kaskaden wie z. B. Ras/ Raf/ MAP Kinase Kaskade vermittelt und resultieren in erhöhter oder erniedrigter Genexpression und damit in veränderter Proteinexpression. Folglich bietet eine Überexpression von Hormonen bzw. Wachstumsfaktoren, sowie deren zugehörigen Rezeptoren einen Wachstumsvorteil für prä-neoplastische Zellen (*Surh 2003; Aggarwal et al. 2006; Ramos 2008*). Kern et al. und Fridrich et al. konnten in ihren Untersuchungen zum Einfluss von polyphenolischen Apfelsaftextrakten auf den EGF Signalweg zeigen, dass Apfelsaftextrakte effektiv die Protein-Tyrosinkinase Aktivität des EGF Rezeptors (EGFR) hemmen und die EGFR Auto-Phosphorylierung unterdrücken. Auch Procyanidin B1 und B2, sowie Quercetin-glycoside zeigten ein Potenzial zur EGFR Hemmung (*Kern et al. 2005; Fridrich et al. 2007*). Apfelpolyphenole können auch den Signalweg zur Induktion der Ornithin-Decarboxylase hemmen. Letzteres Enzym ist durch die Bildung von Polyaminen essentiell für die zelluläre Proliferation und in Tumorzellen oftmals überexprimiert (*Gosse et al., 2006*). In der humanen Kolonkrebszelllinie SW620 bewirkte eine Apfelextraktfraktion die reich an oligomeren Procyanidinen ist, eine 70 %ige Hemmung der Protein-Kinase C (PKC) Aktivität. Dies ging mit einer gleichzeitigen Runterregulierung der Polyamin-Biosynthese, sowie Aktivierung der Apoptose einher (*Gosse et al., 2006*). Eine PKC Hemmung im zellfreien System, jedoch nicht in intakten HT-29 Zellen wurde ebenfalls von Kern et al. demonstriert (*Kern et al., 2006*). Neben dem EGF Signalweg ist auch der sogenannte Wnt Signalweg von besonderer Bedeutung, da dieser während der Kanzerogenese sowie in Tumorzellen aufgrund einer Mutation im Adenomatösen Polyposis Coli (APC) Gen aktiviert vorliegt. Das APC Protein bildet gemeinsam mit Proteinen der Axinfamilie einen APC-Axin „Abbaukomplex“, der unter Mitwirkung einer Serin/Threoninkinase, der Glycogen-Synthase Kinase β (GSK3 β) β -Catenin phosphoryliert, was in weiteren Schritten zu einer Degradierung des β -Catenins führt (*Surh, 2003*). Da β -Catenin wiederum an der Transkriptionsaktivierung von Wnt-1 beteiligt ist, wird durch dessen Abbau die Aktivierung Wnt-1 abhängiger Gene, wie beispielsweise myc, verhindert. Eine Inaktivierung des APC Gens führt praktisch immer zu unvollständigen Rumpfproteinen. Dies führt zum Verlust der Bindungsfähigkeit an Axin, wodurch der Abbaukomplex für β -Catenin nicht gebildet werden kann. Die Folge ist unter anderem eine vermehrte Transkription von myc auf dem Weg der ungebremsten Wnt-1

Aktivierung. Ein Mechanismus, der bei der Tumorentstehung im Rahmen von familiärer adenomatöser Polypose (FAP) und dem Gardner-Syndrom oder auch bei sporadischen kolorektalen Karzinomen eine Rolle spielt (*Wrba, 2001*). Apfelpolyphenole können die GSK3 β Kinase Aktivität sowohl im zellfreien System, als auch in intakten HT-29 Zellen hemmen. Dennoch wird dabei eine GSK3 β Induktion auf Proteinebene beobachtet. In der Summe konnte aber kein Einfluss auf weitere Schlüsselemente des Wnt-Signalwegs beobachtet werden (*Kern et al., 2006*).

6.2.5 Hemmung der Zellproliferation durch Apfelsaftextrakte

Zahlreiche Studien demonstrieren eine wachstumshemmende Wirkung von Apfelsaftinhaltsstoffen *in vitro*. Die Interpretation dieser Ergebnisse erfordert jedoch sorgfältige Überprüfung, da gerade durch Zellkultur bedingte Artefakte leicht falsche Schlussfolgerungen herbeiführen. Flavonoide können bereits in unterschiedlichen Zellkulturmedien oxidieren und dabei H₂O₂, Chinone und Semichinone generieren, die für die beobachtete Zytotoxizität verantwortlich sind oder dazu beitragen (*Long et al. 2000; Halliwell 2003; Wee et al. 2003*). Die scheinbare Zytotoxizität von grünem Tee in PC12 Zellen z. B. beruhte auf einem reinen Artefakt (*Chai et al., 2003*). Eine zuverlässige Extrapolation von *in-vitro* Ergebnissen auf die *in-vivo* Situation ist in diesen Fällen äußerst kritisch. Ähnlich zu den beobachteten Effekten von Polyphenolen aus grünem Tee, zeigen auch Apfelpolyphenole eine Induktion der H₂O₂ Generierung bereits im Zellkulturmedium. Dies könnte möglicherweise eine Ursache für einige der beobachteten Ergebnisse (wenn nicht sogar für eine Vielzahl) darstellen. Die H₂O₂ Generierung durch Apfelpolyphenole wurde erstmals von Long et al. und Lapidot et al beschrieben (*Long et al. 2000; Lapidot et al. 2002*). Gerade im serumfreien Medium werden schnell hohe H₂O₂ Konzentrationen generiert, wogegen serumhaltige Inkubationen geringere H₂O₂ Gehalte aufgrund enzymatischer Restaktivitäten von Serumproteinen aufweisen (*Lapidot et al. 2002*). Fridrich et al. konnten zudem zeigen, dass auch Apfelsaftextrakte H₂O₂ im Zellkulturmedium generieren (*Fridrich et al., 2007*). Und Bellion et al. weisen auf einen Zusammenhang der H₂O₂ Generierung bei Bikarbonat-gepufferten Lösungen hin (*Bellion et al., 2009*). Diese Tatsache bietet eine mögliche Erklärung für die von Liu und Sun beobachtete Abwesenheit von H₂O₂ in HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) gepuffertem Zellkulturmedium, nach Inkubation phenolischer Apfelsaftextrakte (*Liu et al. 2003*). Diese Resultate müssen im Umgang mit polyphenolischen Extrakten bzw. Apfelsaftinhaltsstoffen in der Zellkultur stets berücksichtigt werden. Veeriah et al. verglichen die antiproliferative Aktivität drei verschiedener Apfelsaftextrakte in HT-29 Zellen, sowie in der Adenoma-Zelllinie LT97 (*Veeriah et al. 2006; 2007*). Verschiedene Apfelsaftextrakte (AE) mit unterschiedlicher polyphenolischer Zusammensetzung, sowie ein nach enzymatischer Behandlung gewonnener Extrakt aus Apfeltrester (AE03) wurden hierbei getestet (siehe hierzu auch Kap. 7 zur Analytik der im Folgenden genannten AEs). Der Tresterextrakt AE03 enthält im Vergleich zu den beiden Apfelsaftextrakten nur 1/8 der Gehalte an Hydroxyzimtsäuren, einen geringeren Gesamtphenolgehalt, besitzt aber dafür 10 fach höhere Flavonol-Konzentrationen. Letztendlich waren die LT97 Zellen sensitiver auf die antiproliferative Wirksamkeit der Extrakte, als die HT-29 Zellen. Das wachstumshemmende Potenzial erhöhte sich dagegen in

beiden Zelllinien mit zunehmender Inkubationszeit. Weiterhin ist der hohe Flavonol Gehalt in AE03 für die stärkere wachstumshemmende Wirksamkeit verantwortlich. Ein Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung des nativen Extraktes mit einer Mischung aus ausgewählten niedermolekularen Apfelpolyphenolen (u. a. auch Flavan-3-ol Mono- und Dimere, aber keine oligomeren Procyanidine) in HT-29 Zellen ergab, dass der Extrakt doppelt so potent war wie die Mischung. Dies weist auf eine wesentliche Beteiligung oligomerer Procyanidine auf die antiproliferative Aktivität von Apfelsaftextrakten hin (*Veeriah et al. 2006*).

Eine 24 stündige anaerobe Fermentation dieser drei AEs mit Hilfe einer Aufschlammung von humanen Fäces, führte zu einer hohen Generierung kurzkettiger Fettsäuren (short chain fatty acid, SCFA) in millimolaren Konzentrationen (*Waldecker et al. 2008*). Durch AE02 wurde in absteigender Konzentration Acetat (max. 29 mM), Propionat (max. 6 mM) und Butyrat (max. 5 mM) gebildet. SCFA's darunter insbesondere Butyrat werden mit einer Hemmung der Zellproliferation durch Induktion der Zelldifferenzierung und Apoptose in Zusammenhang gebracht (*Wong et al. 2005; Sengupta et al. 2006*). Dennoch zeigten die fermentierten Extrakte in beiden Zelllinien eine geringere antiproliferative Wirksamkeit nach 24-48 stündiger Inkubation im Vergleich zu den unbehandelten Extrakten. Die Fermentation führte zu einem vollständigen Abbau der Apfelpolyphenole und es konnten zwei Metabolite (Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure) in geringen Mengen nachgewiesen werden (*Veeriah et al. 2007*). Die durch Butyrat vermittelten Effekte auf die Zellproliferation werden auf eine Hyperacetylierung von Histonen durch Hemmung der Histon-Deacetylase (HDAC) zurückgeführt (*Davie, 2003*). Waldecker et al. verglichen die Apfelsaftextrakte AE03 und AE04 nach Fermentation sowohl in Gegenwart von Pektin, als auch nur Pektin alleine in ihrer Wirksamkeit die Proliferation und HDAC-Aktivität in HeLa Mad 38, HT29 und Caco-2 Zellen zu hemmen (*Waldecker et al. 2008*). Bei den HeLa Mad 38 Zellen handelte es sich hierbei um stabil transfizierte Zellen mit einem HDAC Inhibition-induzierbaren Reportergenkonstrukt. Eine signifikante Reportergenaktivität konnte in allen Proben nach Inkubation mit Fermentationsüberständen beobachtet werden. Die Extrakt + Pektin Kombination wies hierbei die höchste Aktivität auf, obwohl die Butyrat-Mengen geringer als in den fermentierten Pektin-Proben waren. Dies deutete auf die Bildung zusätzlicher HDAC hemmender Verbindungen während der Fermentation der AEs. Ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn die HDAC Aktivität in allen drei Zelllinien und steigender Konzentration an Fermentationsüberstand direkt aus dem Nuklearextrakt der Zellen gemessen wurde (*Waldecker et al. 2008*). Bellion et al. untersuchten den Einfluss des intestinalen Metabolismus auf die antioxidative Wirksamkeit von ausgewählten AEs. Hierzu wurden zwei AEs einer anaeroben Fermentation mit Darmbakterien unterzogen und die hieraus erhaltenen Fermentationsüberstände auf ihre antioxidative Wirksamkeit *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Wirksamkeit der fermentierten Apfelsaftextrakte bei den Markern zellfreie antioxidative Wirksamkeit (TEAC), sowie TBH-induzierter ROS-Level; obwohl eine Analyse der verbleibenden Polyphenole in den Fermentationsüberständen zeigte, dass schon nach 6h Fermentation über 99% der Polyphenole abgebaut wurden (*Bellion et al. 2008*).

6.2.6 Apoptose-Induktion durch polyphenolische Apfelinhaltsstoffe

Apoptose bzw. programmierter Zelltod ist ein physiologischer Prozess in der Erhaltung multizellulärer Organismen und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Metamorphose, hormonellen Verkümmern und chemisch-induziertem Zelltod (*Meier et al., 2000*). Apoptose kann in der Regel durch zwei getrennte Signalwege induziert werden. Einerseits durch ein extrinsisch gesteuertes Signal, dem sog. death receptor pathway, auf der anderen Seite, intrinsisch durch eine mitochondrial-vermittelte Aktivierung (*Vermeulen et al., 2005*). Die Spaltung des DNA-Reperaturzyklus Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) gilt hierbei als wichtiger Marker für die Apoptose-Induktion. In der Regulation des Zellwachstums, sowie des Zelltod ist darüber hinaus noch ein weiterer großer Proteinkomplex, das sogenannte 26 S Proteasom beteiligt. Seine Funktion besteht in der Kontrolle des Proteinumsatzes einer Vielzahl intrazellulärer regulatorischer Proteine, die am Zellzyklus und bei der Apoptose beteiligt sind (*Kisselev et al. 2001*). Eine kurzzeitige Exposition von Zellen mit Proteasom-Inhibitoren bewirkt einen proaktiven Effekt gegenüber toxischen Stimulii, eine Langzeitexposition dagegen ist toxisch für nahezu alle Zellen und geht mit der Apoptose-Induktion einher. Auf der Basis früherer Ergebnisse mit Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) aus Grüntee (*Chen et al. 2004*) untersuchten Chen et al. den Einfluss von Äpfeln, sowie anderen Früchten und Gemüse auf das 26S Proteasom im Hinblick auf den Mechanismus zur Hemmung der Zellproliferation (*Chen et al. 2008*). In den Versuchen zur 26S Proteasom Inhibierung konnten sie im zellfreien System eine Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 26S Proteasoms nach Inkubation mit einem Apfel-„Extrakt“ in Konzentrationen von 1-10 (v/v) beobachten. Bei dem sogenannten Apfelextrakt handelte es sich hierbei um ein Sterilfiltrat aus frisch hergestelltem und zentrifugiertem Apfelsaft. Im Vergleich dazu war ein Trauben-„Extrakt“ ähnlich wirksam, Grüntee war dagegen sehr potent, mit bis zu 96 % Hemmwirkung bei gleicher Testkonzentration. Im zellulären System mit der humanen Leukämie Zelllinie Jurkat T, bewirkte ein 5 % iger „Extrakt“ von Grüntee, Äpfeln oder Trauben eine Akkumulierung ubiquitinerter Proteine (ein Zeichen intrazellulärer Proteasom-Hemmung), was mit einer gleichzeitigen Aktivierung der Effektor Caspase-3/ -7 und Induktion der PARP Spaltung einherging.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 26S Proteasoms durch Apfel- und Trauben-„Extrakte“ einen weiteren interessanten Mechanismus der Apoptose Induktion darstellt. Chen et al. schlussfolgern hieraus, dass dem Proteasom eine wichtige Rolle im Mechanismus der Krebsentstehung zukommt und eine Proteasom-Hemmung durch Obst und Gemüse deren krebspräventives Potenzial unterstreicht (*Chen et al. 2004*). Kern et al. untersuchten das Potential eines Apfelsaftextraktes (AE02) auf die Apoptose-Induktion in HT29 Zellen (*Kern et al., 2007*). Hierbei bewirkte AE02 eine potenzielle Induktion der Caspase-3 Aktivität und DNA Fragmentierung, welches durch ein ELISA-Assay gemessen wurde. Die beobachteten Effekte traten jedoch erst bei relativ hohen Konzentrationen ein. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Experimente in serumfreien Medium durchgeführt wurden und ohne Zusatz von Katalase. Ein Einfluss von im Medium generiertem H₂O₂ auf die Resultate kann hierbei möglicherweise auch eine Rolle spielen. Eine Apoptose-Induktion durch PARP-Spaltung konnte aber auch bei normalen Inkubationsbedingungen (Medium mit 10 % igem Zusatz von Fötalem Kälberserum) durch den Apfelsaftextrakt AE02 beobachtet werden. Die PARP Spaltung war hierbei konzentrationsabhängig und nahm in einem Inkubationszeitraum bis 72h zu (*Kern et al.,*

2007). Im Vergleich dazu zeigten die beiden Aglyka Quercetin und Phloretin unter serumfreien Bedingungen eine konzentrationsabhängige Induktion der Caspase-3 Aktivierung und DNA Spaltung, wohingegen das in Äpfeln und Apfelsaftextrakten vorkommende Phloridzin (Phloretin-2'-glucosid) unwirksam war. Park et al nahmen weitere Untersuchungen zum Apoptose induzierenden Potential von Phloretin in HT29 Zellen auf (*Park et al., 2007*). Unter serumarmen Bedingungen (1% FKS) bewirkte Phloretin (100 µM) eine Induktion des death-Rezeptors, als auch den mitochondrialen Signalweg der Apoptose Induktion. Dies konnte anhand der Aktivierung der Initiator Caspase-8 und -9, sowie der Effektor Caspase-3 und 7, als auch durch eine PARP-Spaltung gezeigt werden. Die Aktivierung von Caspase-9 war begleitet durch eine Freisetzung von Cytochrom c und dem mitochondrialen Protein Smac/ Diablo aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma, sowie durch eine Hochregulierung proapoptotischer Bax Level (*Park et al., 2007*).

6.2.7 Antimutagenes Potential

Ballaststoffe stellen eine weitere Gruppe von Apfelinhaltsstoffen dar, die neben ihrer essentiellen Rolle für die Verdauung vielseitige gesundheitsfördernde Eigenschaften besitzen. Eine besondere Funktion stellt dabei ihre antimutagene Wirkung gegenüber exogenen und endogenen Mutagenen dar (*Ferguson, 1994*). Insbesondere Apfelpektine zeigen eine direkte antimutagene Wirksamkeit z. B. gegenüber dem bekannten Mutagen 1-Nitropyren. Diese Verbindung ist vor allem in Dieselabgasen zu finden und zählt zu den polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (*Hensel et al. 1999*). Im klassischen Ames Test konnte eine Vorinkubation von *Salmonella* Stämmen mit verschiedenen Pektinen und pektinähnlichen Verbindungen (Xyloglukane) eine dosisabhängige Hemmung (20-50 %) der mutagenen Aktivität von 1-Nitropyren bewirken. Pektine sind in ihrem Aufbau durch ein Rhamnogalacturonan Rückgrat mit neutralen Seitenketten gekennzeichnet. Durch Hydrolyse der Seitenketten konnte dagegen die antimutagene Wirkung wieder aufgehoben werden. Polymere mit sauren Gruppen in den Seitenketten waren ähnlich wirksam, wogegen neutrale Polymere oder hochverzweigte Seitenketten inaktiv waren (*Hensel et al. 1999*). Ballaststoffe haben darüber hinaus eine hohe Wasserbindungskapazität, wodurch ihre Masse während der Darmpassage zunimmt und in Folge die Transitzeit durch den Darm erhöht wird. Dieser Effekt bewirkt eine Verdünnung der Konzentration mutagener Verbindungen im Darm und somit eine Verringerung des mutagenen Potentials. Ferguson et al. und Kestell et al. verglichen in einer Interventionsstudie mit Ratten die antimutagenen Eigenschaften widerstandsfähiger Stärke mit der von Polysacchariden ohne Stärke. Als Mutagen wurde das heterozyklische aromatische Amin (HAA) IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]-quinolin) eingesetzt. Lösliches Apfelpektin (10% in der Nahrung) wurde hierbei als Vertreter der nicht-Stärke Polysaccharide verwendet. Beide Ballaststoffarten bewirkten eine signifikante Erhöhung der Fäkalmasse und Transitzeit. Bemerkenswert ist allerdings, dass Stärke zu einer signifikanten Erhöhung der IQ Bioverfügbarkeit führte und nicht-stärkeartige Pektine (darunter auch Apfelpektin) dagegen eine signifikante Reduktion der IQ Bioverfügbarkeit, sowie eine verstärkte fäkale Exkretion bewirkten, wodurch das mutagene Potenzial vermindert wurde. Dieser entscheidende Effekt wird auf einen selektiven Einfluss auf die Expression IQ metabolisierender Enzyme zurückgeführt (*Ferguson et al. 2003; Kestell et al. 2004*).

6.2.8 Wirkung von Ballaststoffen aus Äpfeln *in-vivo*

Es existiert eine Vielzahl von Kurzzeit Interventionsstudien zur Untersuchung des Einflusses von Apfel-Ballaststoffen und -Zellwandbestandteilen auf intestinale Fermentationsprodukte, Steroide im Fäces und Serumlipide. Dies ist von besonderem Interesse, da z. B. das Verhältnis der sekundären Gallensäuren Lithocholsäure zu Deoxycholsäure als Risiko-Index für Dickdarmkrebs betrachtet wird. Sekundäre Gallensäuren werden hierbei durch den bakteriellen Metabolismus im Darm gebildet (*Owen et al., 1987*). Die „enzymatische Verflüssigung“ von Apfeltrester mit Hilfe von Zellulasen und Pektinasen ermöglicht die Produktion von Apfeltresteräften (B-Säfte) die sich durch höhere Gehalte an wertgebenden Inhaltsstoffen wie Ballaststoffe und Polyphenole auszeichnen (*Will F et al., 2000*). B-Säfte sind reich an Kolloiden die aus Galakturonsäuren (49-64 mol%) aufgebaut sind, des Weiteren enthalten sie Arabinose (14-23 mol%), Galaktose (6-15 mol%), sowie in geringen Mengen Rhamnose, Xylose und Glucose (*Mehrlander et al., 2002*). Sembries et al. verglichen den Einfluss von Kolloiden aus B-Säften und einer Alkohol-unlöslichen Substanz (AIS) auf das SCFA Profil und die intestinale Mikroflora in Ratten. Die Tiere die über einen Zeitraum von sechs Wochen 5 % Kolloide aus B-Saft erhielten, zeigten ein um 25 % niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren, obwohl die Nahrungsaufnahme in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war. In beiden Interventionsgruppen konnte zudem eine signifikante Abnahme des luminalen pH-Wertes und ein erhöhtes Kotgewicht verzeichnet werden. Die Apfel-Kolloide bewirkten eine verstärkte Bildung von Gesamt SCFA, erhöhte Acetat- und Propionatkonzentrationen im Blinddarm (Caecum) und Dickdarm, wohingegen AIS auch noch eine Erhöhung der Butyrat-Level bewirkte. Letztere Beobachtung wurde auf die Gegenwart von Zellulose im AIS und nicht auf Apfel-Kolloide zurückgeführt. Die AIS Intervention führte zu einer verstärkten Menge an intestinaler Mikroflora der Bakteriencluster *Eubacterium rectale*. Im Gegensatz dazu erhöhten die Apfel-Kolloide die Konzentration der Spezies *Bacteriodaceae* (*Sembries et al. 2003*). Ähnlich zu den Resultaten von Shimizu et al. (*Shimizu et al., 1996*), erhöhten Apfel-Kolloide und AIS die Exkretion primärer Gallensäuren von 30 % auf 88 %, wogegen die Konzentration sekundärer Gallensäuren reduziert wurde (*Sembries et al. 2003*). Analoge Effekte konnte nach Intervention eines verdünnten B-Saftes direkt als Getränk an Ratten beobachtet werden. Die beobachteten Ergebnisse legen, dass von der Aufnahme von Extraktionssäften, die besonders angereichert an pflanzlichen Inhaltsstoffen und Ballaststoffen sind, eine gesundheitsfördernde Wirkung ausgeht (*Sembries et al. 2006*). Dennoch sind Untersuchungen zur Langzeit krebspräventiven Wirksamkeit von Apfel-Kolloiden aus B-Säften erforderlich. Aprikian et al. untersuchten ebenfalls den Effekt von Apfelkomponenten auf die intestinale Fermentation und den Lipid-Metabolismus in Ratten (*Aprikian et al., 2003*). Hierzu erhielten die Tiere über drei Wochen eine Supplementat aus 5 % Apfelpektin oder 10 % gefriergetrocknete Mostäpfel, sowie eine Kombination aus Beiden. In allen drei Apfel-Gruppen kam es im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer signifikant erhöhten Bildung kurzkettiger Fettsäuren im Blinddarm (190 $\mu\text{Mol/ Caecum}$ = 84 mM), mit der höchsten Konzentration von 560 $\mu\text{Mol/ Caecum}$ (= 122 mM) durch die kombinierte Intervention. Die Autoren schlussfolgerten aus diesen Resultaten, dass die Wirkung von polyphenolreichen Fraktionen und Apfelpektinen auf die Darmfermentation und den Lipid-Metabolismus deutlich erhöht wird, wenn beide Fraktionen in Kombination verfüttert

werden und vermuten hieraus eine Wechselwirkung zwischen Polyphenolen und Ballaststoffen des Apfels (*Aprikian et al., 2003*).

6.3 Äpfel und Krebsprävention

Eine krebspräventive Wirksamkeit lässt sich endgültig nur mit Hilfe von in-vivo Studien demonstrieren, in denen z.B. eine Tumorzinzidenz und Multiplizität (Anzahl der Tumoren pro Tier) als Endpunkt dient. Bei der Untersuchung und Applikation chemopreventiver Verbindungen müssen jedoch toxikologische und pharmakologische Sicherheitsaspekte berücksichtigt werden. Ohnishi-Kameyama et al. untersuchten in diesem Zusammenhang einen polyphenolreichen Extrakt aus unreifen Äpfeln der in Japan unter dem Handelsnamen Applephenon® als Nahrungsergänzungsmittel kommerziell erhältlich ist auf die toxikologische Sicherheit. Der Extrakt enthält hohe Mengen an oligomeren Procyanidinen (64 %, Dimere bis 15mere), 12 % Flavan-3-ol Monomere, 7 % Flavonoide und 18 % nicht-Flavonoide (*Ohnishi-Kameyama et al., 1997*). Ein Gramm dieses Extraktes entspricht dem Polyphenolgehalt von vier Äpfeln (*Akazome, 2004*). Die Prüfung auf Mutagenität im Ames Test zeigte nur bei einem von fünf Bakterienstämmen eine leichte Erhöhung von Revertanten. Es wurde darüber hinaus kein Hinweis auf Mutagenität im Chromosomen-Abberationstest an chinesischen Hamsterlungenzellen, sowie im Mikronukleus-Test an Sprague-Dawley Ratten gefunden. Sowohl die akute, als auch die sub-chronische Toxizitätsuntersuchung mit einer Dosis von 2000 mg/kg Körpergewicht gaben kein Hinweis auf Toxizität, der Extrakt wurde daher als sicher betrachtet (*Shoji et al., 2004*). Untersuchungen zum krebspräventiven Potential von Apfelprodukten in vivo wurden vordergründig an Tiermodellen getestet, bei denen eine chemische- oder genetische Induktion von Tumoren der Haut, Brust, sowie dem Kolon vorausging. Ebenso werden Transplantate von Zellen, massive Tumoren oder Melanome bei Versuchstieren zur Untersuchung der Krebsprävention verwendet. So konnte in einer Studie mit Mäusen nach oraler Gabe eines wässrigen Apfelschalen-Extraktes (1 ml Wasser pro g Apfelschale; ad libitum) ein signifikanter Rückgang (um 55 %) der Anzahl von Hautpapillomen beobachtet werden, deren Wachstum zuvor durch 7, 12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) initiiert und mit 12-O-tetradecanolyphorbol-13-acetate (TPA) induziert wurde. Diese Wirkung wird auf einen antioxidativen Effekt des Apfelextraktes zurückgeführt, der über eine Blockierung ROS vermittelter MAPK-Kaskade Signaltransduktion und Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 erklärt wird (*Ding, Lu et al. 2004*). Liu et al. untersuchten den Einfluss eines polyphenol-angereicherten Apfelsaftextraktes auf DMBA-induzierten Brustkrebs in Ratten. Die Applikation von 9-54,4 mg Extrakt (entspricht 3,3 – 20 g an Äpfeln) pro kg Körpergewicht über Schlundsondierung für zwei Wochen vor und 24 Wochen nach Behandlung mit dem Karzinogen, führte zu einer Abnahme der Anzahl Tumor tragender Tiere in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis um 17 %, 39 % und 44 %. Die Anzahl der Tumoren pro Tier ging dabei ebenfalls auf 25 %, 25 % und 61 % nach 24 Wochen zurück (*Liu et al., 2005*). Ein kommerziell erhältlicher Apfelextrakt wurde in einem Xenograft Modell zur Untersuchung der Tumorzinzidenz und Metastasierung mit AH109A Ratten Aszites Hepatomzellen getestet. Die Intervention für 21 Tage mit Extrakt (0,1 % und 1 % im Futter) nach Inokulation der Tumorzellen in die Ratten, bewirkte einen signifikanten Rückgang des

Gewichts der soliden Tumoren um 64 % und 58 %. In beiden mit Extrakt behandelten Gruppen konnte zudem ein starker Rückgang der Anzahl von Lungen,- sowie Lymphknoten-Metastasen von 17 per 10 Tieren auf 1 per 10 Tiere beobachtet werden (*Miura et al. 2007*). In einer anderen Studie konnte nach Intervention von Apfelpolyphenolen und oligomeren Procyanidinen im Trinkwasser (1%) an Mäuse, eine Abnahme des Wachstums transplantierte B16 Melanomzellen, sowie eine höhere Überlebensrate bei den Wirtsmäusen festgestellt werden (*Miura et al. 2008*). Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten das Potenzial verschiedener Apfelprodukte (klarer und trüber Apfelsaft, phenolische Apfelextrakte, oligomere Procyanidine und Apfelpektin) auf ihr präventives Potenzial im Hinblick auf die Kolon Karzinogenese. Barth et al. verglichen einen klaren und trüben Apfelsaft (AS) in einer Interventionsstudie mit Ratten, hinsichtlich der präventiven Wirksamkeit in einem chemisch induzierten Kolonkrebsmodell, mit Dimethylhydrazin (DMH) als Kanzerogen (*Barth et al. 2005*). Nach einer achtwöchigen Apfelsaftintervention erwies sich der trübe AS als potenterer Inhibitor, bezüglich der karzinogen-induzierten Epithelzell-Proliferation und oxidativer DNA-Schäden, als der klare AS. Die Intervention mit trübem AS bewirkte zudem eine Abnahme der Anzahl abberanter Crypt-Foci (ACF), die als präneoplastische Marker für die Kolonkanzerogenese gelten. Der klare AS dagegen war diesbezüglich unwirksam. Die unterschiedlichen Ergebnisse durch die beiden AS sind möglicherweise auf unterschiedliche polyphenolische Zusammensetzung beider AS zurückzuführen, zumal trübe AS auch höhere Procyanidingehalte als klare AS aufweisen (*Oszmianski 2007, 2009; Huemmer et al. 2008*). In einer weiteren Studie von Barth et al. mit Fokus auf den trüben AS, konnten sie demonstrieren, dass weder der polyphenolische Apfelsaftextrakt noch die trübe Fraktion, alleine oder in Kombination, eine signifikante Reduktion der ACF Anzahl bewirken konnten. Eine bedeutende Rolle bei der Darmkrebsprävention wird auch den oligomeren Procyanidinen zugesprochen (*Gosse et al. 2006*). Bei Azoxymethan (AOM) behandelten Ratten konnte nach Intervention (0,01% im Trinkwasser) mit einer Procyanidin angereicherten Fraktion (Fraktion P) aus Äpfeln eine signifikante Reduktion der ACF Anzahl im Kolon um 50 % erreicht werden (*Gosse et al., 2006*). In einer früheren Rattenstudie von Ohkami et al., konnte nach Zugabe von 20 % Apfelpektin zur Nahrung eine signifikante Reduktion der Inzidenz und Multiplizität von AOM-induzierten Adenomen und Tumoren im Kolon beobachtet werden (*Ohkami et al., 1995*). Die Apfelpektin Intervention führte gleichzeitig zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichts dieser Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dies obwohl beide Gruppen die gleiche Menge an Nahrung pro Tag zu sich nahmen, die jedoch nicht auf Unterschiede in der verfügbaren Energie eingestellt war. Einen ähnlichen Effekt bewirkte die Intervention mit Zitruspektinen. Da hierbei jedoch keine Abnahme in der Zahl der Tumore verzeichnet werden konnte, schlussfolgerten die Autoren, dass die beobachtete Körpergewichtsabnahme alleine, kein hinreichender krebspräventiver Effekt darstellt. Dagegen wird eher ein transienter Effekt auf die Enzymaktivitäten der Darmbakterien diskutiert (*Ohkami et al., 1995*). Ein weiteres geeignetes und weit verbreitetes Modell zur Untersuchung von Chemopräventionsstudien stellt der sogenannte C57BL/6-APC^{Min} (APC^{Min}) Maus-Stamm dar. Hierbei handelt es sich um ein genetisch erzeugtes Mausmodell, das durch Entwicklung multipler intestinaler Neoplasien charakterisiert ist. Eine zehnwöchige Intervention mit einem trübem Apfelsaft, sowie einem polyphenol angereicherten Apfelsaftextrakt aus einer 1:1 Mischung von AE02 und AE03 (0,2 %

im Trinkwasser) bewirkte eine signifikante Abnahme der Anzahl der Adenome um 38 % bzw. 40 % im Dünndarm männlicher APC^{Min} Mäuse. Die Extrakt-Intervention führte zudem, zu einer Erhöhung des Hämatokrit Wertes, welcher bei APC^{Min} Mäusen als Zeichen von Darmblutungen verringert sind. Ein weiterer pathologischer Parameter ist auch ein fünffach höheres Milzgewicht dieser Tiere im Vergleich zum Wildtyp; die Extrakt-Intervention führte auch hier zu einer signifikanten Abnahme (*Pan, 2005; Gerhauser, 2007*). In einer anderen APC^{Min} Studie untersuchten Mandir et al. den Einfluss eines Apfeltrester-Präparates auf Zellproliferation, Kryptteilung und Polypenbildung. Apfeltrester fällt als Abfallprodukt bei der Apfelsaftherstellung an, stellt jedoch eine reichliche Quelle für nichtstärkehaltige hochfermentierbare Polysaccharide dar, mit Gehalten von 23,9 g pro 100 g Trester. Interessanterweise bewirkte der Apfeltrester (20 % im Futter) eine signifikante Erhöhung in der Zahl der Dünndarmpolypen und Polypen bei weiblichen APC^{Min} Mäusen. Darüber hinaus konnte eine Vergrößerung der Adenome im Kolon und auch eine Zunahme in deren Häufigkeit festgestellt werden. Die Ergebnisse sind überraschend, aber stimmen überein mit früheren Untersuchungen von fermentierbaren Kohlenhydraten. Als Erklärung für die beobachteten Resultate wird eine erhöhte Bildung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) diskutiert, die eine Stimulierung der Darmzellen bewirken (*Goodlad et al. 1995*). Die Rolle von Ballaststoffen bei der Krebsprävention wird nach wie vor kontrovers diskutiert, dennoch konnte ein protektiver Effekt z. B. mit Roggenkleie beobachtet werden, welches ebenfalls sehr reich an Ballaststoffen ist (*Sengupta et al. 2006; Mandir et al. 2008*).

6.3.1 Humane Kurzzeit-Interventionsstudien: Modulation des antioxidativen Status

In in vitro Modellen haben sich Apfelpolyphenole als besonders potente Radikalfänger und Antioxidantien erwiesen, hieraus ergibt sich natürlich die Frage, inwieweit diese Wirksamkeit auch für die in vivo Situation gültig ist. Eine humane Kurzzeit-Interventionsstudie gibt einen Hinweis auf potenzielle gesundheitsfördernde und krebspräventive Aktivität, durch gezielte Untersuchung der Modulation ausgewählter Biomarker. Im Folgenden werden einige Studien vorgestellt, deren Fokus insbesondere auf der Modulation des antioxidativen Status und den Einfluss auf oxidative Stressmarker nach Verzehr von Äpfeln und Apfelsaft liegt. Ko et al. stellten 30 Minuten nach Verzehr von 150 ml Apfelsaft im Serum von 10 gesunden Probanden eine verbesserte antioxidative Kapazität gegen Hydroxylradikale fest. Hierbei wurde der Apfelsaft auch mit anderen Fruchtsäften verglichen. Orangensaft erwies sich als am wirksamsten in der antioxidativen Kapazität, wogegen Birnensaft sich als nahezu unwirksam erwies (*Ko et al., 2005*). Chrzczanowicz et al. konnten in einer humanen Interventionsstudie mit 12 gesunden Probanden bereits eine Stunde nach Verzehr von 1L trübem Apfelsaft eine erhöhte DPPH Radikal-abfangende Aktivität im Serum beobachten (*Chrzczanowicz et al. 2008*). In einer anderen Studie von Maffei et al., erhielten sechs männliche Probanden (Nichtraucher) ein Homogenat aus 600 g ungeschälten Äpfeln. Im Vergleich zu den 0h Lymphozyten-Proben, konnte drei Stunden nach Verzehr des Apfelhomogenats eine signifikante Hemmung der H₂O₂ induzierten Mikrokernbildung in den Lymphozyten festgestellt werden. Die Werte reduzierten sich dabei allmählich 6h bis 24h nach Verzehr auf die ursprünglichen Basiswerte (*Maffei et al. 2007*). In Übereinstimmung mit diesem Resultat berichten Briviba et al. dass 24h Stunden nach einmaligem Verzehr von je 1 kg Äpfeln (aus biologischem und konventionellem Anbau) durch

10 gesunde Probanden, keine Veränderung mehr in der antioxidativen Kapazität im Plasma, endogener DNA-Strangbrüche, sowie im Schutz vor H₂O₂ induzierten DNA-Schäden in Lymphozyten festgestellt werden konnte. Allerdings konnte ein geringerer Level an Endo-III sensitiven Stellen (spezifisch für oxidierte Pyrimidin-Basen) in der Lymphozyten DNA beobachtet werden. Die Art der Apfelherstellung dagegen hatte keinen Einfluss auf den Polyphenolgehalt, sowie auf die gemessenen biologischen Endpunkte (*Briviba et al., 2007*). Mayer et al. untersuchten die antioxidative Kapazität im Plasma mit Hilfe einer Hochdurchsatz Fluoreszenz Screeningmethode. Hierbei wurden zwei Fluorophore eingesetzt, die als Oxidationsmarker in der wässrigen- und in der Lipid-Phase des Serums entwickelt wurden. In dieser Verzehrsstudie aßen 47 gesunde Probanden täglich je 1 kg Äpfel für vier Tage, was einer Aufnahme von 2,7 g Gesamtpolyphenolen/ kg frischer Äpfel entspricht. Bereits drei Stunden nach Apfelverzehr kam es zu einer erhöhten antioxidativen Kapazität in der wässrigen Phase des Serums, dagegen nicht in der lipophilen Phase. Der Effekt war zudem vorübergehend und eine Zunahme in der antioxidativen Kapazität nach viertägigem Apfelverzehr konnte nicht festgestellt werden (*Mayer et al., 2001*). Wilms et al. konnten bei acht weiblichen Probanden nach vierwöchigem Verzehr eines Mischsaftes aus Heidelbeer- und Apfelsaft (1 L täglich, Aufnahme von 18 mg Quercetin) eine signifikante Zunahme der Quercetin Level im Plasma von 1,5 ng/ ml (5 nM) vor der Intervention auf 3,1 ng/ ml (10,6 nM) am Ende der Studie beobachten (*Wilms et al., 2007*). In einer größeren Follow-up Studie mit 168 gesunden Probanden erhielten die Teilnehmer ebenfalls ein Mischsaft aus Heidelbeer- und Apfelsaft (1 L täglich, Aufnahme von 97 mg Quercetin und 16 mg Ascorbinsäure). In dieser Folgestudie wurde u. a. der Effekt von 34 genetischen Polymorphismen auf DNA Schäden in Lymphozyten untersucht. Die Plasmakonzentrationen von Quercetin, Ascorbinsäure und die antioxidative Kapazität wurden nach der vierwöchigen Saftintervention signifikant erhöht. Desweiteren konnte ex vivo ein Schutz lymphozyterer DNA gegen H₂O₂ induzierter DNA-Schäden beobachtet werden, dagegen wurde durch die Intervention der Gehalt an ex vivo induzierten B[a]P-Diolepid-DNA Addukten um 28 % erhöht. Der Ausgang der Intervention wurde durch sechs genetische Polymorphismen signifikant beeinflusst (NQO1*2, Quercetin-Level; Cat1, Ascorbinsäure-Level; GSTT1 Deletion, Antioxidative Kapazität im Plasma und induzierte oxidative DNA Schäden in Lymphozyten; CYP1B1*5 und COMT1, B[a]P-Diolepid-DNA Addukt-Level) (*Wilms et al. 2007*). Die beobachtete Zunahme in der antioxidativen Kapazität im Plasma beruht nicht nur auf der Wirkung antioxidativer Flavonoide im Apfel, sondern auch auf der von Fruktose im Apfel. Dieser Fruchtzucker ist in Äpfeln in hohem Maße enthalten und hat einen metabolischen Effekt auf die Harnsäurekonzentration im Plasma, Harnsäure wiederum ist ein wichtiges endogenes Antioxidanz (*Lotito et al. 2004; 2006*). In einer Crossover Studie mit Männern und Frauen konnten Hyson et al. nach sechs wöchiger Intervention mit 375 ml Apfelsaft, bzw. 340 g Äpfeln, ex vivo eine signifikante Verzögerung der Cu²⁺ vermittelten Low-Density Lipoprotein Oxidation um 20 % im Vergleich zum Basiswert beobachten. Äpfel und Apfelsaft führten zu einer reduzierten Bildung konjugierter Diene. Die Autoren schlussfolgern aus diesen Resultaten, dass moderater Apfelverzehr möglicherweise einen präventiven Beitrag zum Schutz vor koronaren Gefäßerkrankungen leistet, zumal Letztere Erkrankungen in einem engen Zusammenhang mit erhöhter LDL Oxidation im Plasma steht (*Hyson et al., 2000*).

7. Herstellung der Apfelsaftextrakte und Apfelsäfte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apfelsaftextrakte (AE) und Apfelsäfte wurden im Institut für Oenologie und Getränkeforschung der Forschungsanstalt Geisenheim in der AG Prof. Dietrich hergestellt und im Rahmen der gemeinsamen Projekte zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden die entsprechenden Säfte einer Festphasenextraktion unterzogen, wodurch die Polyphenole an Adsorberharze (XAD16; P-495) gebunden werden. Zucker, organische Säuren und Mineralstoffe wurden durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Die Elution phenolischer Substanzen erfolgte mittels 96 %igem Ethanol. Der ethanolische Extrakt wurde daraufhin eingeeengt, in die wässrige Phase überführt und lyophilisiert (*Schaefer et al., 2006b; Schaefer et al., 2006a*).

7.1 Zusammensetzung der *in-vitro* eingesetzten Apfelsaftextrakte

Die verschiedenen Extrakte wurden teilweise sortenrein, oder auch aus unterschiedlichen Apfelsorten hergestellt. Darüber hinaus wurden für die Herstellung der einzelnen Extrakte auch unterschiedliche Technologien angewandt, was in AEs mit z.T. sehr unterschiedlichen Polyphenolprofilen resultierte (Tab.11) (*Will et al, 2006*).

Apfelsaftextrakt 02 (AE02)

Der Apfelsaftextrakt AE02 besteht aus einer Mischung verschiedener Apfelsorten der Ernte 2002. Zum überwiegenden Teil wurden Mostapfelsorten (22,5 % Winterrambour, 17,5 % Bohnapfel, 15 % Bittenfelder) und zu 25 % der Tafelapfel Topaz und zu 20 % Tafeläpfel wie Jonagold verarbeitet. Der AE02 weist hohe Gehalte an Phloretin-Glykosiden und Chlorogensäure auf.

Tresterapfelsaftextrakt 03 (AE03)

Für die Herstellung dieses Extraktes wurden die bereits einmal ausgepressten Tafeläpfel der Ernte 2003 und der Sorten Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold verarbeitet. Der ausgepresste Rückstand (Trester) wurde für zwei Stunden mit Pektinasen und Cellulasen behandelt, um die verbliebenen Polyphenole zu lösen. Aus dem erhaltenen „Tresterextraktionsssaft“ wurde anschließend der Extrakt gewonnen. Im Vergleich zu den anderen Extrakten weist der AE03 den höchsten Gehalt an Quercetin-Glykosiden auf, welcher nur noch durch Schalenextrakte übertroffen werden kann.

AE05

Der Extrakt AE05 wurde aus den Mostapfelsorten Bohnapfel (23%), Topaz (24%), Seeestermühler (25%), Bittenfelder (10%) und Börtlinger Weinapfel (18%) hergestellt.

AE06

Der Extrakt AE06 wurde aus den Mostapfelsorten Bohnapfel (10%), Maunzen (40%), Winterrambour (10%), sowie einem Anteil von 35 % aus Tafeläpfeln hergestellt.

Bohnapfelsaftextrakt (BAE)

Der Bohnapfelextrakt ist ein sortenreiner Extrakt aus Bohnäpfeln.

Tabelle 11: Polyphenolprofil der Apfelsaftextrakte [mg/L]

	klar				trüb	Bohnapfelsaft- extrakt
	AE02	AE03B	AE05	AE06	AE07	
Procyanidin B1	7	6,2	2,4	2,1	2,5	8,5
(+)-Catechin	n.n.	2,7	5,9	4,2	4,8	23,1
Procyanidin B2	15,1	18,4	n.n.	28,6	20,6	39
(-)-Epicatechin	19,2	17,7	5,9	30,4	12,8	63,3
Procyanidin C1		3,4	2,5	16	3,9	23,1
Phloretin-2-xyloglucosid	66,2	31,7	28,2	29,1	54,2	237,1
Phloridzin	27,9	78,9	28,7	9,2	23,6	27,5
unbek. Dihydrochalk.						29,2
Chlorogensäure	181,5	19,2	183,9	140,3	124,9	190,7
**Krypto-chlorogensäure	n.n.	1,2	20,9	4,1	16,3	8
*Cumaroylglucose	n.n.	n.n.	2,9	0,1	1,2	0,7
Kaffeensäure	4,8	4	3,9	0,1	0	20,1
3-Cumaroyl-Chinasäure	9,5	3	2	3,1	5,5	2,4
4-Cumaroyl-Chinasäure	77,3	5	84,9	37,3	98,2	21,7
5-Cumaroyl-Chinasäure	10,4	3,8	n.n.	2	0	1,3
p-Cumarsäure	n.n.	4,2	1,3	0,2	1	1
Que-3-rut	2,6	49,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Que-3-gal	0,8	8,1	1,5	1	1,1	4
Que-3-glc	1,4	12,3	0,7	0,5	0,4	1,4
Que-3-xyl	n.n.	18,1	n.n.	0,3	0,6	1
Que-3-ara	n.n.	3,5	n.n.	0,2	0,9	2,3
Que-3-rha	4,1	25,1	1,3	1,4	1,5	4,8
Gesamt	427,8	315,6	376,9	310,3	373,7	710,3
<input type="checkbox"/> Flavan-3-ole	41,3	48,4	16,7	81,3	44,5	157
<input type="checkbox"/> Dihydrochalcone	94,1	110,6	56,9	38,4	77,7	293,8
<input type="checkbox"/> Phenolsäuren	283,5	40,4	299,8	187,3	247,1	245,9
<input type="checkbox"/> Flavonole	8,9	116,2	3,5	3,4	4,4	13,5

*berechnet als Cumarsäure; ** berechnet als Chlorogensäure

Tabelle 12: Gesamtbilanz der analytischen Parameter

		AE02	AE03B	AE05	AE06	AE07
Phenole (HPLC)	[%]	42,8	31,6	37,7	31	37,4
Zuckerbausteine (HPAEC)	[%]	16,3	22,8	13	8,7	10,3
Procyanidine (photometr.)	[%]	36	46	24	57	48,3
Summe	[%]	95,1	100,4	74,7	96,7	96

7.2 Herstellung des „Apfelsmoothie“ für die Ileostoma-Studie

Bei dem verwendeten Studiensaft handelt es sich um einen sortenreinen Smoothie, der aus einem Verschnitt von Apfelsaft mit 40% Apfelmark besteht und aus Äpfeln der Sorte Winesap (Ernte 2007) hergestellt wurde. Die Äpfel wurden am 15.10.2007 aus dem Glantal geliefert und am 16.10.2007 aus 200 kg Winesap-Äpfeln der entsprechende sortenreine Smoothie hergestellt. Aufgrund der besonderen Zusammensetzung, des Herstellungsverfahrens, der Sorte und des Anbaugebietes, zeichnet sich dieser Smoothie durch einen hohen natürlichen Polyphenol- und Pektingehalt aus. Die einzelnen Schritte der Herstellung werden im Folgenden kurz erläutert. Zunächst wurden die Äpfel in einer Seepex-Schneidmühle zerkleinert und anschließend zur Inaktivierung der fruchteigenen Enzyme mittels Röhrentauscher auf 90°C erhitzt und wieder zurückgekühlt. Nach Zusatz von 350 mg/kg Ascorbinsäure als Oxidationsschutz, wurden die zerkleinerten Äpfel einer Enzymbehandlung unterzogen. Zur Enzymierung wurde ein Macerationsenzym (Rohament PL, 150 ml/t) und zur Stärkebeseitigung eine Amylase (Panzym HT, 50 ml/t) zugegeben. Daran schloss sich ein 60minütige Enzymierungszeit an, bevor diese wieder auf 90°C erhitzt und dabei inaktiviert wurden. Der zweistufige Erhitzungsprozess hatte keine negativen sensorischen Veränderungen zur Folge. Anschließend wurde die Maische über eine Passiermaschine (Leonhard L400) mit einer Siebgröße von 0,6 mm gegeben, von dem erhaltenen Mark wurde eine Kernmenge von 104 kg entnommen. Aus 400 kg der Winesap-Äpfel wurde am gleichen Tag ein naturtrüber Apfelsaft hergestellt. Hierzu wurden die Äpfel zerkleinert (Seepex-Schneidmühle) und die Maische gepresst (Bucher HP-L200 Presse). Auch hier wurde als Oxidationsschutz 350 mg/kg Ascorbinsäure zugesetzt. Der Verschnitt zum fertigen Smoothie erfolgte aus Mark und trüben Saft mit einem Verhältnis von 40% Mark zu 60% Saft, da in Vorversuchen der AG Prof Dietrich u. a. festgestellt wurde dass mit dieser Zusammensetzung das Produkt noch getrunken werden konnte. Bei einem höheren Markanteil wurde diese Eigenschaft aufgrund der hohen Viskosität nicht mehr erfüllt (*Will F et al., 2008*). Für den eigentlichen Verschnitt wurden schließlich 104 kg des Marks mit 156 kg des trüben Saftes mit einem Schneebesens verschnitten und zur Homogenisierung wurde dieser Ansatz mit einem Supraton Düsenwerkzeug bei 6 bar Gegendruck behandelt. Der fertige Apfelsmoothie wurde anschließend heiß in 0,7 L Schlegelflaschen gefüllt.

7.2.2 Polyphenolzusammensetzung des Apfelsmoothie

Durch die zähflüssige Konsistenz des Smoothiees konnte dieser nicht direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt werden, durch eine Membranfiltration würden zudem an Trubbbestandteile gebundene Phenole nicht erfasst werden. Als geeignete Methode erwies sich daher eine Gefriertrocknung des Apfelsmoothies (Trockenmasse 15,6%) mit anschließender Lösungsmittelextraktion der polyphenolischen Inhaltsstoffe. Das Lyophilisat ist aufgrund des Zuckergehaltes jedoch sehr klebrig und hygroskopisch. Die Herstellung eines polyphenolischen Extraktes war aufgrund dieser Eigenschaften nicht möglich. Eine zweistufige Extraktion (jeweils über 60 min) mit 30% MeOH im Reagenzglasschüttler, zeigte hierbei die besten Resultate und es konnten mit dieser Methode ca. 240 mg/L mit HPLC erfassbare Polyphenole extrahiert werden. Parallel dazu wurde der Apfelsmoothie membranfiltriert (0,45 µm, mit Glasfaserfritte) und direkt über RP-HPLC/

DAD analysiert. Tabelle 13 zeigt die Polyphenolprofile des filtrierte und direkt eingesetzten Apfelsmoothies und des damit korrespondierenden trüben Apfelsaftes der Sorte Winesap, der am gleichen Tag hergestellt wurde. Der Verschnitt des naturtrüben Apfelsaftes mit Apfelmark führt zu einer deutlichen Steigerung des Gesamtpolyphenolgehaltes (HPLC-Detektion). Besonders auffällig ist hierbei der Anstieg der Flavanolgehalte, was sich bei Procyanidin B1 in einer Verdopplung und bei Procyanidin B2 sogar in einer Erhöhung um Faktor 3 äußert. Alle anderen Flavonole zeigen ebenfalls eine deutliche Konzentrationssteigerung. Sehr positiv zu bewerten ist auch der dreifache Anstieg an Quercetinderivaten im Apfelsmoothie im Vergleich zum trüben Apfelsaft. Insgesamt ist die deutliche Steigerung der Flavanele und Flavonole auf die Verarbeitung der ganzen Äpfel bei der Markherstellung zurückzuführen. Dabei werden die Äpfel nicht gepresst, sondern nach der Zerkleinerung und Enzymierung passiert. Im Gegensatz zu einem konventionell hergestellten naturtrüben Apfelsaft werden in diesem Verfahren die Schalen mitverarbeitet. Es ist bekannt, dass die Quercetinderivate hauptsächlich in der Schale lokalisiert sind, gleiches gilt für die Flavanele. Diese befinden sich zusätzlich noch im Kerngehäuse der Äpfel und nur in geringen Mengen im Parenchym. Die Phenolcarbonsäuren im Gegensatz dazu sind hauptsächlich im Parenchym lokalisiert, deshalb ist die Steigerung dieser Gehalte nicht so hoch wie bei den beiden anderen Flavonoidgruppen (*Thielen C et al., 2004*). Durch den Verschnitt des Ganzfruchtprodukts Apfelmark mit einem naturtrüben Apfelsaft aus Mostäpfeln wurde ein trinkfähiges Produkt mit angenehmen sensorischen Eigenschaften entwickelt, das für diese Humanstudie sehr gut geeignet ist. Schließlich wird noch auf den hohen Ballaststoffgehalt dieses Getränks hingewiesen, was ebenfalls als positiv zu bewerten ist (*Will F et al., 2008*).

Tabelle 13: Polyphenolprofil (RP-HPLC/DAD) des Apfelsmoothie 2007 und des naturtrüben Apfelsaftes der Sorte Winesap (Quelle: AG Prof. Dietrich, FA Geisenheim, Netzwerkbericht (*BMBF, 2007*)).

	Mittelwert (n=4)	Mittelwert (n=2)
	Apfelsmoothie (Winesap)	Trüber Apfelsaft (Winesap)
Procyanidin B1	20,0	9,9
Catechin	26,6	21,8
Procyanidin B2	110,4	36,4
Epicatechin	79,7	42,8
Procyanidin C1	41,5	17,7
Phloretin-2'-xyloglucosid	70,0	47,9
Phlorizin	29,2	16,3
Σ Flavanele und Dihydrochalkone	377,0	192,8
Cumaroylglucose	0,6	0,9
Chlorogensäure	170,6	134,1
Kryptochlorogensäure	8,1	8,5
Kaffeensäure	1,3	0,7
3-Cumaroyl-Chinasäure	9,3	6,9
4-Cumaroyl-Chinasäure	61,7	54,8
Cumarsäure	2,0	1,1

Σ Phenolcarbonsäuren	253,6	206,8
Quercetin-3-galactosid	7,0	1,6
Quercetin-3-glucosid	1,1	0,4
Quercetin-3-xylosid	1,5	0,7
Quercetin-3-arabinosid	4,4	1,4
Quercetin-3-rhamnosid	4,6	2,5
Σ Quercetinderivate	18,7	6,6
Gesamt [mg/l]	649,4	406,2

7.3. Herstellung und Analytik der Apfelsäfte für die Interventionsstudie an Ratten

In der Interventionsstudie an Ratten wurde der Einfluss unterschiedlich hergestellter Apfelsäfte (klarer/ trüber AS, Smoothie, im Vergleich zu einem polyphenolfreien Kontrollsaft) auf die Modulation ARE abhängiger Genexpression in Kolon und Leber männlicher Sprague-Dawley untersucht. Der hierfür eingesetzte klare, als auch trübe AS wurden aus dem gleichen Rohmaterial hergestellt (*Will F et al., 2008*). Diese besteht aus einer Mischung von Mostapfelsorten (10% Bohnapfel, 10% Winterrambour, 45% Maunzen) und 35% Tafeläpfeln. Die Früchte wurden zerkleinert, mit einer Horizontalpresse entsaftet, der hieraus entstandene Saft zentrifugiert, pasteurisiert und für die weitere Separation vorbereitet. Am Ende wurde der trübe Saft heiß in 0,75 L Schlegelflaschen gefüllt. Der klare AS wurde aus dem trüben AS nach Pektinase-Behandlung und anschließender Cross-flow Filtration hergestellt. Der Smoothie (AMS) wurde sortenrein aus Boskoop Äpfeln hergestellt und durch Verschnitt des trüben AS mit 40 % des entsprechenden Marks erhalten (*Will F et al., 2008*). Letzteres wurde wiederum nach enzymatischer Behandlung der Pulpe mit Mazerationsenzymen bzw. pektinasefreier Amylase, sowie Erhitzung und anschließender Pressung durch ein Blender hergestellt (*Will F et al., 2008*). Der polyphenolfreie Kontrollsaft dagegen, wurde aus klarem AS nach SP70 Adsorberharz-Behandlung erhalten (*Will F et al., 2006*). Das hieraus gewonnene farblose Eluat enthielt Zucker, organische Säuren und Mineralien, wohingegen die Polyphenolfraktion vollständig an der Säule zurückgehalten wurde. Alle Säfte wurden bei 4 °C gelagert. Der klare, trübe, sowie der Kontrollsaft wurden direkt nach Membranfiltration (0,45 µM) auf die analytischen Grundparameter, Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu Reaktion, FCR; ausgedrückt als (+)-Catechinäquivalente), Konzentration polyphenolischer Inhaltsstoffe (HPLC-Photodiode Array Detector, PDA) und Trolox äquivalent antioxidant capacity (TEAC) (*Will F et al., 2000; Netzel M et al., 2005*). Analytische Grundparameter, Gesamtphenolgehalt und TEAC wurden im Smoothie nach Zentrifugation aus dem Überstand bestimmt. Die polyphenolischen Inhaltsstoffe wurden aus dem methanolischen Extrakt der gefriergetrockneten Probe mittels HPLC-PDA analysiert (*Will F et al., 2008*).

7.3.1 Zusammensetzung der Apfelsäfte und antioxidative Kapazität

Die analytischen Grundparameter (Tab. 14) liegen in einem für Apfelsäfte gewöhnlichen Bereich. Der hohe Gehalt an titrierbaren Säuren und Gesamtphenolen im klaren und insbesondere im trüben AS, spiegelt den Hauptanteil an Mostäpfeln in diesem AS wieder. Dementsprechend ist die Konzentration an titrierbaren Säuren im Smoothie am höchsten, da dieser sortenrein aus Boskoop-Äpfeln hergestellt wurde. Die Gesamtphenolkonzentration (FCR) ist im trüben AS leicht höher als im klaren AS und Smoothie. Im Falle des Smoothies liegt der tatsächliche Wert der Gesamtphenolkonzentration wahrscheinlich viel höher, da die Messung aus dem zentrifugierten Überstand erfolgte und an Partikel gebundene Polyphenole somit nicht miterfasst werden. Das individuelle Polyphenolmuster (Tabelle 15) wurde für den klaren und trüben AS aus dem Filtrat bestimmt (HPLC-PDA) und ist für beide Säfte ähnlich (Abb. 34). In beiden AS liegt als Hauptkomponente Chlorogensäure (5-Caffeoyl Chinasäure) vor, gefolgt von Procyanidinen, Coumaroylchinasäuren und Epicatechin. Im Unterschied zu den beiden AS wies der Smoothie weit höhere Gehalte an Chlorogensäure, Phloretin-2'-Xyloglucosid, Phloridzin und Quercetin-Glycoside auf. Procyanidin B2 und C1, sowie Coumaroylchinasäure waren jedoch in geringerer Konzentration enthalten. Die Summe des individuellen Polyphenolgehaltes (bestimmt aus dem methanolischen Extrakt), lag im Vergleich zum klaren AS um 22% und trüben AS mit 26 % höher. Die höhere Polyphenolkonzentration ist möglicherweise auf den Unterschied in den Rohmaterialien, sowie auf den Zusatz von Püree zurückzuführen. Darüber hinaus wird durch die methanolische Extraktion eine um 13 % höhere Polyphenolausbeute im Gegensatz zur direkten Bestimmung nach Zentrifugation erzielt (*Will F et al., 2008*). Durch den Zusatz von Apfelpüree zum entsprechenden trüben Ausgangssaft wird die Polyphenolkonzentration um 100 % erhöht (*Will F et al., 2008*). Die Adsorberharzbehandlung des Kontrollsaftes resultierte in einer vollständigen Elimination phenolischer Verbindungen (HPLC-PDA und FCR), andere Parameter im Saft blieben dagegen weitestgehend unverändert. Dies macht deutlich, dass der Unterschied, dass der Unterschied zwischen Kontrollsaft und den AS hauptsächlich auf dem Fehlen phenolischer Inhaltsstoffe beruht.

Die antioxidative Kapazität der AS (8,5-10,8 mmol/L Trolox) übersteigt deutlich die der konventionellen Apfelsäfte (*Netzel M et al., 2005*). Die relativ ähnlichen TEAC Werte zwischen klarem und trübem AS können auf deren vergleichbaren Polyphenol- und insbesondere Procyanidingehalt zurückgeführt werden. Der TEAC Wert des Smoothies liegt vergleichsweise zu den beiden AS nicht viel höher. Da die Bestimmung im zentrifugierten Überstand erfolgte, könnten hierbei an Trub gebundene antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe nicht mehr erfasst werden. Im Kontrollsaft dagegen konnte keine TEAC Aktivität gemessen werden, was in dem fehlenden Polyphenolanteil begründet ist.

Tabelle 14: Basisparameter und Gesamtphenolgehalt der Säfte

Parameter	Einheit	Kontrollsaft	klarer AS	trüber AS	Smoothie
Relative Dichte	20/20	1,04918	1,05001	1,05055	1,0566
Brix	°	11,78	12,05	12,21	13,52
Leitfähigkeit [20 °C]	$S^x m^{-1}$	2160	2250	2210	2560

Sorbitol	g/L	4,6	4,6	4,7	6,2
pH - Wert		3,43	3,13	3,13	3,1
titrierbare Gesamtsäure ¹	g/L	7,09	7,34	7,44	10,6
Extrakt	g/L	127,7	129,8	131,4	147,8
Glukose	g/L	23,7	19,6	18,9	30,4
Fruktose	g/L	71,4	68,2	69,2	69,6
Saccharose	g/L	16,9	20,2	21,7	23,3
Asche	g/L	n.a.	n.a.	n.a.	2,88
Kalium	mg/L	1146	1114	1145	1366
Magnesium	mg/L	48	49	51	53
Kalzium	mg/L	49	43	49	47
Natrium	mg/L	7	9	8	10,4
zuckerfreier Extrakt	g/L	15,7	21,8	21,6	18,3
Σ Zucker	g/L	112	108	109,8	123,3
Gesamtphenole (FCR) ²	mg/L	n.d.	1027	1343	1339

n.d.: nicht detektierbar; n.a.: nicht analysiert

¹ ausgedrückt als Maleinsäure bei pH 8,1

² Folin Reaktion; ausgedrückt als (+)-Catechin Äquivalente

Tabelle 15: Phenolische Inhaltsstoffe und antioxidative Kapazität (TEAC) des klaren /trüben Apfelsaftes und Smoothiees

Phenolische Inhaltsstoffe [mg/L] ¹	klarer AS	trüber AS	Smoothie (<i>Will F et al., 2008</i>)
Procyanidin B1	5.7	8.5	9.3
(+)-Catechin	8.7	6.9	15.9
Procyanidin B2	62.0	71.2	25.8
(-)-Epicatechin	57.2	36.3	34.9
Procyanidin C1	32.3	35.8	18.9
Σ Flavanole	165.9	158.7	104.8
Phloretin-2'-Xyloglukosid	40.6	40.9	126.5
Phloridzin	11.6	9.0	84.5
Σ Dihydrochalkone	52.2	49.9	211.0
Chlorogensäure	186.8	177.8	253.6
Kryptochlorogensäure ²	4.7	5.3	6.1
Kaffeesäure	0.0	0.2	0.4
3-Cumaroylchinasäure	4.9	4.5	1.4
4-Cumaroylchinasäure	49.3	41.8	17.8
5-Cumaroylchinasäure	4.3	5.5	1.5

Σ Hydroxyzimtsäuren	249.8	235	280.8
Quercetin-3-galaktosid	1.5	1.3	3.6
Quercetin-3-glukosid	0.7	0.6	1.1
Quercetin-3-xylosid	0.5	0.3	2.2
Quercetin-3-arabinosid	0.8	0.4	3.5
Quercetin-3-rhamnosid	2.1	1.5	2.7
Σ Flavonole	5.6	4.1	13.1
Σ Polyphenole	473.5	447.7	609.7
TEAC (mmol/L Trolox)	8.5	9.8	10.8

n.d.: nicht detektierbar; n.a.: nicht analysiert

¹ HPLC-PDA (photodiode array detector) of methanolischer Extrakte

² berechnet als Chlorogensäure

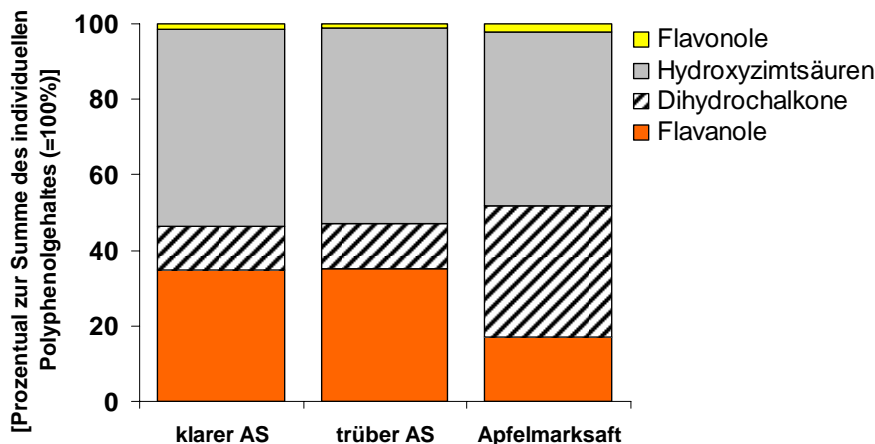


Abbildung 34: Prozentuale Polyphenolzusammensetzung der Apfelsäfte. Werte sind dargestellt als prozentualer Anteil der Summe der individuellen Polyphenolkonzentration (=100 %).

7.4 Herstellung und Zusammensetzung des roten Mehrfruchtsaftes für die Interventionsstudie mit HD-Patienten

Der in der humanen Interventionsstudie von Spormann et al. eingesetzte anthocyanreiche Mehrfruchtsaft besteht aus rotem Traubensaft (40%), Brombeersaft (20%), Sauerkirschsafte (15%), schwarzem Johannisbeersaft (15%) und Holunderbeersaft (10%) (*Spormann et al., 2008*). Die Trauben bzw. die Beeren wurden schonend gemahlen, um den Eintrag von Bitterstoffen aus den Kernen zu vermeiden. Zudem enthalten schwarze Johannisbeeren wie die meisten Beeren verhältnismäßig große Mengen Pektin, was eine effektive Entsaftung der Maische stört. Um das Pektin zu entfernen, wurde die Maische auf 50°C erwärmt und mit Enzympräparaten versetzt, die pektinabbauende Pektinasen enthalten. Die Erwärmung war notwendig, da Pektinasen bei dieser Temperatur die höchste Aktivität besitzen. Ein speziell bei schwarzen Johannisbeeren angewandter Produktionsschritt war die Nachextraktion des Tresters

mit heißem Wasser, um die Farbausbeute zu erhöhen. Die Herstellung von Brombeersaft ist vergleichbar mit der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft allerdings ohne Nachextraktion, während bei der Herstellung von Sauerkirschsafte die Maische-Erhitzung und -Enzymierung entfällt. (Will *et al.*, 2003-2005) Für den Saft ergaben sich folgende Parameter (Tabelle 16) und Anthocyangehalte (Tabelle 17) (quantifiziert mit HPLC/DAD in der Forschungsanstalt Geisenheim).

Tabelle 16: Ausgewählte Analysedaten des roten Mehrfruchtsaftes

Analyse-ID (GLIMS)	6671	
Datum	12.12.2005	
Parameter	Einheit	Wert
Antioxidative Kapazität (TEAC) ber. Trolox	mmol/L	31,1
zuckerfreier Extrakt	g/L	38,4
Gesamtphenole	mg/L	3478
Ascorbinsäure	mg/L	268

Tabelle 17: Anthocyangehalte des roten Mehrfruchtsaftes

Anthocyan	RT (min)	mg/L
Cyanidin-3-samb-5-glc	14,58	7,5
Delphinidin-3-glc	16,36	15,5
Delphinidin-3-rut	17,05	27,7
Cyanidin-3-(2 ^G -glc-rut)	17,33	21,4
Cyanidin-3-glc	18,14	27,8
Cyanidin-3-samb	18,37	67,1
Cyanidin-3-rut	19,15	24,9
Petunidin-3-glc	19,59	6,1
Peonidin-3-glc	21,62	29,5
Malvidin-3-glc	22,52	48,4
Delphinidin-3-(6 [“] -coumaroyl)-glc ¹	23,57	1,1
Cyanidin-3-(6 [“] -coumaroyl)-glc ¹	24,32	2,7
Peonidin-3-acetyl-glc ¹	28,72	3,8
Malvidin-3-acetyl-glc ¹	28,96	7,7
Malvidin-3-coumaroyl-glc ¹	30,41	9,7
Summe		301

8. Testsysteme

8.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Eine Reihe zellfreier Assays ermöglichen es, Aussagen über die Effektivität antioxidativ wirksamer Substanzen zu machen. Antioxidantien können Radikale durch zwei wichtige Mechanismen deaktivieren, zum einen durch Wasserstoffatom-Transfer (HAT, hydrogen atom transfer), zum anderen durch Ein-Elektronen Übertragung (SET, single electron transfer) (Prior *et al.*, 2005). Der SET-Mechanismus beinhaltet eine Redoxreaktion mit dem Oxidanz, welche gleichzeitig zur Bestimmung des Endpunktes der Reaktion dient. Bei den meisten HAT-Mechanismen erfolgt die Quantifizierung über kinetische Kurven.

Der **TEAC-Assay** (trolox equivalent antioxidative capacity) basiert auf einem SET-Mechanismus (Huang *et al.*, 2005). Hierbei dient die Bildung des chromophoren blau-grünen ABTS-Radikal-Kations aus 2,2'-Azobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) und Kalium-

peroxodisulfat zur spektroskopischen Erfassung der antioxidativen Kapazität von Lösungen, reinen Substanzen oder Getränken. Der TEAC-Wert erfasst die zellfreie antioxidative Kapazität der untersuchten Antioxidanzien, im direkten Vergleich zu Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin E Analogon. Der TEAC-Wert gibt an, welche Konzentration Trolox (mM) nötig ist, um dieselbe antioxidative Wirksamkeit zu erreichen wie eine 1 mM oder 1 mg/ml Lösung der Testsubstanz (Apfel -Extrakt/-Saft) (*Rice-Evans et al. 1994*).

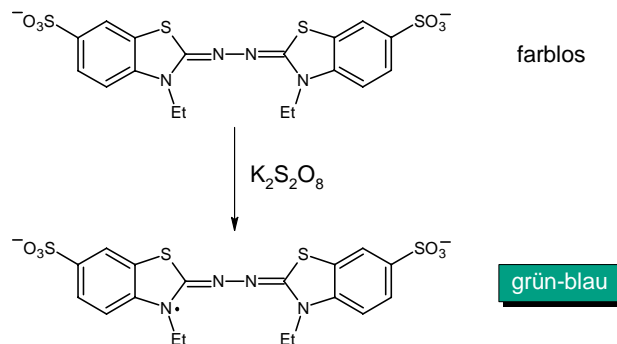


Abbildung 35: Oxidation von ABTS (*Prior et al., 2005*)

Das ABTS-Radikal-Kation besitzt drei Absorptionsmaxima bei 645 nm, 734 nm und 815 nm. Durch Antioxidation wird dieses reduziert und so entfärbt (*Re et al., 1999*) (Abb. 35). Der ORAC-Assay (oxygen radical absorbance capacity) dient ebenfalls zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität (*Re et al., 1999; Huang et al., 2005*). Hierbei wird eine Hemmung der Peroxylradikal-induzierten Oxidation durch Antioxidanzien gemessen, weshalb dieser Assay das Potenzial antioxidativ wirksamer Verbindungen reflektiert, die klassische Radikalkettenreaktion zu unterbrechen (*Prior et al., 2005*). Das Peroxylradikal wird bei 37°C aus 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid (AAPH) gebildet (*Ou et al., 2001*) und reagiert mit einer fluoreszierenden Probe zu einem nicht fluoreszierenden Produkt (Abb. 36). Als fluoreszierende Probe wird Fluorescein (3',6'-Dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanthen]-3-on) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt über Messung der Fluoreszenz (*Prior et al., 2005*). Die Oxidationsprodukte von Fluorescein zeigen, dass es sich bei der Reaktion mit AAPH um einen HAT-Mechanismus handelt (*Ou et al., 2001*). Die antioxidative Kapazität wird hierbei über die sinkende Rate und Menge an Produkten gemessen, die über die Zeit gebildet werden:

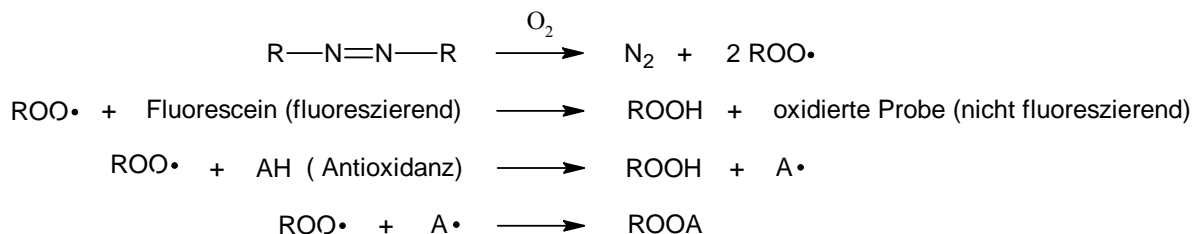


Abbildung 36: Reaktionskette im ORAC-Assay (*Prior et al., 2005*)

Die antioxidative Aktivität der Testverbindung wird durch Berechnung der Fläche unter der Fluoreszenz-Abnahme-Kurve (AUC, area under the curve) einer Probe bestimmt (*Ou et al.,*

2001). Analog zu TEAC-Werten werden ORAC-Werte für gewöhnlich als Trolox-Äquivalente angegeben (*Prior et al., 2005*).

8.2 Dichlorofluorescein-Assay (DCF-Assay)

Der Dichlorofluorescein-Assay, kurz DCF-Assay, ist eine Methode um oxidativen Stress (ROS) in lebenden Zellen zu quantifizieren (*Wang et al. 1999*). Hierbei wird die Verbindung 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) verwendet, die aufgrund ihrer nicht-polaren und nicht-ionischen Struktur gut durch Zellmembranen diffundiert (*LeBel et al., 1992*). Im Cytoplasma wird DCFH-DA durch interzelluläre Esterasen zum nicht-fluoreszierenden DCFH hydrolysiert (Abb. 37). In Gegenwart von ROS oxidiert DCFH zur fluoreszierenden Verbindung Dichlorofluorescein (DCF), welche aufgrund ihrer Polarität in der Zelle verbleibt (*Wang et al. 1999*). Die emittierte Fluoreszenz ist dann direkt proportional zum Redoxstatus der Zellen (*Wang et al. 1999*).

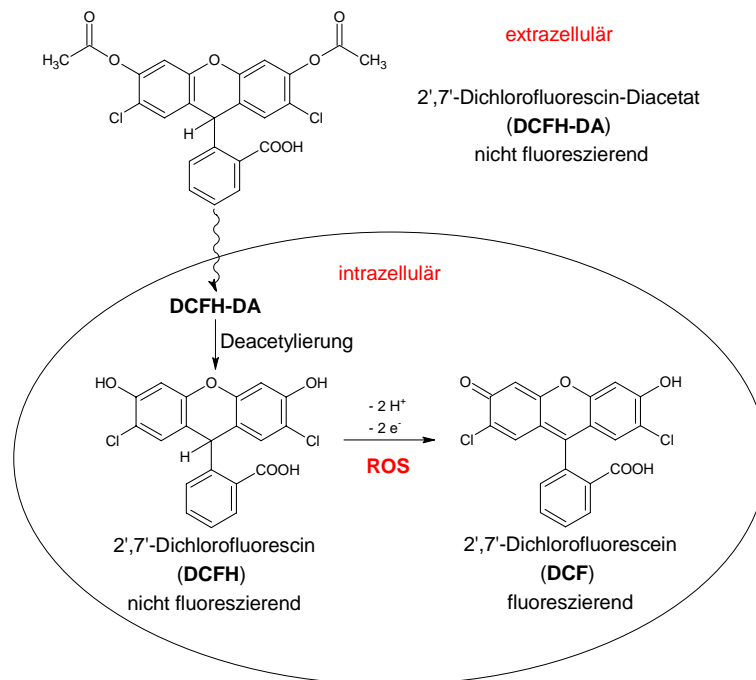


Abbildung 37: Prinzip des DCF-Assay (*LeBel et al. 1992*).

Der prozentuale Anstieg der Fluoreszenz wird wie folgt berechnet:

$$\text{Fluoreszenzanstieg \%} = [(F_{t_{30}} - F_{t_0}) / F_{t_0}] * 100$$

$F_{t_{30}}$: Fluoreszenzintensität nach 30 Minuten

F_{t_0} : Fluoreszenzintensität nach 0 Minuten

Diese Methode hat den Vorteil, dass nur die Netto-Fluoreszenzänderung berücksichtigt wird und die Hintergrundstrahlung eliminiert wird. Eine Kontrolle ohne Zellen wird nicht benötigt (*Wang et al. Joseph, 1999*). Der Fluoreszenzfarbstoff reagiert nicht spezifisch mit bestimmten oxidierenden Spezies in der Zelle wie H_2O_2 , sondern stellt vielmehr einen Detektor für ein

breites Spektrum oxidierender Verbindungen dar die während intrazellulären oxidativem Stress erhöht sind (*Hempel et al., 1999*). Eine Aussage darüber welche spezifischen ROS im Testsystem vorliegen, ist hierbei jedoch nicht möglich (*Schaefer et al., 2006b; Schaefer et al., 2006a*).

8.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) ist eine schnelle und sehr sensitive *in vitro* Methode zur Analyse von Nukleinsäuren. Hierbei wird eine durch spezifische Primer definierte Zielsequenz nach wiederholten Zyklen annähernd exponentiell amplifiziert. Die Kopienzahl nach Abschluss einer PCR-Reaktion lässt sich theoretisch mit Hilfe nachfolgender Gleichung berechnen.

$$(2^n - 2n)x$$

n= Anzahl der Vermehrungszyklen

2n= Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist

x= Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize

Nach 25-30 PCR-Zyklen bei der die DNA millionenfach vermehrt wird, begrenzt bei einem molaren Überschuss der Ziel-DNA meist die Enzymmenge die Reaktion. Auch die Aktivität des Enzyms nimmt ab, da die Hitze das Enzym im Laufe der Reaktion denaturiert. Mit zunehmender Konzentration der gewünschten Amplikons vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effektivität der Vervielfältigung, denn diese Reaktion konkurriert mit der Anlagerung der Primer.

Der Temperaturverlauf der PCR erfolgt in folgenden Zyklen

1. Schritt (Denaturierung):

Die doppelsträngige DNA wird in einer Lösung zusammen mit Primern, den vier dNTP's, Reaktionspuffer und einer hitzestabilen DNA-Polymerase bei 93-100 °C denaturiert.

2. Schritt (Annealing):

Die Oligonukleotidprimer binden an die denaturierte Matrize, in Abhängigkeit von der T_m der Oligonukleotidprimer auf 37-65 °C.

3. Schritt (Amplifikation):

Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die DNA bei 72 °C.

Alle drei Schritte zusammen bilden den PCR-Zyklus, der normalerweise mindestens 20 Mal wiederholt wird. Nach dem letzten Zyklus wird die Zeit für den Polymerisationsschritt um mehrere Minuten verlängert, damit alle Stränge vollständig synthetisiert werden können (Extensionsschritt).

8.3.1 Die Taq DNA-Polymerase

Die Taq DNA-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* und wurde ursprünglich aus den heißen Quellen des Yellowstone Nationalparks isoliert (*Saiki R. K. et al., 1988*). Die optimale Temperatur für die Taq DNA-Polymerase liegt bei 70-80 °C (Tab. 18). Bei dieser Temperatur synthetisiert sie DNA mit einer Geschwindigkeit von 35-100 Nukleotiden pro Sekunde und gehört damit zu den hochprozessiven DNA-Polymerasen. Amplitaq hat dieselben Eigenschaften wie die Taq DNA-Polymerase und lässt sich in reiner Form besser isolieren, aus diesem Grund ist Amplitaq für die PCR das Enzym der Wahl.

Tabelle 18: Eigenschaften häufig verwendeter DNA-Polymerasen

	Taq/ Amplitaq	Stoffel- fragment	Vent	DeepVent	Pfu	Tth	UITma
Halbwertszeit der Aktivität in [min] bei 95 °C	40	80	400	1380	> 120	20	> 50 ^b
5'-3'-Exonukleaseaktivität	ja	nein	nein	nein	nein	ja	Nein
3'-5'-Exonukleaseaktivität	nein	nein	ja	ja	ja	nein	ja
Prozessivität ^c	50-60	05. Okt	7	k.A.	k.A.	30-40	k.A.
Verlängerungs-geschwindigkeit [nt/sek]	75	> 50	> 80	k.A.	60	> 33	k.A.
Reverse-Transkriptase-Aktivität	schwach	schwach	k.A.	k.A.	k.A.	ja	k.A.
Produkt-Enden	3'A	3'A	>95 %	>95 % glatt	k.A.	3'A	glatt
Strang austausch	k.A.	k.A.	ja ^a	ja ^a	k.A.	k.A.	k.A.
Molekulargewicht (kDa)	94	61	k.A.	k.A.	92	94	70

Vent und Pfu existieren auch in einer Exonuklease minus Form (exo⁻)

k.A.; keine Angaben

^a der Strangaustausch ist temperaturabhängig

^b gemessen bei 97,5 °C

^c durchschnittliche Anzahl der Nukleotide, die ein Enzym in die DNA einbaut, bevor es von der Matrize abfällt

8.3.2 Puffer und MgCl

Die MgCl₂ Konzentration kann die Spezifität und die Ausbeute der PCR wesentlich beeinflussen. Normalerweise sind Konzentrationen von 1,0-1,5 mM MgCl₂ optimal, doch in bestimmten Fällen muss man andere Mg²⁺ Konzentrationen wählen. Die Mg²⁺ Ionen bilden zusammen mit den Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTP's) einen löslichen Komplex, der für den dNTP Einbau ausschlaggebend ist. Zusätzlich stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen die T_m sowohl des DNA-Doppelstrangs als auch der Bindung zwischen Primer und Matrize.

8.4 Quantitative Real-Time TaqMan-PCR

Zellen unterschiedlicher Gewebearten und in verschiedenen Wachstumsstadien, oder unter dem Einfluss von bestimmten Substanzen unterscheiden sich vor allem durch ihr Genexpressionsmuster und somit in ihrem mRNA-Pool (*Muller et al., 2002*). Die Real Time PCR ist eine Methode zur exakten Quantifizierung spezifischer mRNA (*Pfaffl, 2004*). Zur Quantifizierung der Startmenge an DNA wird der sogenannte Ct oder Cp (threshold cycle oder crossing point) herangezogen (*Pfaffl, 2004*). Er entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig

sind, damit das Fluoreszenzsignal der Probe signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (*Ginzinger, 2002*). Grundlage hierfür ist das 1991 von Holland et al. entwickelte 5'-Nuklease PCR Assay unter Ausnützung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation. Durch die Entwicklung von neuen fluorogenen Sonden (*Holland, 1991; Lee et al. 1993*), wurde es erstmals möglich den Abbau der Sonde ohne aufwendige Post-PCR Schritte zu detektieren. Während der PCR hybridisiert die intakte Sonde zusammen mit den Primern sequenzspezifisch an den Matrizenstrang. Im Falle einer Fluoreszenzanregung bei einer Wellenlänge von 488 nm, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher-Molekül durch einen so genannten Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt (*Tani et al., 2009*). Erst in der Extinktionsphase der PCR trifft die Taq Polymerase nun auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer Y-förmigen Sekundärstruktur der Sonde, wodurch die 5'-Exonukleaseaktivität der Ampli-Taq DNA-Polymerase aktiviert und die Sonde aus der Matrize hydrolysiert wird. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff unterbrochen, wodurch ein Fluoreszenz-Signal erzeugt wird (Abb. 38). Mit steigender Zahl an Amplifikationsprodukt in jedem PCR-Zyklus, nimmt daher auch die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs zu. Das Fluoreszenz-Signal ist stark sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sonden noch vor der Aktivierung der 5'-Exonuklease, durch die Taq-Polymerase verdrängt werden.

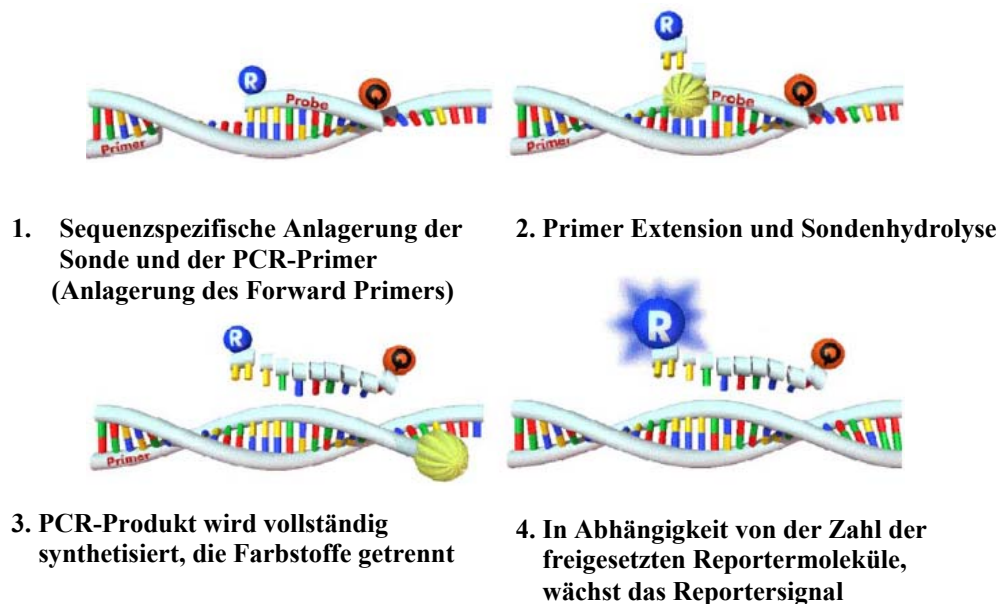


Abbildung 38: Prinzip der TaqMan[®] PCR

8.4.1 TaqMan PCR-MGB-Sonde

Die MGB-TaqMan-Sonde besitzt einen nichtfluoreszierenden Quencher am 3'Ende. Aus diesem Grund kann das Sequence Detection System die Reporterfluoreszenz genauer messen. Ebenfalls befindet sich am 3'Ende ein minor groove binder (MGB), der die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde erhöht und somit das Verwenden von kürzeren Sonden zulässt (Abb. 39). Am 5'Ende trägt diese Sonde den Reporter FAM. Wie auch bei TaqMan-Sonden soll auch bei der Konstruktion von MGB-TaqMan-Sonden darauf geachtet werden, daß sich kein Guaninrest am

5' Ende befindet. Weiterhin soll die Sonde aus Stabilitätsgründen nicht kürzer als 13 Nukleotide sein.

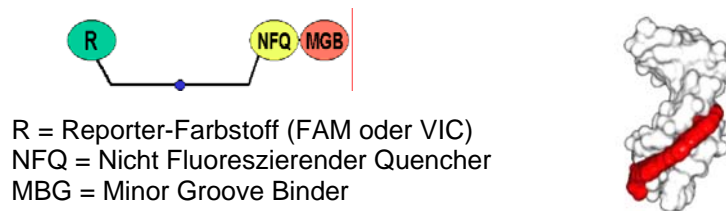


Abbildung 39: Aufbau und Molekularmodell (an DNA gebunden; rot) einer Minor groove binder (MGB) Sonde

Durch Kombination verschiedener Reporter-Farbstoffe findet die TaqMan PCR auch Anwendung als Multiplex-Methode. Standardmäßig wird FAM als Reporter eingesetzt, welches kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft ist. Demgegenüber steht jeweils der Quencher-Farbstoff TAMRA. Dieser wird über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Durch zusätzliche chemische Phosphorylierung des Nukleotids am 3'-Ende wird eine Extension der Sonde während der PCR verhindert. Die TaqMan-Sonde wird üblicherweise in Konzentrationen im Bereich von 50-200 nMol/50 µl Reaktion eingesetzt, wobei die optimale Sondenkonzentration vom Fluoreszenz-Hintergrund sowie der Primer-Konzentration abhängt. Das Reporter-Fluoreszenz-Signal der Ohne-Template-Kontrollen (NTC = No Template Control), sollte mindestens dreimal so hoch sein, wie das Signal einer Puffer-Leerprobe.

8.4.2 Kriterien für die Sondenauswahl

Neben der Sondenflexibilität haben weitere Faktoren bei der Sondenauswahl entscheidenden Einfluss auf das Quenching und sollten daher mitberücksichtigt werden. Im Folgenden werden die wichtigsten Punkte zur Sondenauswahl genannt:

- Die Länge der Sonde sollte zwischen 20 und 30 Basen betragen
- Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer Nähe des 3'-Endes des PCR-Primers befinden (Entfernung: < 50 und max. 60 Basen)
- Die Schmelztemperatur T_m der Primer sollte 5-10°C unter dem der Sonde liegen
- Möglichst keinen 72 °C Extensionsschritt, sondern besser 2-Schritt-PCR mit kombiniertem Annealing/Extensions-Schritt (> 55°C) bei einer Temperatur unter dem T_m der Sonde
- höhere $MgCl_2$ -Konzentrationen (3,5-6 mM), um die Anbindung der Sonde zu stabilisieren und so die Anwendung höherer Temperaturen beim kombinierten Annealing/Extensions-Schritt (höhere Extensionsrate der AmpliTaq DNA Polymerase) zu ermöglichen
- Die Sonde sollte einen GC-Gehalt von 40-60% aufweisen
- Position des Quenchers: generell am 3'-Ende, bei Allel-spezifischer TaqMan PCR gegebenenfalls auch innerhalb der Sonde.
- Das LAN-TAMRA entweder anstelle eines 3'-terminalen Thymins oder als Sequenzzusatz anfügen.
- Am 5'-Ende der Sonde kein Guanin
- Nie mehr als 3x dieselbe Base hintereinander (insbesondere keine Poly G-Sequenz)
- Keine Selbstkomplementarität und Komplementarität zwischen Sonde und PCR-Primern

- Möglichst keine auffälligen Sekundärstrukturen wie Hairpins in der Zielsequenz, sowie bei Primern und der Sonde
- Falls bei einer gegebenen Sondensequenz auch der komplementäre Strang verwendet werden kann, sollte der Cytosin-haltigere Strang ausgewählt werden.

8.4.3 Spezifität des TaqMan PCR Assay

Durch die sequenzspezifische Hybridisierung der Sonde an das Template, wird ein Fluoreszenz-Signal nur dann generiert, wenn die Sonde auch tatsächlich durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq Polymerase hydrolysiert wird und es zur Amplifikation der Zielsequenz kommt.

8.4.4 Auswahl der PCR-Primer

Für die Amplifikation der Zielsequenz ist die Auswahl geeigneter und spezifischer Primer entscheidend. Primer, die nicht optimal an das Template binden, können im Extensionsschritt zu fehlerhaften Amplikons führen. Für die Auswahl geeigneter Primer sollte man daher folgende Punkte berücksichtigen:

- Länge der Primer: 18-20 Basen
- T_m nach Primer-Express: 58-60 °C
- Übliche Primer-Konzentration: 0,2-0,5 µM in der TaqMan PCR
- Länge des Amplikons: optimal: 75-150 Basenpaare, jedoch sind auch längere Amplifikate möglich
- Guanin + Cytosin-Gehalt: ca. 20-80%
- möglichst keine Poly-Thymin-Bereiche (unspezifische Bindungen)
- möglichst keine palindromischen Sequenzabschnitte
- keine 3'-Komplementarität (Primer-Dimer Gefährdung)

Die Detektion eines Fluoreszenz-Signals ist abhängig von der Menge der zu Beginn der PCR eingesetzten Matrizen-Moleküle. Die Startkopienzahl beeinflusst daher die Zahl der PCR Zyklen die benötigt werden, um ein positives Signal zu erhalten. Für eine effektive Detektion sind etwa 10.000 Startkopien und 25-30 PCR-Zyklen ausreichend (Tab. 19).

Tabelle 19: PCR-Zyklenzahl in Abhängigkeit der Startkopienzahl

Kopienzahl	PCR-Zyklen
10 ⁵	20-25
10 ⁴	25-30
10 ³	30-35
1-100	40

1 µg humane DNA

10 ng Hefe DNA

1 ng E. Coli DNA

entspricht einer Startkopienzahl

von 3 x 10⁵ Kopien.

8.4.5 Optimierung der TaqMan PCR

Denaturierung

Die Halbwertszeit der Taq DNA Polymerase beträgt bei 95 °C etwa 40 min und bei 97,5 °C sogar nur noch 10 min. Eine zu hohe Denaturierungstemperatur über die ganze PCR würde also die Effizienz der Reaktion und damit auch die Signalintensität negativ beeinflussen.

8.4.6 Quantifizierungsstrategie

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100 %igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Die Effizienz der PCR liegt umso höher, je kürzer das zu bildende Amplifikat ist. Nach Ferre et al. liegt die Effizienz der Reaktion vom 15. bis zum 30. Zyklus und unabhängig von der Startkopienzahl bei 70-80% (*Ferre, 1992, 1994*).

8.4.7 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Housekeeping Gens (HKG) normalisiert. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen, sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. GAPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon Untereinheiten und β -Aktin sind die geläufigsten HKG die zur Normalisierung herangezogen werden. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sog. $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Abb 40.) oder über genauere Effizienz korrigierte Modelle erfolgen. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*Livak K. J., 2001*).

$$\begin{aligned}\Delta C_t &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t \text{ Behandlung} - \Delta C_t \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

Abbildung 40: $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Die „wahre real-time PCR Effizienz“ dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 bewegen und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf. Geringste Schwankungen in der Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen führen zu enormen Unterschieden in den Expressionsunterschieden.

8.5 Zelllinien

8.5.1 HT-29 Zellen

Bei der Zelllinie HT-29 handelt es sich um eine humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie, die 1964 aus dem Kolonkarzinom (Primärtumor) einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau etabliert wurde (*Fogh J. et al., 1964; Rousset et al., 1986*). Der Karyotyp dieser Zelllinie ist hypertriploid mit 17,5 % Polyploidie. Die Zelllinie wächst als polarisierter Monolayer und zeigt nach Modifikationen des Kulturmediums Differenzierungs-Charakteristiken, die denen normaler Kolonzellen ähneln (*Lecoeur et al., 2002*). Sie eignen sich somit sehr gut für Experimente, die sich mit der Differenzierung und den Funktionen des Kolonepithels sowie den involvierten molekularen Mechanismen beschäftigen. HT-29 Zellen wachsen adhärent mit einer Verdopplungszeit von etwa 40 - 60 h (*Schaefer et al., 2006b; Schaefer et al., 2006a*). Werden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert, formen sie einen Multilayer des undifferenzierten Phenotyps (*Cohen et al., 1999*). In der Abwesenheit von Glukose können die Zellen differenzieren und einen Bürstensaum bilden (*Huet et al., 1987*). Mit zunehmendem Proliferationsgrad nimmt auch die Aktivität antioxidativer Enzyme wie z.B. der SOD1/2, KAT, GPX, GSR und Glutathion S-Transferasen (GST) in den undifferenzierten HT-29 Zellen zu. Bei Erreichen der Postkonfluenz wird eine stabile Aktivität der überwiegenden Enzyme beobachtet, jedoch nimmt die GPX Aktivität zu und die KAT Aktivität dagegen ab (*Bravard et al. 2006*).

8.5.2 CaCo-2 Zellen

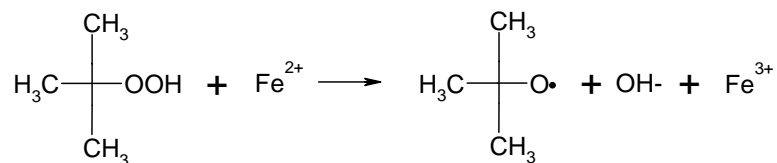
Bei der Caco-2-Zelllinie handelt es sich um humane Adenokarzinom-Zellen, die ursprünglich aus einem Kolontumor eines 72-jährigen kaukasischen Mannes isoliert wurden und durch fortlaufendes Passagieren für *in-vitro-Versuche* zur Verfügung stehen. Diese Zellen sind relativ einfach zu kultivieren, haften sehr gut an Oberflächen und bilden nach einigen Tagen eine konfluente Einzelschicht aus. Nach längerer Kultivierungszeit tritt die Polarisierung der Zellen ein, bei der die Zellen eine für Epithelzellen charakteristische Bürstensaummembran ausbilden, sowie mikrovillii Hydrolasen und Transportproteine exprimieren. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Caco-2-Zellen als charakteristisches Darmresorptionsmodell für *in-vitro*-Versuchsmethoden. Die adherenten, epitheloiden Zellen besitzen einen geringen Glukoseumsatz und daher auch relativ geringe Transportraten. Im Vergleich zu den HT-29 Zellen, zeigen die Caco-2 Zellen deutliche Unterschiede in der Expression detoxifizierender Enzyme, bzw. in der Aktivität membranständiger Peptidasen. So sind die Caco-2 Zellen z.B. NQO1 defizient und zeigen diesbezüglich auf Proteinebene keine Basalaktivität. Differenzierte Caco-2 Zellen exprimieren eine Vielzahl von Cytochrom P450 Isoformen, sowie UDP-Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen und Glutathion S-Transferasen (GST) (*Meunier et al. 2007*). Je nach Grad der wachstumsabhängigen Differenzierung zeigen Caco-2 Zellen Unterschiede in der Aktivität und Genexpression antioxidativer Enzyme, wie z.B. der SOD, GPX, GSR und KAT (*Baker et al. 1992*).

8.6 Inkubation mit Testsubstanzen

8.6.1 Tert.-Butylhydroperoxid

Für die Untersuchungen des zellulären ROS-Levels wurde tert.-Butylhydroperoxid (TBH) als Oxidans eingesetzt, da es relativ schnell in die Zellen aufgenommen wird und mit steigender Konzentration einen linearen Anstieg der Fluoreszenz im DCF-Assay zeigt. Ein weiterer Grund für dessen Verwendung ist, dass TBH zwar in Zellen zu tert.-Butylperoxy-Radikalen und Alkoxy-Radikalen aktiviert wird, in zellfreien Systemen aber nicht in der Lage ist, DCFH zu oxidieren (*Musonda et al., 1997*).

Das synthetisch hergestellte organische Hydroperoxid tert.-Butylhydroperoxid (TBH) löst *in vitro* oxidativen Stress aus. Der Zerfall von TBH in Alkoxy- (RO \cdot) oder Peroxylradikale (ROO \cdot) kann z.B. die Kettenreaktion der Lipidperoxidation beschleunigen (*Masaki et al., 1989*) und hierdurch die Depletion von GSH induzieren (*Esworthy et al., 1993; Geiger et al., 1993*). Ein Zerfall in Radikale wird durch Metall-Ionen (z.B. Methämoglobin, Cytochrom P450-Enzyme) beschleunigt:



Aherne et al. induzierten mit TBH konzentrationsabhängig DNA-Einzelstrangbrüche in Caco-2-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Flavonoide Quercetin und Rutin als Metallchelator protektiv gegen TBH-induzierte Strangbrüche wirken (*Aherne et al. 2000*).

8.6.2 Menadion

Menadion wurde vergleichend zu den Apfelsaftextrakten getestet, da es bekanntermaßen in den Zellen oxidativen Stress auslöst und möglicherweise nachgeschaltete zelluläre Kaskaden zur antioxidativen Abwehr beeinflusst. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Modulation der redoxsensitiven Genexpression von Bedeutung, da eine Antwort der Zelle nach Induktion von oxidativem Stress möglicherweise bereits auf Genexpressionsebene erfolgt. Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon; Vitamin K₃) zählt zur Gruppe der Chinone. Einige Chinone sind potente redoxaktive Substanzen, die an zahlreichen biochemischen Reaktionen involviert sind. Dazu zählen Redox-Reaktionen, wie z.B. der Elektronentransport durch Ubichinon in der Atmungskette und Redoxcycling (Abb. 41) (*Bolton et al., 2000*). Beim Redoxcycling von Menadion unterscheidet man zwischen der Ein-Elektronen- und der Zwei-Elektronen-Reduktion (Abb. 42). Bei der Ein-Elektronen-Reduktion, die im lebenden System durch die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase katalysiert werden kann, entstehen Semichinone, die ein Elektron auf Sauerstoffmoleküle übertragen, wodurch das Superoxid-Anion gebildet wird. Die Zwei-Elektronen-Reduktion wird durch die sogenannte Chinon-Reduktase katalysiert. Sie führt zur Bildung von Hydrochinonen, die wiederum Elektronen auf Sauerstoffmoleküle übertragen können und ebenfalls Superoxid-Anionen generieren. Menadion dient in der Zellkultur zur artifiziellen Erzeugung von oxidativem Stress, denn es kann als Redox-Cycler *in situ* kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies erzeugen (*Chiou et al. 1999, 2000*). Menadion kann

darüber hinaus als Michael-Akzeptor bei der Reaktion mit zellulären Nucleophilen fungieren. Solche Nucleophile sind z.B. reduziertes Glutathion (GSH), DNA-Basen oder Cystein-Reste von Proteine. Die Reaktion resultiert in einer GSH-Depletion oder Protein-Arylierung (*Hargreaves et al., 2000*). Eine GSH-Depletion vermindert die antioxidative Kapazität der Zelle und führt zu oxidativem Stress. In diesem Zusammenhang konnten Aherne et al. zeigen, dass Menadion konzentrationsabhängig DNA-Einzelstrangbrüche Caco-2-Zellen induziert (*Aherne et al. 2000*).

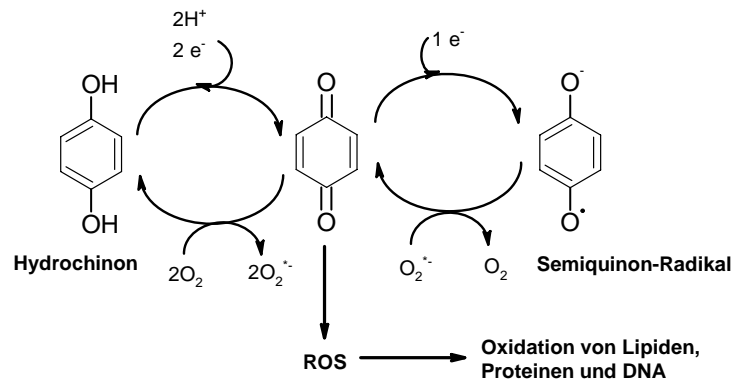


Abbildung 41: Prinzip des Redoxcyclings am Beispiel des Benzo-1,4-Chinons

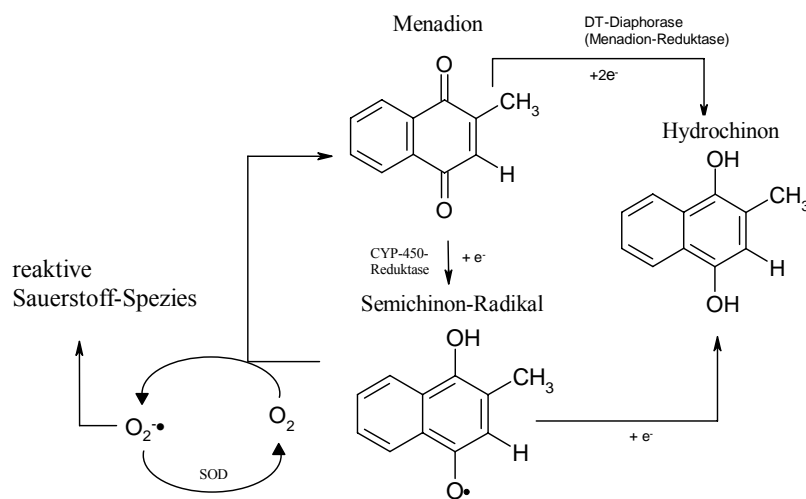


Abbildung 42: Redoxcyclings von Menadion

8.6.3 Sulforaphan

Sulforaphan [1-Isothiocyano-(4R,S)-(methylsulfinyl)butan] kommt in natürlicher Form im Brokkoli-Gemüse vor und ist als potentieller Induktor von Phase II Enzymen bekannt. Sowohl Sulforaphan und verwandte Phenylethyl-Isothiocyane können auf unterschiedliche Art und Weise die MAP-Kinase, Nrf2, eine ARE vermittelte Luciferase Reporter-Gen-Aktivität und die Induktion von Phase II Genen auslösen. Sulforaphan kann ebenfalls mit den freien Thiol-Gruppen in Keap1 wechselwirken und führt nach Aufnahme zu einer weitaus höheren Expression von NQO1, GST und GCL-Genen im Dickdarm von wild-Typ Mäusen, als bei Nrf2 defizienten Mäusen (*Brigelius-Flohe et al. 2006*).

9. Ergebnisse und erste Diskussion

9.1 Modulation der Transkription antioxidativer Gene durch Apfelsaftinhaltsstoffe/ Extrakte in HT-29 und Caco-2 Zellen

Die in vitro-Arbeiten haben das Ziel, die antioxidative Wirksamkeit verschiedener Apfelsaftextrakte im Hinblick auf die Modulation der ARE-abhängigen Genexpression zu charakterisieren. Die mit unterschiedlich zusammengesetzten polyphenolischen Apfelsaftextrakten an humanen Darmzellen gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Entwicklung von Apfelsäften mit besonders hoher präventiver Kapazität im Darm beitragen.

9.1.1 γ -GCL Transkription

Die Modulation der γ -GCL Untereinheiten durch Aglyca und phenolische Saftinhaltsstoffe in HT-29 Zellen ist Abb.43 a und b dargestellt.

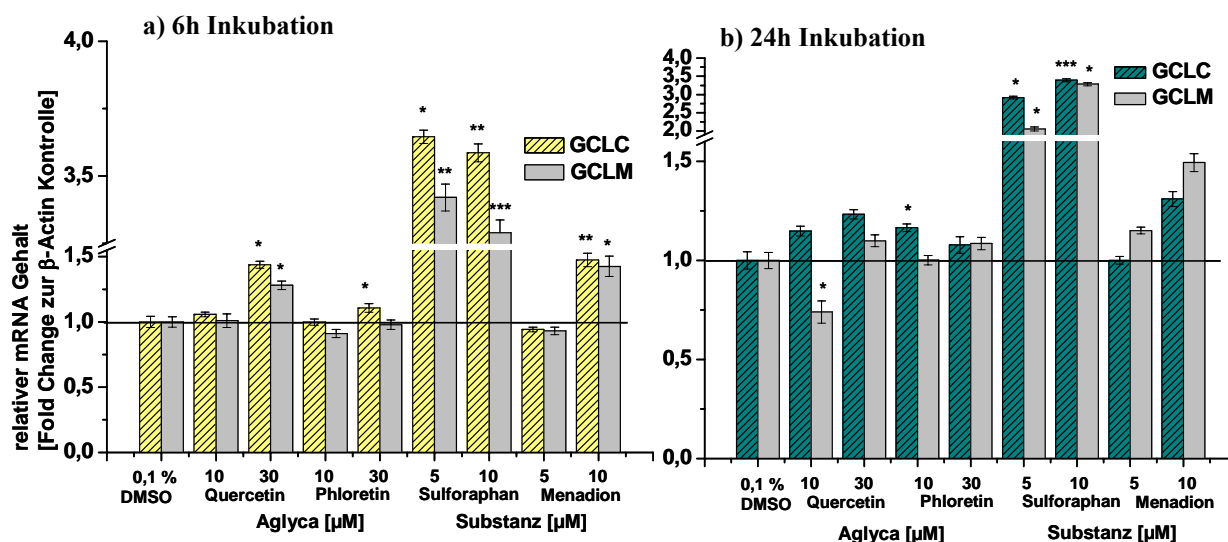


Abbildung 43 a und b: GCLC (katalytische Untereinheit) und GCLM (modulatorische Untereinheit) Transkription in HT-29 Zellen nach 6 und 24h Inkubation mit Aglyca und Referenzsubstanzen (n=3), (mean \pm SD), Signifikanzen bezogen auf Kontrolle (0,1% DMSO), * p<0,05, **p<0,01 *** p<0,001

Die Referenzverbindung Sulforaphan (5 und 10 μ M) steigerte die Transkription beider γ -GCL-Untereinheiten sowohl nach 6 als auch nach 24h Inkubation bis über das 3,5fache des Kontrollwertes (Abb.43 a und b). Dieser erhebliche Anstieg stimmt überein mit bereits beschriebenen Untersuchungen zur GCL Induktion in HT-29 Zellen auf der Ebene der Proteinexpression. Der bekannte Redoxcyclus Menadion (10 μ M) führte ebenfalls zu einer gesteigerten Transkription der GCLC und GCLM, vor allem nach 6h Inkubation (Faktor: 1,5). Die Aglyca Quercetin (30 μ M) und Phloretin (10 μ M) steigerten ebenfalls die γ -GCL Transkripte (GCLC > GCLM). Dies stimmt mit der von uns bereits gezeigten Induktion des tGSH-Spiegels durch die Aglyca (nach 24h Inkubation) überein und unterstreicht die Bedeutung der katalytischen Untereinheit der GCL für die Glutathion-Synthese.

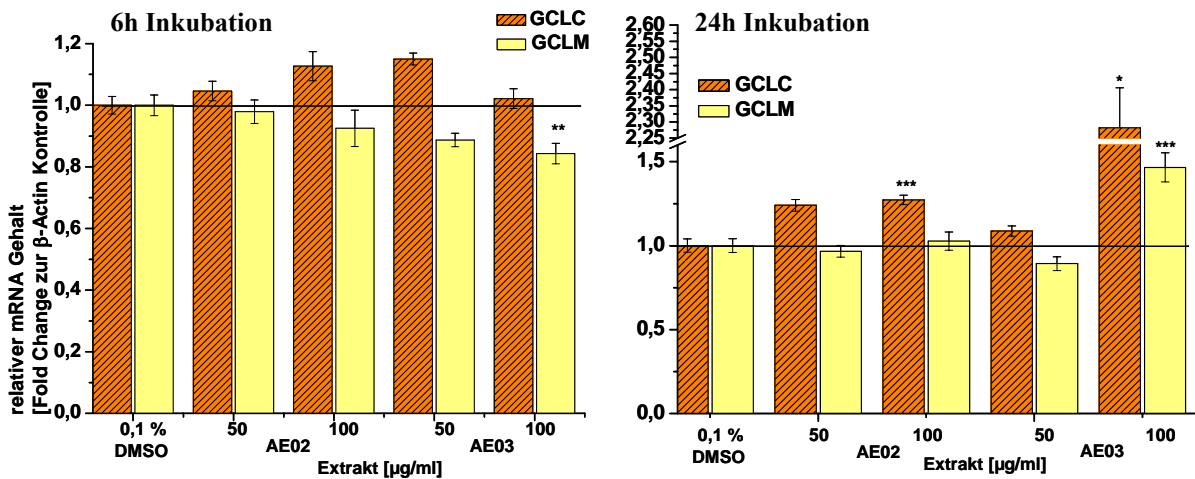


Abbildung 44 a und b: GCLC (katalytische Untereinheit) und GCLM (modulatorische Untereinheit) Transkription in HT-29 Zellen nach 6 und 24h Inkubation mit Extrakten (n=3), (mean±SD), Signifikanzen bezogen auf Kontrolle (0,1% DMSO), * p<0,05, **p<0,01 *** p<0,001

Die Prüfung der Apfelsaftextrakte (Abb. 44 a und b) zeigte für AE02 (100 µg/ml) nach 24h einen leichten Anstieg der GCLC-Untereinheit, AE03 (100 µg/ml) induzierte nach 24h Inkubation einen ausgeprägten Anstieg beider GCL-Untereinheiten. Bei der 6-stündigen Inkubationszeit wurde ebenfalls eine Tendenz zur Erhöhung der GCLC erkennbar.

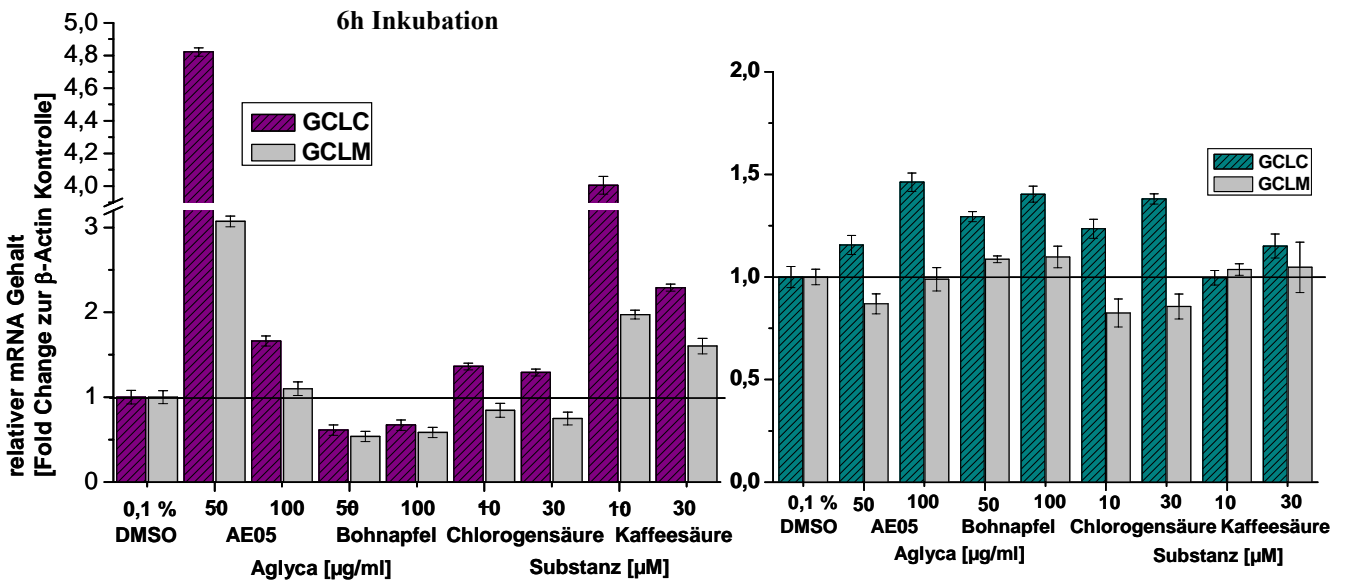


Abbildung 45: GCLC (katalytische Untereinheit) und GCLM (modulatorische Untereinheit) Transkription in HT-29 Zellen nach 6h Inkubation und Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit AE05 und Aglyca (n=1), (mean±SD), Messung in Triplikaten

AE05 wurde vergleichend zu den sortenreinen Bohnapfel Extrakt auf die γ -GCL Genexpression untersucht, da dieser bereits eine hohe zellfreie antioxidative Kapazität gezeigt hatte. Ebenfalls wurde die Chlorogensäure untersucht, die als mengenmäßiger Hauptbestandteil 50% der

bekannten polyphenolischen Extraktinhaltsstoffe in AE05 ausmacht, sowie die Minorkomponente Kaffeesäure. Beide Phenolsäuren hatten in vorausgehenden Untersuchungen eine Glutathiondepletion in HT-29 Zellen bewirkt; geprüft wurde, ob dieser Effekt auch auf der Genexpressionsebene nachweisbar ist. Erste Ergebnisse der 6h Inkubation mit AE05 (50µg/ml) (Abb. 45) zeigten einen starken Anstieg der GCLC-Untereinheit (um den Faktor 5 der Kontrolle) und der GCLM (Faktor 3 der Kontrolle). Auffällig war weiterhin, dass bei einer Konzentration von 100 µg/ml nur ein moderater Anstieg der GCLC und keine Induktion der GCLM nachweisbar war. Mit Bohnapfelextrakt (50 und 100 mg/ml) dagegen wurde eine Abnahme beider Transkripte erhalten. Chlorogensäure (10 und 30 µM) zeigte bestenfalls eine Tendenz zur Erhöhung der GCLC (Faktor: < 1,5) und zu einer Abnahme der GCLM. Kaffeesäure dagegen induzierte einen starken Anstieg der GCLC (10 µM > 30µM).

Entsprechende Untersuchungen zur Modulation der γ -GCL Transkription in Caco-2 Zellen durch die Aglyca und Referenzverbindungen zeigten eine charakteristische Expression der modulatorischen Untereinheit (GCLM) (Abb. 46 a und b). Die Untersuchung der Extrakte AE02 und AE03 zeigte bei 6 und 24h Inkubation nur bei AE03 eine Induktion der γ -GCL Transkription (GCLM > GCLC).

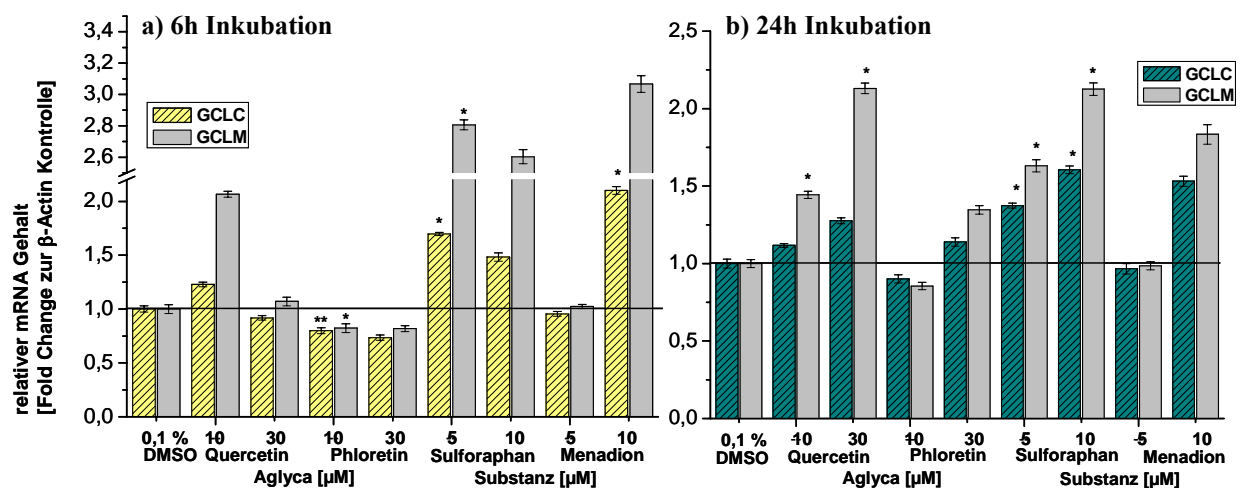


Abbildung 46 a und b): GCLC (katalytische Untereinheit) und GCLM (modulatorische Untereinheit) Transkription in Caco-2 Zellen nach 6 und 24h Inkubation mit Aglyca und Referenzsubstanzen (n=3), (mean ± SD), Signifikanzen bezogen auf Kontrolle (0,1% DMSO), * p<0,05, **p<0,01

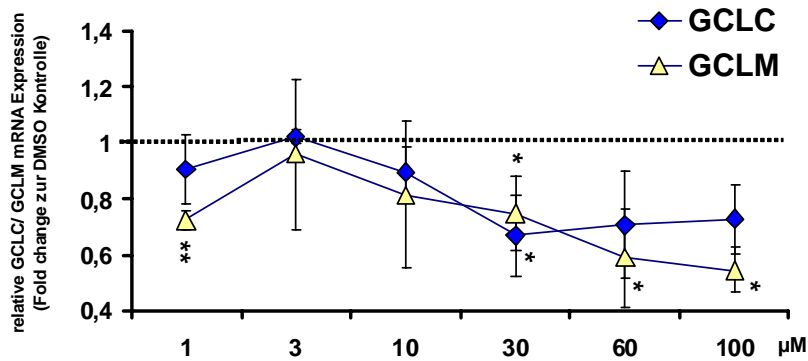


Abbildung 47: GCLC und GCLM Transkription in Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Rutin. (n=3), (mean ± SD, Messung in Triplikaten)

Die Transkription beider γ -GCL Untereinheiten verläuft nach 24h Inkubation mit Rutin bis 30 μM in einer gleichsinnig konzentrationsabhängigen Form (Abb. 47). Ab 60 μM kann ein Anstieg der GCLC Transkription beobachtet werden, wohingegen die GCLM Transkription signifikant erniedrigt bleibt. Im Gegensatz zu Quercetin zeigt das entsprechende Glycosid Rutin ab 3 μM eine deutliche Hemmung der Expression der γ -GCL Untereinheiten. Es ist durchaus anzunehmen, dass die Unterschiede in der Expression auf strukturelle Unterschiede zurückgeführt werden können, da z.B. die Aufnahme von Rutin in die Zellen weitaus geringer ist, als das entsprechende Aglykon Quercetin.

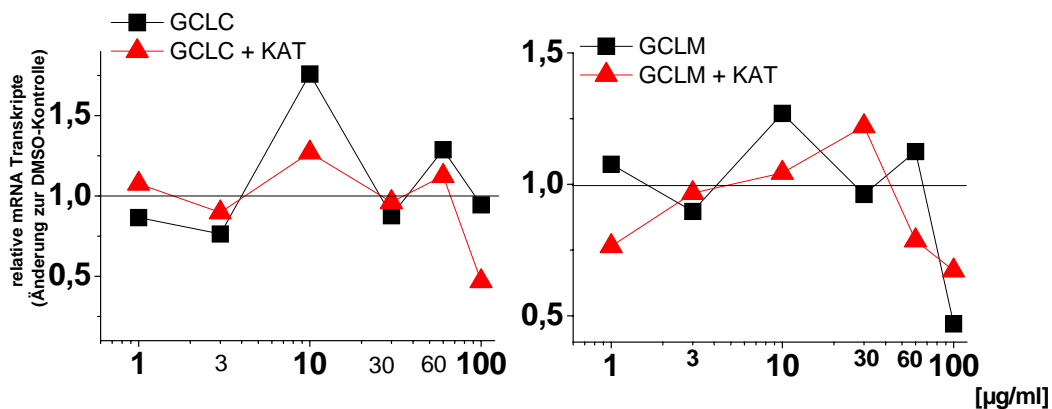


Abbildung 48: γ -GCL Transkription (Untereinheiten GCLC und GCLM) in HT-29 Zellen nach 3h Inkubation (serumfrei) mit AE05 +/- Katalase, n=1-2

In Abb. 48 ist die Modulation der γ -GCL Untereinheiten (GCLC und GCLM) in HT29 Zellen nach 3h Inkubation mit AE05 (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der γ -GCL Transkription bei 10 und 60 $\mu\text{g/mL}$ AE05. In Gegenwart von Katalase wurde dieser Anstieg erst bei höherer Extraktkonzentration beobachtet. Dies spricht für einen Einfluss von im Inkubationsmedium generierten Peroxiden, analog zu den von Bellion et al. beschriebenen Ergebnissen (Bellion et al., 2009). Erste Daten mit AE06 (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$; n=1) zeigten in HT-29 und Caco-2 Zellen eine deutliche Depletion beider γ -GCL Untereinheiten nach 3h Inkubation (Daten nicht abgebildet). In beiden Zelllinien deutet sich übereinstimmend ein Minimum bei 1-3 $\mu\text{g/mL}$ an.

9.1.2 GPX2 und GSR Transkription

Die für den Redoxstatus des Glutathions relevanten Gene GPX2 und GSR wurden nach 6 und 24h Inkubation der Zellen mit Aglyka, Referenzverbindungen und AEs auf Veränderungen in der Transkription geprüft.

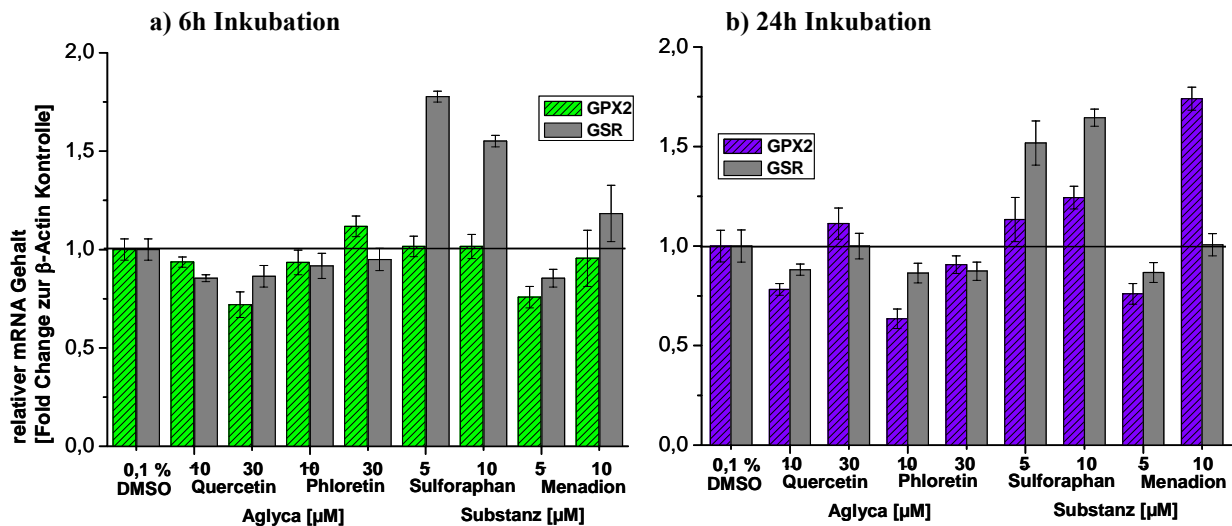


Abbildung 49 a und b): GPX2 und GSR Transkription in HT-29 Zellen nach 6 und 24h Inkubation mit Aglyka und Referenzsubstanzen (n=1), (mean ± SD), Messung in Triplikaten

Erste Ergebnisse (Abb. 49 a und b) zeigten eine Abnahme der beiden Transkripte nach 6 und 24h Inkubation mit Quercetin und Phloretin, während durch Sulforaphan die GSR Transkription deutlich induziert wurde. Die GPX2 Transkripte wurden nur durch Menadion (10 μM, 24h) erhöht (Faktor: >1,5). Ergebnisse mit den Apfelsaftextrakten zeigen eine teilweise hochsignifikante Abnahme der GPX2 und GSR Transkription in beiden Zelllinien. Als Beispiel sind in Abb. 50 die Ergebnisse mit AE05, Bohnapfel und den Phenolsäuren Chlorogen- und Kaffeesäure in Caco-2 Zellen dargestellt.

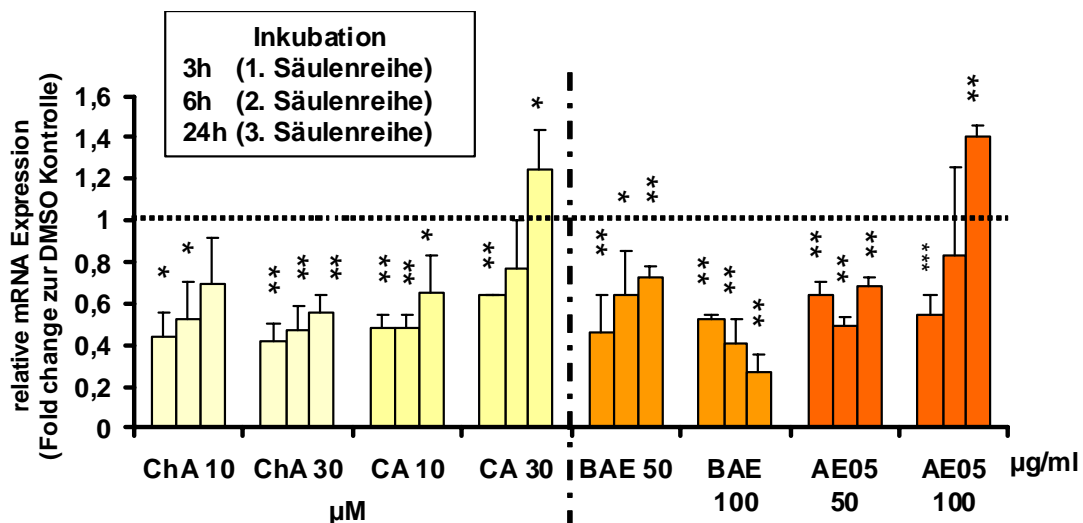


Abbildung 50: GPX2 Transkription in Caco-2 Zellen nach 3h, 6h und 24h Inkubation mit phenolischen Inhaltsstoffen und AE's. (n=3), (mean ± SD, Messung in Triplikaten)

In Caco-2 Zellen bestätigte sich eine deutliche Abnahme der Expression beider Gene (auf ca. 50% der Lösungsmittelkontrolle) nach 3h, 6h und auch vereinzelt nach 24h Inkubation mit AE05, BAE, Chlorogensäure (ChA) und Kaffeesäure (CA) (Abbildung 50). Auch in HT-29 Zellen wurden mit Bohnapfelextrakt eine starke Depletion der GPX2- und GSR-Transkription festgestellt. Die Ergebnisse zur GPx-Aktivität und -Genexpression weisen darauf hin, dass die untersuchten AEs/ Einzelstoffe keine Induktion sondern eher eine Depletion der GPx bewirken (*Bellion, 2009*).

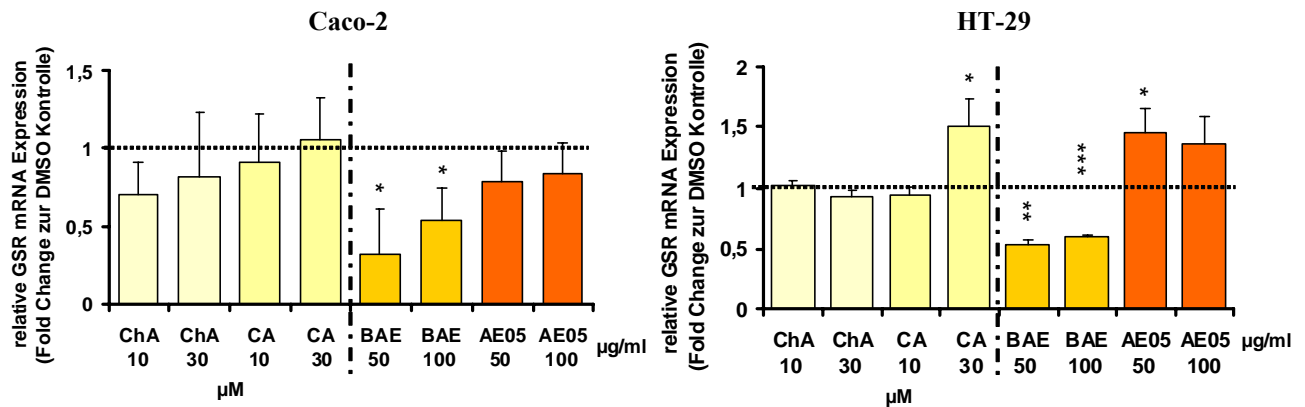


Abbildung 51: GSR Transkription in Caco-2 und HT-29 Zellen nach 6h Inkubation mit phenolischen Inhaltsstoffen und AE's. (n=3), (mean ± SD, Messung in Triplikaten)

9.1.3 Nrf2-Transkription

Die Modulation der Transkription des Nrf2 durch Aglyka und Referenzsubstanzen, wurden in beiden Zelllinien im Vergleich zu Sulforaphan und Menadion untersucht (Abb. 52 a und b).

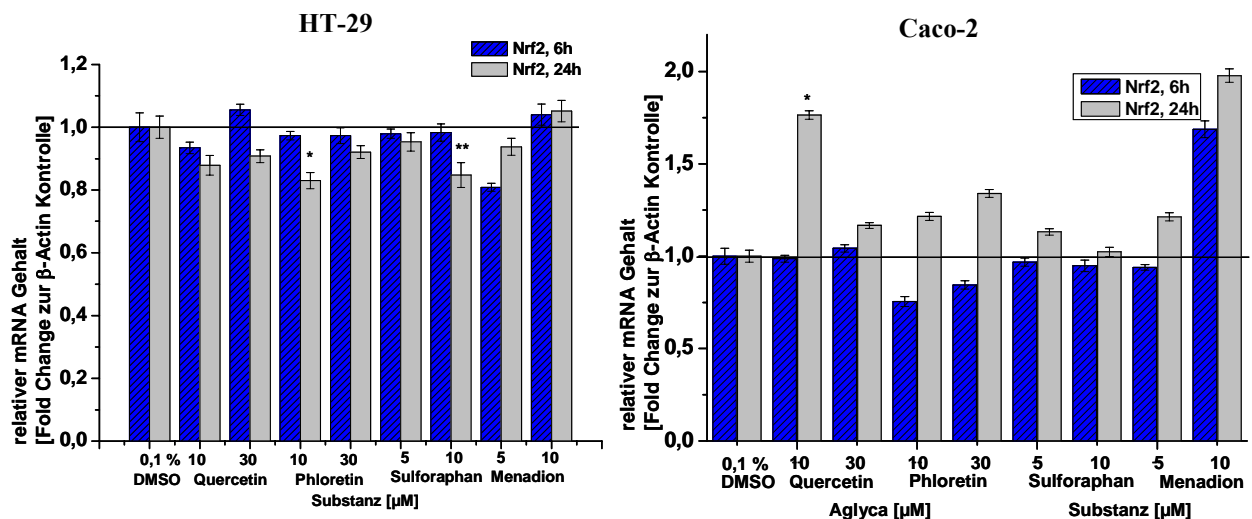


Abbildung 52 a und b): Effekte der Aglyca und Substanzen auf die Transkription von Nrf2 in HT-29 und Caco-2 Zellen (6h und 24h Inkubation), n=2-3, MW aus Dreifachbestimmung.

In Caco-2 Zellen bewirkte nur Quercetin (10 µM) nach 24h Inkubation und Menadion (10 µM) nach 6 und 24h Inkubation eine ausgeprägte Induktion der Nrf2 Transkription. Die übrigen

Substanzen und die Apfelsaftextrakte (AE02 und AE03) ließen die Nrf2 Transkription unverändert bzw. mit Tendenz zur Abnahme. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die ARE abhängige GCL Transkription durch AEs und Einzelstoffe in den gewählten Zelllinien nur bedingt über die Transkription des Nrf2 Gens moduliert wird. Es ist durchaus naheliegend, dass andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 an der Regulierung beteiligt sind, da letzteres ebenfalls an repetitive ARE-Sequenzen binden kann (*Favreau et al. 1995*).

9.1.2 NQO1 Transkription

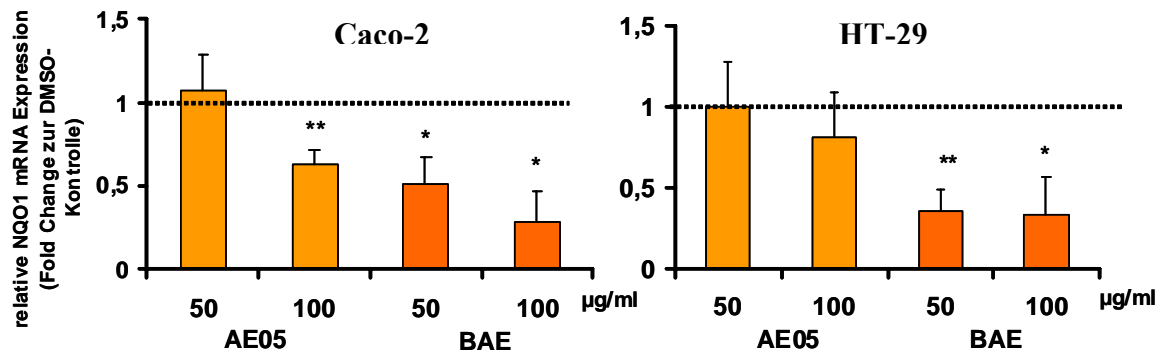


Abbildung 53 : NQO1 Transkription in Caco-2 und HT-29 Zellen nach 6h Inkubation mit AEs; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ (signifikant zur DMSO-Kontrolle), Mittelwert + SD aus $n = 2-3$ (Dreifachbestimmung)

In beiden Zelllinien konnte eine signifikante Hemmung der NQO1 Genexpression nach 6h Inkubation mit Bohnapfelsaftextrakt, sowie in Caco-2 Zellen durch 100 µg/ml AE05 beobachtet werden (Abb. 53). Das NQO1 Enzym hat die primäre Funktion endogene radikalische Chinonverbindungen zu reduzieren

9.1.2 PARP1 Transkription

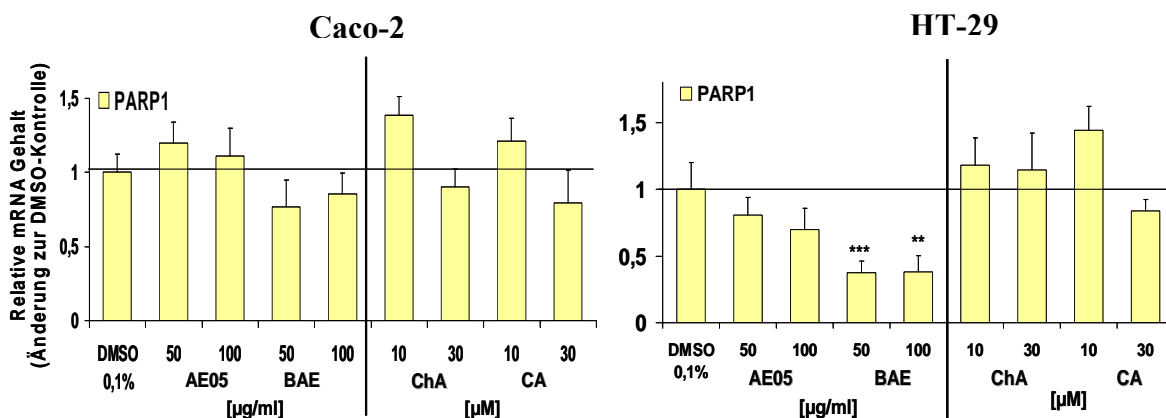


Abbildung 54: PARP1 Transkription in Caco-2 und HT-29 Zellen nach 6h Inkubation mit AEs und phenolischen Inhaltsstoffen; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ (signifikant zur DMSO-Kontrolle), Mittelwert + SD aus $n = 2-3$ (Dreifachbestimmung)

Die Untersuchungen zur Modulation der Genexpression in HT-29 und Caco-2 Zellen durch AEs/ Inhaltsstoffe wurden auf die Poly-ADP-Ribosylpolymerase1 (PARP1) erweitert (Abb. 54), um mögliche Einflüsse der AEs auf die zelluläre Reparatur oxidativer Schäden zu erfassen. In Caco-2 Zellen deutet sich nach 6h Inkubation eine Erniedrigung der PARP1 Transkription durch BAE (50 und 100 µg/ml), ChA und CA (30µM) an, die Phenolsäuren führten bei 10 µM zu einem leichten Anstieg. In HT-29 Zellen zeigte sich eine starke signifikante Depletion der PARP1 Transkription nach 6h Inkubation mit BAE, analog zur oben gezeigten Erniedrigung der Glutathion bezogenen Genexpression. In der Caco-2 Zelllinie konnte in den untersuchten Konzentrationen weder durch die AEs noch durch die phenolischen Inhaltsstoffe eine Modulation der PARP1 mRNA Expression beobachtet werden. Dagegen wurde in den HT-29 Zellen die Expression des PARP1 Gens signifikant erniedrigt. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ermöglicht das Überleben von proliferierenden Zellen, die auf einem moderaten Niveau mit DNA-schädigenden Substanzen wie Alkylantien, Oxidantien und ionisierender Strahlung ausgesetzt worden sind (*de Murcia et al. 1997*). Die PARP1 Genexpression repräsentiert hierbei eine sofortige zelluläre Antwort auf induzierte DNA-Schäden; eine hieraus resultierende Überaktivierung des PARP1 Enzyms kann zum schnellen und drastischen Verlust an NAD⁺ bzw. ATP und somit zum Zelltod führen (*Berger et al. 1985*). Es zeigt sich dass die untersuchten AEs und phenolischen Inhaltsstoffe keinen Hinweis auf eine PARP1 Induktion geben.

9.2. Humane Interventionsstudie mit Apfelmarsaft

Die humane Interventionsstudie (Abb. 55) wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und in einer zeitlich parallel laufenden Diplomarbeit (*Pickard, 2009*) Proben von sechs Patienten (Patient A bis F) untersucht, so dass im Folgenden die gemeinsamen Resultate aus den beiden Arbeiten dargestellt sind.

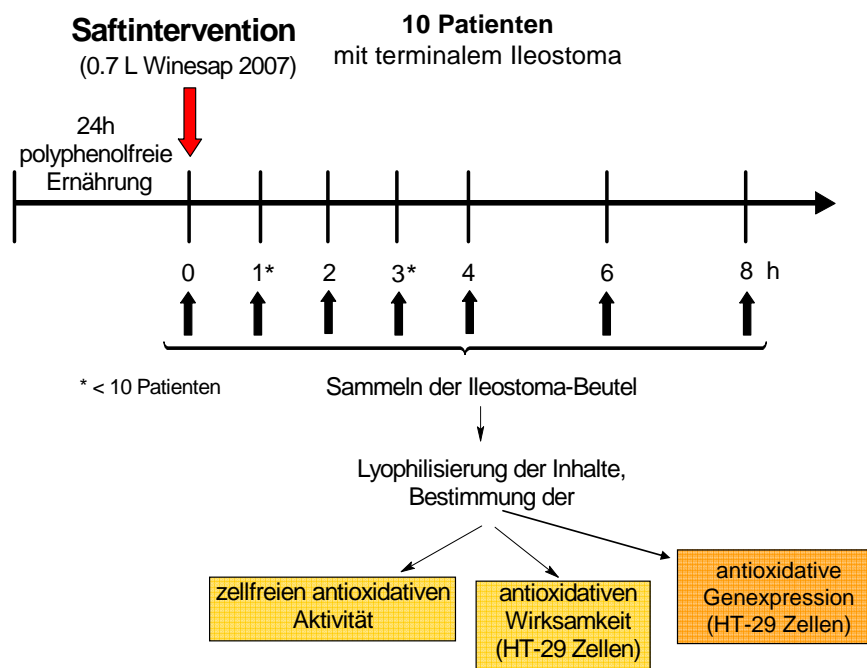


Abbildung 55: Studiendesign der Ileostoma-Studie

9.2.1 Zellfreie antioxidative Aktivität der Ileostoma-Proben

9.2.1.1 TEAC-Werte der Ileostoma-Proben

Der TEAC-Wert [mM Trolox] ist ein Maß für die direkte antioxidative Aktivität eines chemischen Stoffes und bestimmt dessen Wirksamkeit ABTS-Radikal-Kationen abzufangen im Vergleich zu dem Vitamin E Analogon Trolox (siehe Kap. 8.1) (*Rice-Evans et al. 1994*). Polyphenolische Inhaltsstoffe im Apfelsaft besitzen ein antioxidatives Potential, deren Wirkung im menschlichen Darm bisher nur wenig untersucht ist. Der TEAC-Assay bietet hierbei eine Möglichkeit das antioxidative Potential von Apfelsaftinhaltsstoffen in Ileostoma-Beutelinhalten nach Saftverzehr zu erfassen. Im Folgenden sind die einzelnen TEAC-Werte der Ileostoma-Beutelinhalte von 10 Patienten, gesammelt vor (0 h) und bis zu 8 h nach Smoothie-Intervention dargestellt:

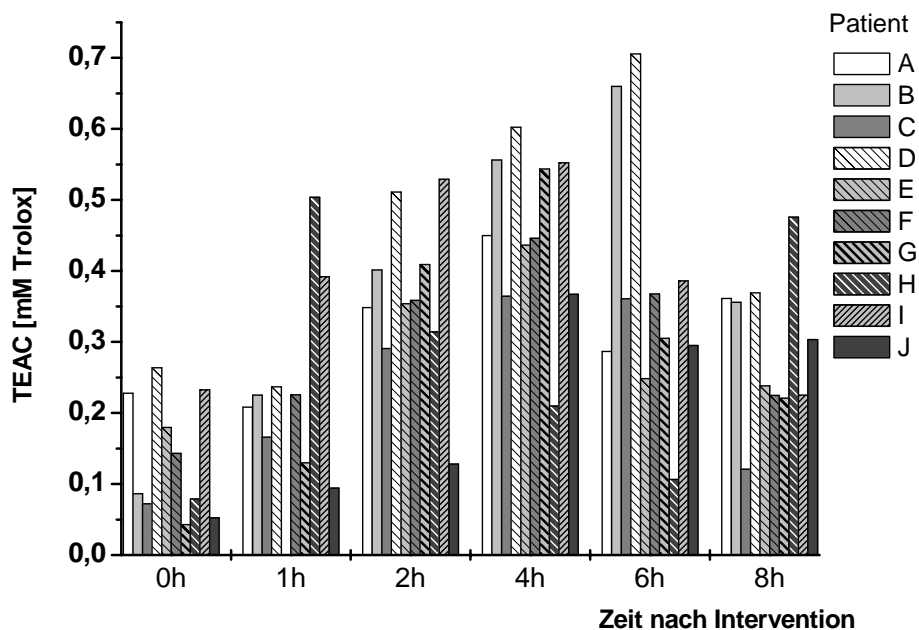


Abbildung 56: TEAC-Werte der Ileostoma-Lyophilisate von 10 Patienten; n = 1 je Probe.

Die hieraus gemittelten Werte ergeben folgende Darstellung

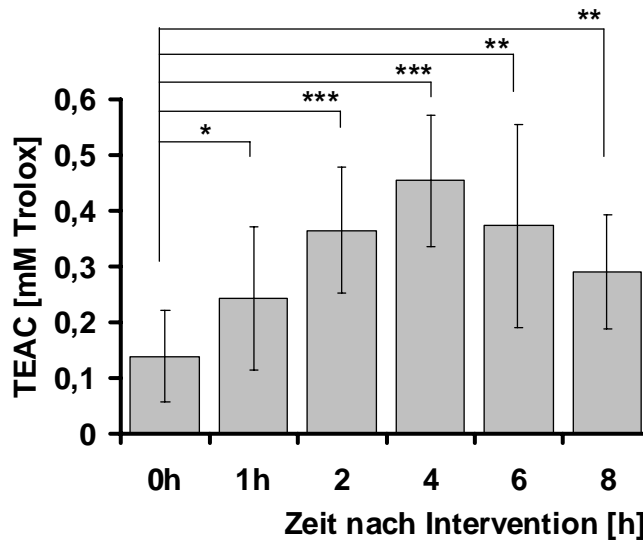


Abbildung 57: TEAC-Werte der Ileostoma-Lyophilisate 0 h vor bzw. 1h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Smoothie-Intervention; n = 10 Patienten; MW \pm SD; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

9.2.1.2 ORAC-Werte der Ileostoma-Proben

Der ORAC-Wert [mM Trolox] ist ebenfalls ein Maß für die antioxidative Kapazität von biologischen Proben (siehe Kap. 8.1) (*Huang et al., 2005*) und gibt Kapazität eines Antioxidanz an, freie Radikale auf direktem Wege abzufangen, wobei AAPH als Radikal-generierendes System verwendet wird (*Cao et al., 1998*). Der ORAC-Wert der Ileostoma-Proben von 0 h bis 8h nach Intervention wurde für zehn Patienten bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt:

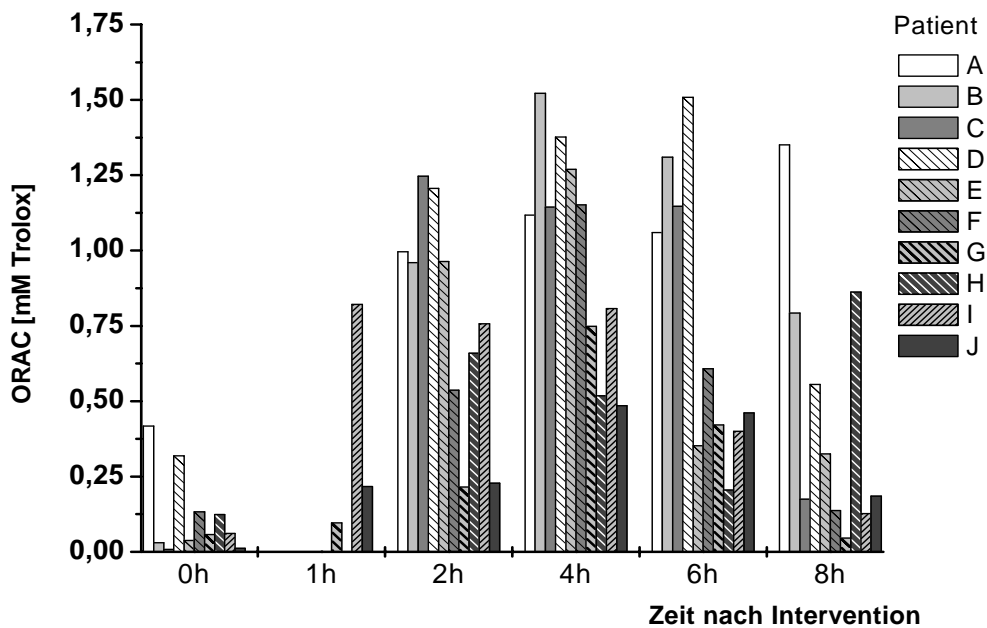


Abbildung 58: ORAC-Werte der Ileostoma-Lyophilisate; n = 1 je Probe.

Des Weiteren wurden die ORAC-Werte der verschiedenen Zeitpunkte nach Intervention für die 10 Patienten gemittelt und dargestellt (Abb. 59).

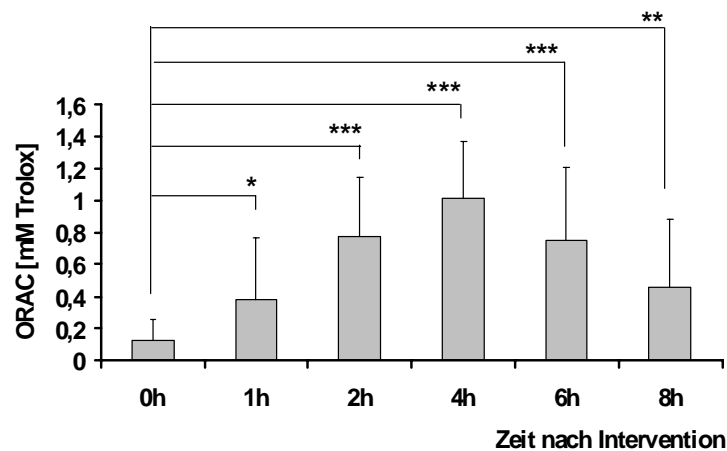


Abbildung 59: ORAC-Werte der Ileostoma-Proben 0 h, 1h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Intervention; n = 10 Patienten mit Ausnahme für den 1h Wert (n=3); MW \pm SD; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Die TEAC-Werte der Ileostoma-Proben liegen zwischen 0,1 und 0,7 mM und zeigen einen deutlichen zeitabhängigen Anstieg nach Smoothieverzehr (Abb.56-59). Alle Ileostoma-Lyophilisate weisen im Vergleich zu den 0h Proben signifikant höhere TEAC-Werte auf, mit einem Maximum bei den 4 h-Ileostoma-Proben. Der zeitliche Verlauf der TEAC-Werte der Ileostoma-Proben ist für alle Patienten relativ ähnlich, die absolute Höhe der Einzelwerte jedoch stark unterschiedlich. Die ORAC-Werte der Ileostoma-Proben lagen zwischen 0,01 und 1,5 mM. Wie in den Abbildungen 57 und 58 zu erkennen ist, stiegen die ORAC-Werte der Ileostoma-Proben nach Verzehr des Apfelsmoothies zeitabhängig an. Ebenfalls zeigten sich hier deutliche individuelle Unterschiede zwischen den Proben der einzelnen Patienten. Gemittelt über alle Patienten erzielte die 4 h-Probe den maximalen ORAC-Wert. Analog zu den TEAC-Werten waren die ORAC-Werte der 8 h-Proben ebenfalls höher als die der 0 h-Proben. Es stellt sich hierbei die Frage inwieweit und welche polyphenolische Inhaltsstoffe eine TEAC Aktivität aufweisen. Schäfer et al. konnten in diesem Zusammenhang in einer Studie mit verschiedenen Apfelsaftextrakten, sowie rekonstituierten Mischungen aus fünf phenolischen Apfelsaft-Inhaltsstoffen (Phloridzin, Rutin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Epicatechin) zeigen, dass die rekonstituierten Mischungen mit 5,0 bis 7,9 mM höhere TEAC-Werte erreichten als die Extrakte mit 3,4 bis 4,2 mM (*Schaefer et al., 2006a*). Hieraus wurde angenommen, dass die fünf untersuchten phenolischen Apfelsaftinhaltsstoffe einen wesentlichen Beitrag in der radiakal-abfangenden Wirkung leisten. In einer humanen Interventionsstudie mit trübem Apfelsaft, wurden circa 0 – 33 % der aufgenommenen Polyphenole in den Ileostoma-Beutelinhalten wiedergefunden, mit einem Maximum der Exkretion nach 2 h (*Kahle et al., 2005b*). In einer weiteren Interventionsstudie mit trübem Apfelsaft wurden 41,7 % der polyphenolischen Verbindungen, sowie deren korrespondierende Metabolite in den Ileostoma-Beutelinhalten detektiert, wobei auch hier das Maximum der Ausscheidung bei 2 h lag (*Kahle et al., 2007*). Interessanterweise wurde das Maximum der Ausscheidung an Procyanidinen, jedoch erst 4 h nach Intervention gefunden (*Gerhauser, 2008*). Das Auftreten eines maximalen TEAC-Werts für

die 4 h- bzw 6 h-Probe deutet darauf hin, dass nicht nur die polyphenolischen Inhaltsstoffe des Apfelsmoothies, sondern auch deren andere Saftinhaltsstoffe zur antioxidativen Kapazität beitragen (*Pickard, 2009*). Die zeitliche Verschiebung des maximalen TEAC-Wertes auf 4 bis 6 h weist auf die Gegenwart von Procyanidinen in den untersuchten Beutelinhalten hin. Des Weiteren wurde der TEAC-Wert des Apfelsmoothies bestimmt. Dieser lag mit 11,5-12 mM nur geringfügig unter dem TEAC-Wert von 13 mM, der von der Forschungsanstalt Geisenheim 2007 im AG von Prof. Dietrich ermittelt wurde (*BMBF, 2007*). Die Abnahme des TEAC-Wertes hängt vermutlich mit dem Abbau antioxidativ wirksamer Komponenten während der Lagerung zusammen. Im Vergleich dazu zeigten zwei analog hergestellte Apfelmarksäfte der Apfelsorte Topaz und Boskoop TEAC-Werte von 5,9 mM bzw. 10,8 mM (*Will F et al., 2008*). Der TEAC-Wert des Topaz-Smoothie liegt damit deutlich unter den ermittelten TEAC-Werten für die Apfelmarksäfte aus den Mostapfelsorten Boskoop (10,8 mM) und Winesap (11,5 mM). Die ORAC-Werte zeigten im Verlauf ein vergleichbares Bild zu den TEAC-Werten derselben Proben. Allerdings war die Höhe der TEAC- und ORAC-Werte nicht identisch, da die ORAC-Werte meist höher lagen als die entsprechenden TEAC-Werte. Dies ist auf den unterschiedlichen Mechanismus beider Methoden zurückzuführen (siehe Kap. 8.1). Cao et al. verglichen in einer Studie ORAC- und TEAC-Werte von menschlichem Serum, und fanden heraus, dass es keine Korrelation zwischen beiden gibt (*Cao et al. 1998*). Zwar wird sowohl in ORAC- als auch in TEAC-Assays die zu untersuchende Probe in ein Radikal-generierendes System gebracht und die Inhibierung des freien Radikals detektiert, jedoch wird nicht dieselbe Messmethode angewandt. Im ORAC-Assay wird die Fläche unter einer Fluoreszenzkurve zur Quantifizierung herangezogen, wodurch die prozentuale Inhibierung und die zeitliche Länge der Inhibierung der freien Radikale kombiniert werden. Weiterhin unterliegt der eingesetzte Radikalgenerator AAPH einem spontanen Zerfall und produziert so Peroxylradikale mit einer stark temperaturabhängigen Rate. Im TEAC-Assay hingegen werden aus ABTS und Kaliumperoxodisulfat ABTS-Radikal-Kationen generiert. Die prozentuale Inhibierung dieser Radikale durch Antioxidanzien wird nach einer festgelegten Zeit über die Absorption quantifiziert.

9.2.2 Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels

Der DCF-Assay ermöglicht die direkte Erfassung von ROS in lebenden Zellen und liefert somit einen unmittelbaren quantitativen Parameter für den oxidativen Stress der Zelle. (*Wang et al. 1999*). Zur Untersuchung des Einflusses der Ileostomabeutel-Inhalte (Lyophilisate) auf den zellulären ROS-Level wurden HT-29 Zellen für 24h mit je 100 µg/ml der jeweiligen Ileostomabeben inkubiert und anschließend die Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels gemessen. Hierbei wurde der Fluoreszenzanstieg relativ zur TBH behandelten DMSO-Kontrolle berechnet.

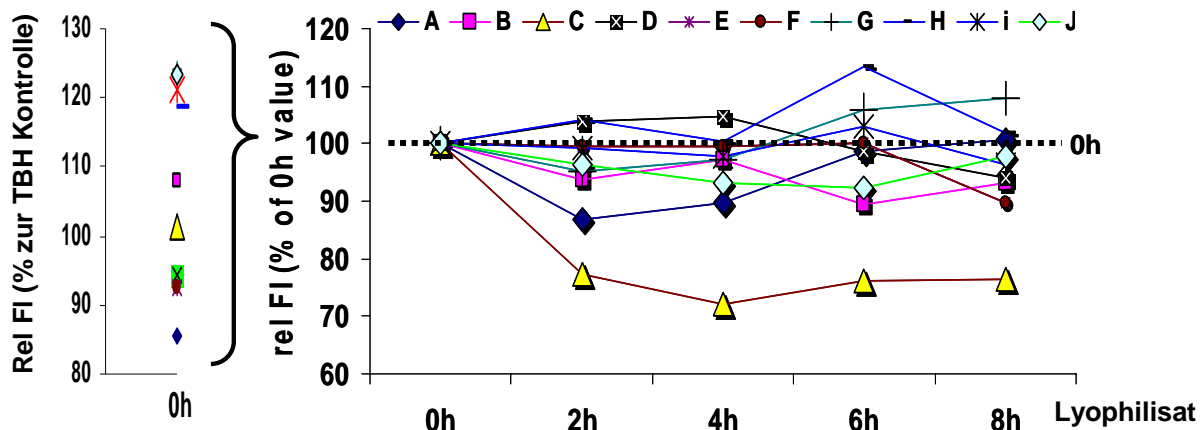


Abbildung 60: Modulation des TBH induzierten ROS-Level in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten (100 µg/ml) in % zur TBH-Kontrolle; 10 Patienten, n = 3 je Patient. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der einzelnen Ileostomabeutel-Inhalte.

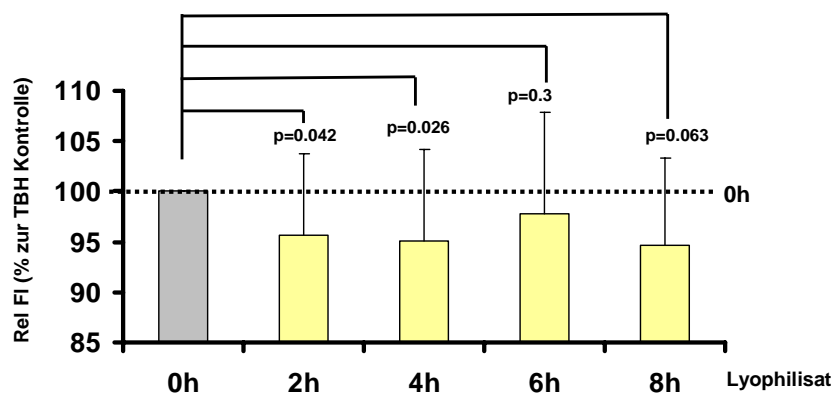


Abbildung 61: Modulation des TBH induzierten ROS-Level in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten (100 µg/ml) prozentual zur TBH-Kontrolle. Dargestellt als Mittelwerte von 10 Patienten, n = 3 je Patient; MW ± SD; Signifikante Unterschiede zur 0h-Probe mittels einseitig, gepaartem Wilcoxon Test; * p < 0,05

Im Vergleich zu den 0h- Ileostomabeutel-Inhalten bewirkten die 2h- und 4h-Ileostoma-Beutelinhalte eine signifikanten Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen (Abb 60-61). Die Inkubation mit den 6h-Ileostoma-Proben resultierte dagegen in einem leichten Anstieg, der jedoch durch die 8h-Ileostomaproben wieder abnahm. Bellion et al. konnten in einer Studie zeigen, dass in menschlicher Fäces fermentierte unterschiedliche Apfelsaftextrakte den zellulären ROS-Level in Caco2-Zellen reduzieren. Selbst die Fermentations-Kontrollen, die weder Apfelextrakt-Polyphenole noch deren Abbauprodukte enthielt, erniedrigten den TBH-induzierten ROS-Level signifikant nach 6 h Inkubation ab einer Konzentration von 5 µg/ml und nach 24 h Inkubation bereits ab 0,15 µg/ml (*Bellion et al., 2008*). Kahle et al. fanden ein Maximum der Exkretion an Polyphenolen 2 h nach Intervention in den Ileostoma-Beuteln wieder (*Kahle et al., 2005b; Kahle et al., 2007*). Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels nicht nur auf polyphenolische Inhaltsstoffe der Ileostoma-Proben zurückzuführen ist, sondern auch auf andere Abbauprodukte des

Apfelsmoothies wie z.B. kurzkettige Fettsäuren oder höher molekulare Verbindungen, wie z. B. Pektine (*Veeriah et al., 2008*). Eberhardt et al. konnten zeigen, dass die radikalabfangende Wirksamkeit von frischen Äpfeln primär durch den Gehalt an polyphenolischen Inhaltsstoffen bestimmt wird und weniger durch das Vitamin C (*Eberhardt et al., 2000*). Mehrere Studien belegen zudem, dass die höchste antioxidative Aktivität stärker von der Apfelschale ausgeht, als vom Fruchtfleisch. Als potentielle Verbindungen wurden hierbei die Quercetin-glycoside identifiziert, welche hauptsächlich in der Schale lokalisiert sind (*Burda et al. 2001; Lee et al. 2003; Wolfe et al. 2003; McGhie et al. 2005*). Ein umfangreicher Vergleich der radikalabfangenden Aktivität von Apfelsaftextrakten, sowie deren Fraktionen und Subfraktionen mit den Inhaltsstoffen ergab, dass alle phenolischen Hauptklassen zur antioxidativen Wirksamkeit gegenüber Peroxyl-Radikalen im ORAC Assay beitragen, wohingegen DPPH und das Superoxidradikalanion besonders durch lipophile Fraktionen, die reich an Quercetin-glycosiden und oligomeren Procyanidinen sind abgefangen werden (*Zessner et al. 2008*). Neben der radikalabfangenden Wirksamkeit *in-vitro*, gibt es auch zahlreiche Hinweise auf die Inhibierung der Lipidperoxidation. Apfelsaftextrakte und einzelne polyphenolische Inhaltsstoffe zeigten eine hemmende Wirkung gegenüber Kupfer-induzierter Oxidation humaner LD- (low density) Lipoproteine, gegen Ascorbinsäure und FeSO₄ induzierte Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen, sowie gegenüber der Peroxidation von Linolsäure in mizellaren System (*Pearson et al. 1999; van der Sluis et al. 2000; Vanzani et al. 2005*). Eine signifikante Verringerung oxidativer DNA-Schäden, sowie eine Reduktion des intrazellulären ROS-Levels nach Induktion mit *tert*-Butylhydroperoxid konnte ebenfalls *in-vitro* durch die Inkubation mit Apfelsaftextrakten, sowie phenolischen Inhaltsstoffen gezeigt werden (*Schaefer et al. 2006; Schaefer et al. 2006; McCann et al. 2007*). In Untersuchungen von Schäfer et al. reduzierten unterschiedliche Apfelsaftextrakte in den Konzentrationen 50 – 250 µg/ml ebenfalls den TBH-induzierten ROS-Level in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation signifikant und konzentrationsabhängig. Chlorogensäure sowie die beiden Aglyka Phloretin und Quercetin erwiesen sich hierbei in den Konzentrationen 10 – 30 µM ebenfalls als wirksam. Im Gegensatz dazu bewirkten die Apfelsaftinhaltsstoffe Rutin, Phloridzin und Epicatechin keine Modulation des ROS-Levels. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass mit einer kürzeren Inkubationszeit von 2 h keine antioxidativen Effekte für die Apfelsaftextrakte mehr zu finden waren. Dies deutet darauf hin, dass die Zellantwort einen wichtigen Mechanismus bei der präventiven Wirkung der Apfelsaftextrakte darstellt. Auch zwei von drei rekonstituierten Mischungen der Apfelsaftextrakte erniedrigten den TBH-induzierten ROS-Level nach 24 h Inkubation in den Konzentrationen 10 – 250 µg/ml in einem vergleichbaren Ausmass wie die Ausgangsextrakte. Hieraus schlossen die Autoren, dass ein hoher Anteil weiterer, größtenteils undefinierter Inhaltsstoffe im Apfelsaftextrakt zu dessen antioxidativer Wirksamkeit beitragen (*Schaefer et al., 2006b; Schaefer et al., 2006a*). In der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 Zellen bewirken phenolische Apfelsaftextrakte darüber hinaus eine protektive Wirkung gegenüber H₂O₂ induzierter Zytotoxizität und entfalten in humanen Lungeneithelzellen einen Schutz vor Cr(VI)-induzierter Lipidperoxidation, oxidativen DNA-Schäden, sowie NF-κB-Aktivierung (*Shi et al. 2002*).

9.2.3 Modulation der antioxidativen Genexpression

Zur Untersuchung des Einflusses der Ileostomabeutel-Inhalte auf die Modulation der antioxidativen Genexpression in HT-29 Zellen, wurden die Zellen für 24h mit den jeweiligen Ileostoma-Proben inkubiert und die Genexpression mittels klassischer RT-PCR detektiert (Abb. 62). Die Ergebnisse der antioxidativen Genexpression ausgewählter Zielgene sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Hierbei wurde der fold change der Genexpression relativ zur DMSO-Kontrolle berechnet und als prozentuale Änderung dargestellt.

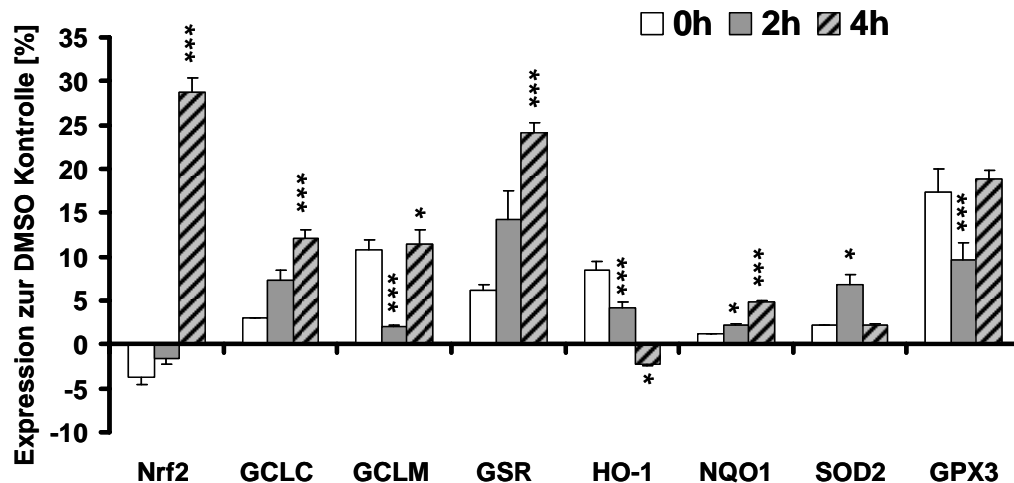


Abbildung 62: Modulation antioxidativer Genexpression in HT-29 Zellen nach 24h Inkubation mit Ileostomabeutel-Inhalten (0h-, 2h, und 4h-Proben) dargestellt als prozentuale Änderung bezogen auf die DMSO-Kontrolle (=0), MW \pm SD von 10 Patienten je Ileostomabeutel Lyophilisat und Zielgen. Signifikante Unterschiede zur 0h-Ileostoma-Probe.

Nach 24h Inkubation der 0h-, 2h-, und 4h-Ileostomabeutel-Inhalte konnte eine deutliche Modulation der antioxidativen Genexpression beobachtet werden (Abb. 62). Innerhalb der untersuchten Zielgene zeigten sich dabei deutliche Unterschiede im Expressionsmuster. Im Vergleich zur 0h-Ileostomaprobe konnte nach 24h Inkubation mit den nach 2h bzw 4h erhaltenen Ileostoma-Lyophilisaten ein signifikanter Anstieg der meisten Zielgene in den HT-29 Zellen beobachtet werden. Hierbei zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg in der Nrf2, GCLC, GSR und NQO1 Genexpression. Die Expression des HO-1 Gens nahm dagegen in Abhängigkeit der Zeitpunkte der Ileostoma-Proben ab, mit einer signifikanten Inhibierung durch die 4h Ileostoma-Proben. Die Induktion der Genexpression war für Nrf2 am stärksten durch die 4h-Ileostoma-Proben. Dagegen resultierten die 0h- und 2h-Ileostoma-Proben in einer Hemmung der Nrf2 Expression. Die SOD2 Expression erreichte nach Inkubation mit den 2h-Ileostoma-Proben ein Maximum und blieb durch die 4h-Ileostoma-Proben unverändert zu den 0h-Proben. Im Vergleich dazu war die GCLM und GPX3 Genexpression signifikant erniedrigt nach Inkubation mit den 2h-Ileostoma-Proben. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die untersuchten Ileostoma-Proben nach 24h Inkubation in HT-29 Zellen eine signifikante Modulation antioxidativer Genexpression bewirken. Innerhalb der untersuchten Zielgene zeigte sich hierbei ein unterschiedliches Genexpressionsmuster und für die meisten Gene konnte eine

hochsignifikante Induktion der mRNA Expression beobachtet werden. Insbesondere für das Nrf2 Gen, welches für die transkriptionelle Regulierung antioxidativer Gene verantwortlich ist. Interessanterweise war die Induktion der meisten Zielgene durch die 4h Ileostomabeutel-Proben am höchsten. Dies hängt möglicherweise mit dem zeitlichen Unterschied in der Dünndarmpassage bestimmter polyphenolischer Inhaltsstoffe nach Verzehr des Apfelmarksaftes zusammen. Demnach erscheinen höhermolekulare polyphenolische Verbindungen wie Procyanidine, bzw. deren Metabolite erst nach 4h im Ileostomabeutel. Dies konnte in einer von Gerhäuser et al. durchgeführten Interventionsstudie an Ileostoma-Patienten gezeigt werden (**Gerhäuser, 2008**). Strukturell kleinere polyphenolische Verbindungen, wie z.B. die Chlorogensäure erreichen dagegen bereits 2h nach Saftverzehr die Ileostomabeutel, was auf eine kürzere Passagezeit hindeutet (**Kahle et al., 2005, 2006**). Desweiteren ist davon auszugehen, dass die an verschiedenen Zeitpunkten nach Saftverzehr erhaltenen Ileostomabeutelinhalte, ebenfalls unterschiedliche Polyphenolprofile aufweisen. Da in den 0h-Ileostomaproben quantitativ keine polyphenolischen Apfelinhaltsstoffe zu erwarten sind, sind die beobachteten Ergebnisse zur Modulation der redoxsensitiven Genexpression, höchstwahrscheinlich auf die antioxidative Wirksamkeit des Studiensaftes zurückzuführen. Dies zeigt sich darüber hinaus noch in einem unterschiedlichen Genexpressionsmuster durch die 2h- bzw. 4h-Ileostoma-Proben. In diesem Zusammenhang ist es durchaus von Interesse den zeitlichen Verlauf der Genexpression durch Untersuchung weiterer Ileostoma-Proben (6h, 8h) zu verfolgen. Es ist denkbar, dass z.B. 6h bzw. 8h nach Saftverzehr andere polyphenolische Inhaltsstoffe/ Metabolite dominieren und eine antioxidative Wirksamkeit entfalten, wenn auch nicht im gleichen Ausmass. Die Ergebnisse zur Modulation des zellulären ROS-Levels durch die Ileostoma-Proben zeigen nämlich, dass dieser zeitabhängig abnimmt. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ileostomabeutelinhalte noch nicht vollständig analytisch charakterisiert sind, bleibt die Identifizierung antioxidativ aktiver polyphenolischer Inhaltsstoffe/ Metabolite noch zu klären.

9.2.4 Kumulierte Trockenmassen der Ileostomabeutel-Lyophilisate

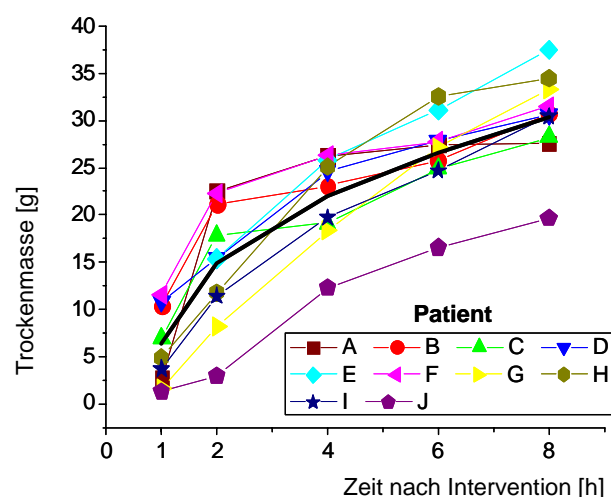


Abbildung 63: Darstellung der kumulierten Ausbeute an Trockenmasse der Ileostomabeutel Inhalte nach Gefriertrocknung der jeweiligen Proben. Dargestellt als kumulierte Werte der einzelnen Zeitpunkte. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 10 Patienten und Darstellung des Mittelwerts aus den jeweiligen Zeitpunkten (schwarze Linie).

Nach Lyophilisierung der einzelnen Ileostomabeutel-Inhalte wurden durch Abwaage die jeweiligen Trockenmassen aus den Ausbeuten bestimmt und hieraus die zeitlich kumulierte Trockenmasse der jeweiligen Ileostoma-Proben berechnet (Abb. 63). Hierbei zeigte sich eine deutliche zeitabhängige Zunahme der Ausbeuten an Ileostomabeutel-Inhalten mit einem Maximum bei 8h. Obwohl starke Unterschiede innerhalb der Proben der einzelnen Patienten zu erkennen sind, reflektiert der Mittelwert (schwarze Linie) sehr deutlich den zeitlichen Anstieg der Trockengewichte. Bereits 1h nach Saftverzehr ist eine deutliche Zunahme der Ausbeute an Trockenmasse relativ zu den 0h Proben erkennbar und wird durch die 2h- und 4h- Proben übertroffen. Interessanterweise wurde die höchste Volumenzunahme an Ileostomabeutelinhalten bei allen untersuchten Proben auch erst 2h bzw 4h nach Saftverzehr beobachtet, was darauf hindeutet, dass der Apfelsaft möglicherweise eine charakteristische Passage durch den Dünndarm aufweist. Möglicherweise ist dies auf die hohe Viskosität und besondere Zusammensetzung des Apfelsaftes, im Vergleich zu herkömmlichen Apfelsäften zurückzuführen. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es vorstellbar, dass durch die verzögerte Passage die präventive Wirksamkeit zusätzlich erhöht wird, da hierdurch antioxidativ wirksame polyphenolische oder auch nicht-polyphenolische Saftinhaltsstoffe (Pektine) eine längere Kontaktzeit im Darmlumen erzielen können.

9.2.5 Zytotoxizität und Wachstumshemmung

9.2.5.1 Wachstumshemmung

Zahlreiche Studien zeigen, dass Apfelextrakte das Wachstum von menschlichen Tumorzellen *in vitro* inhibieren (*Fridrich et al., 2007*), allerdings ist nur wenig über die Bioverfügbarkeit von Apfelsaftinhaltsstoffen nach Apfelsaftkonsum im menschlichen Darm bekannt. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen sollte deshalb der Einfluss der Ileostoma-Proben, (vor und nach Apfelsaftkonsum), auf die Zellzahl sowie die Viabilität von HT29-Zellen (Trypanblau-Ausschlusstest) untersucht werden. Hierzu wurden die 2h und 4h Ileostoma-Proben ausgewählt, da diese in einer Interventionsstudie mit trübem Apfelsaft ein Maximum an Polyphenolen bzw. Procyanidinen in den Ileostoma-Beuteln erreichten (*Kahle et al., 2005a; Kahle et al., 2005b; Gerhauser, 2008*). Nachfolgend sind die Ergebnisse des Zellwachstums nach 24 h Inkubation mit den Ileostoma-Proben von Patient A bis C gezeigt (Abb. 64). Hierbei wurde das Zellwachstum der behandelten Zellen prozentual zur DMSO-Kontrolle kalkuliert (DMSO-Kontrolle entspricht 100 % rel. Zellwachstum).

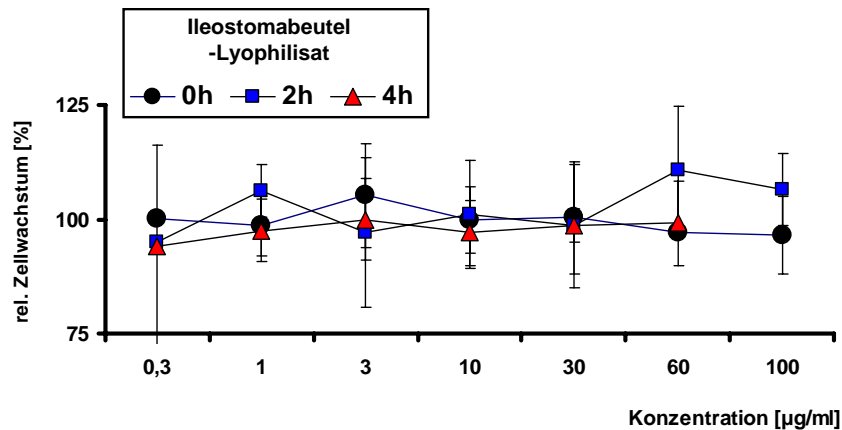


Abbildung 64: Modulation des relativen Zellwachstums von HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten (0,3-100 µg/ml) von (a) Patient A, (b) Patient B, (c) Patient C (% zur DMSO-Kontrolle); n = 3 unabhängige Versuche; MW ± SD; ** p < 0,01.

Da in den Ileostomabeutelinhalten nach Saftverzehr neben polyphenolischen Inhaltsstoffen auch andere Stoffe (wie z.B. Gallensäuren, andere Metabolite) enthalten sein können, ist es wichtig vorab zu klären, ob die Beutelinhalte unter den experimentellen Bedingungen einen antiproliferativen Effekt auf die HT-29 Zellen zeigen. Denn ein solcher Effekt würde in Folge alle weiteren zellulären Endpunkte beeinträchtigen. In dem untersuchten Konzentrationsbereich (0,3-100 µg/ml) konnte bei allen drei Inkubationen kein wachstumshemmender Effekt auf die HT-29 Zellen beobachtet werden. Für keine der Ileostoma-Proben war ein konzentrationsabhängiger Verlauf der relativen Zellzahl zu erkennen. Kern et al. untersuchten verschiedene Apfelsaftextrakte, rekonstituierte Mischungen sowie einzelne Polyphenole in Bezug auf ihr wachstumshemmendes Potential gegenüber HT29-Zellen nach 72h Inkubation (**Kern et al., 2005**). Hierbei zeigten Kaffeesäure und Epicatechin die stärksten wachstumshemmenden Effekte, mit EC₅₀-Werten von 132 bzw. 136 µM. Chlorogensäure (EC₅₀: 205 µM) und die Proanthocyanidine B1 (EC₅₀: 235 µM) und B2 (EC₅₀: 191 µM) waren nur schwach wachstumshemmend. Phloridzin inhibierte das Zellwachstum nicht unter einer Konzentration von 300 µM, das freie Aglykon Phloretin hingegen erwies sich mit einem EC₅₀-Wert von 89 als sehr potent. Ähnliches wurde für Quercetin gefunden (EC₅₀: 52 µM). Auch hier war das freie Aglykon viel stärker wachstumshemmend als die zugehörigen Glykoside. Der untersuchte Apfelsaftextrakt zeigte einen EC₅₀-Wert von 134 µg/ml. Schäfer et al. konnten zeigen, dass Phloretin das Zellwachstum von HT29-Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,3 µM hemmt, Quercetin erst ab ca. 100 µM nach 24 h Inkubation. Unter den gestesteten Einzelsubstanzen (Rutin, Phloridzin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Epicatechin) erwies sich bis zu einer Konzentration von 100 µM keine als wachstumshemmend. Ebenso verursachten verschiedene rekonstituierte Apfelsaftextrakte (10 – 250 µg/ml) nach 24 h Inkubation keine Minderung des Zellwachstums von HT29-Zellen (**Schaefer et al., 2006b; Schaefer et al., 2006a**). Der Vergleich mit anderen Studien zeigt, dass die beiden Haupt-Polyphenole des eingesetzten Apfelsmoothies Chlorogensäure und Procyanidin B2, kaum Einfluss auf die Proliferation der HT29-Zellen besitzen. Ein wachstumshemmender Effekt der Ileostomabeutelinhalte auf die HT29 Zellen ist für den untersuchten Konzentrationsbereich und innerhalb der 24h Inkubationszeit daher nicht zu erwarten (**Pickard, 2009**).

9.2.5.2 Viabilität

Zur Untersuchung des Einflusses der Ileostoma-Proben auf die Zytotoxizität von HT29-Zellen wurde eine 4 h-Probe ausgewählt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

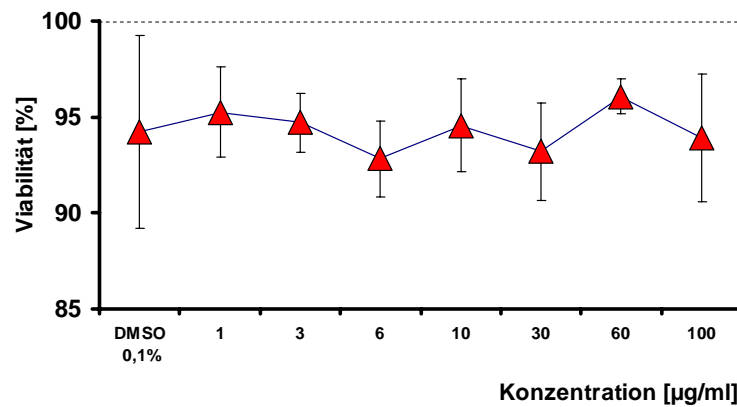


Abbildung 65: Modulation der Viabilität von HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation mit einer Ileostoma-Probe; Trypanblauausschlusstest; n = 3 – 5 unabhängige Experimente; MW ± SD.

Die Werte der Viabilitäten nach 24 h Inkubation mit den vgrschiedenen Ileostoma-Beutelinhalten lagen alle über 92 % (Abb. 65). Die Ileostoma-Proben zeigen somit im eingesetzten Konzentrationsbereich (1 – 100 µg/ml), sowie für die vorgesehenen Endpunkte DCF-Assay und Genexpression keine zytotoxischen Effekte in HT29-Zellen. In Untersuchungen von Schäfer et al. an HT29-Zellen erwiesen sich verschiedene Apfelsaftextrakte sowie die polyphenolischen Inhaltsstoffe Quercetin, Phloretin, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Rutin, Phloridzin und Epicatechin in Konzentrationen von 10 – 250 µg/ml bzw. 1 – 100 µM als nicht zytotoxisch mit Viabilitäten über 85 % nach 24 h Inkubation (*Schaefer et al., 2006b*). Die in dieser Arbeit durchgeführten Voruntersuchungen lassen daher keinen zytotoxischen Effekt auf die Membranintegrität im untersuchten Konzentrationsbereich erwarten.

9.3. Modulation der ARE-abhängigen Genexpression durch Apfelsäfte in Kolon und Leber von Ratten

Ziel war zu ergründen, inwieweit polyphenolreiche AS die antioxidative Genexpression modulieren und inwiefern die Polyphenolfraktion des Saftes einen Einfluss auf die antioxidative Abwehr hat. Hierzu wurde die Expression ausgewählter Nrf2 abhängiger Zielgene in Kolon und Leber von Ratten nach Intervention mit klarem, trübem und markhaltigem AS in direktem Vergleich zu einem polyphenolfreien Kontrollsaft untersucht (Abb. 66). Die Einbeziehung der Leber in die Untersuchungen, lässt darüber hinaus möglicherweise eine Aussage über die systemische Wirksamkeit der polyphenolischen Säfte zu.

Säfte:

1. Kontrollsaft (polyphenolfreier Apfelsaft)
2. Apfelsmoothie* (trüber AS06 + 40% Apfelmark)
3. Trüber Apfelsaft (AS06)
4. Klarer Apfelsaft (AS06)

*(Will et al. 2008)

Intervention: Sprague-Dawley Ratten (8 Tiere/ Saftgruppe)

Studiendesign (Minn J., 2010)

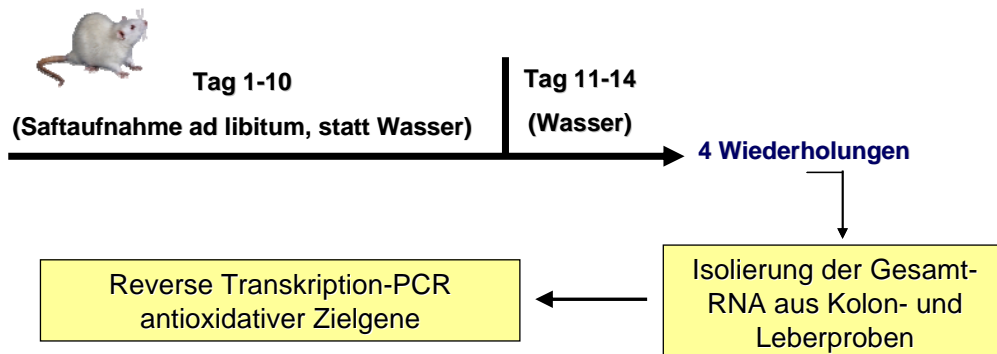


Abbildung 66: Studiendesign zur Saft-Intervention an Ratten

9.3.1 Basisexpression antioxidativer Gene in Kolon und Leber

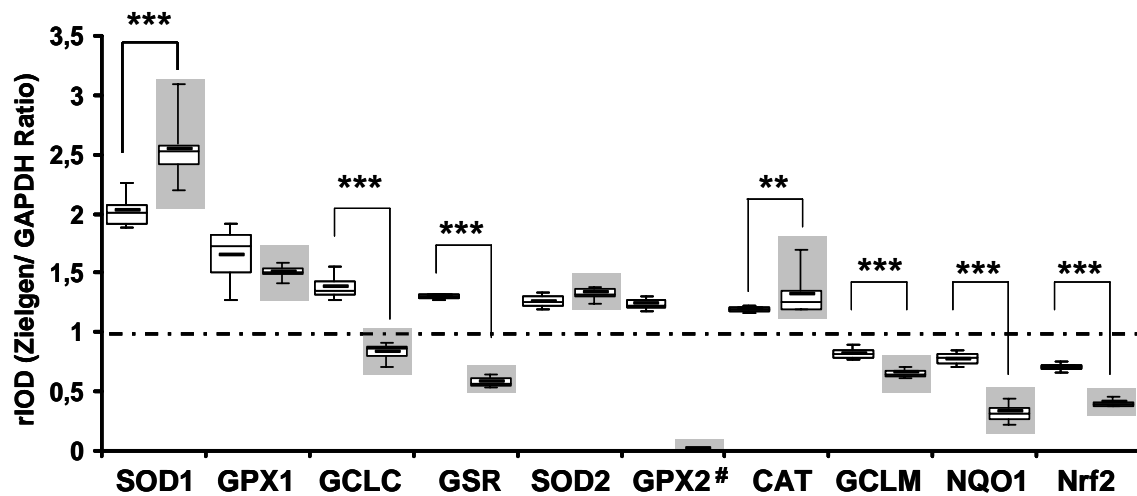


Abbildung 67: Basisexpression antioxidativer Zielgene in Kolon und Leber von Ratten nach Intervention mit polyphenolfreiem Kontrollsaft. Werte sind als relative integrierte optische Dichte (rIOD) dargestellt und normalisiert auf das endogene Referenzgen GAPDH (IOD =1). Daten sind als Boxplot (Minimum, 25th Quartile; 50th (Median), 75th Quartile, Maximum und Mittelwert (dicke Linie)), Kolon (farblose Säulen) und Leber (graue Säulen), # Spuren (rIOD < 0.02). Unterschiede in der Genexpression zwischen Kolon und Leber wurden mittels ungepaartem, einseitigem Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz geprüft: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Nach Intervention mit dem polyphenolfreien Kontrollsaft konnte sowohl eine deutliche Basisexpression der Zielgene (Abb. 67) im distalen Kolon und in der Leber, als auch eine starke Homogenität der Expression innerhalb der acht Tiere festgestellt werden. Im Kolon wurden die höchsten mRNA Level für SOD1, sowie für die GPX1 beobachtet und überstiegen die der endogenen Kontrolle GAPDH (rIOD > 1,5). Dagegen lag die Expression der meisten Zielgene (einschließlich der gastrointestinalen GPX2) bestenfalls leicht über dem Wert des Kontrollgens (rIOD 1-1,5). Das für die GPX1 und GPX2 beobachtete Ergebnis ist im Einklang mit den in der einschlägigen Literatur beschriebenen GPX/GAPDH Ratios im distalen Kolon männlicher Ratten (*Drew et al., 2005*) und verdeutlicht die starke Expression des nahezu ubiquitär expremierten GPX1 Gens (*Chu et al. 1993, 1995; Cai et al. 1997; Esworthy et al. 1998, 2005*). Eine Basisexpression unterhalb der GAPDH Kontrolle wurde nur für die GCLM, NQO1 und Nrf2 beobachtet. Im kaudalen Leberlappen war die Basisexpression geringer oder vergleichbar mit der im Kolon, mit Ausnahme für SOD1 und CAT, deren mRNA Level höher lagen. Signifikante, gewebespezifische Unterschiede in der Expression konnten vor allem für die GPX2 beobachtet werden, die darüber hinaus nur im Kolon detektiert werden konnte, was sich auch mit Ergebnissen aus der Literatur deckt (*Chu et al., 1993*).

9.3.2 Modulation der Genexpression durch Apfelsäfte

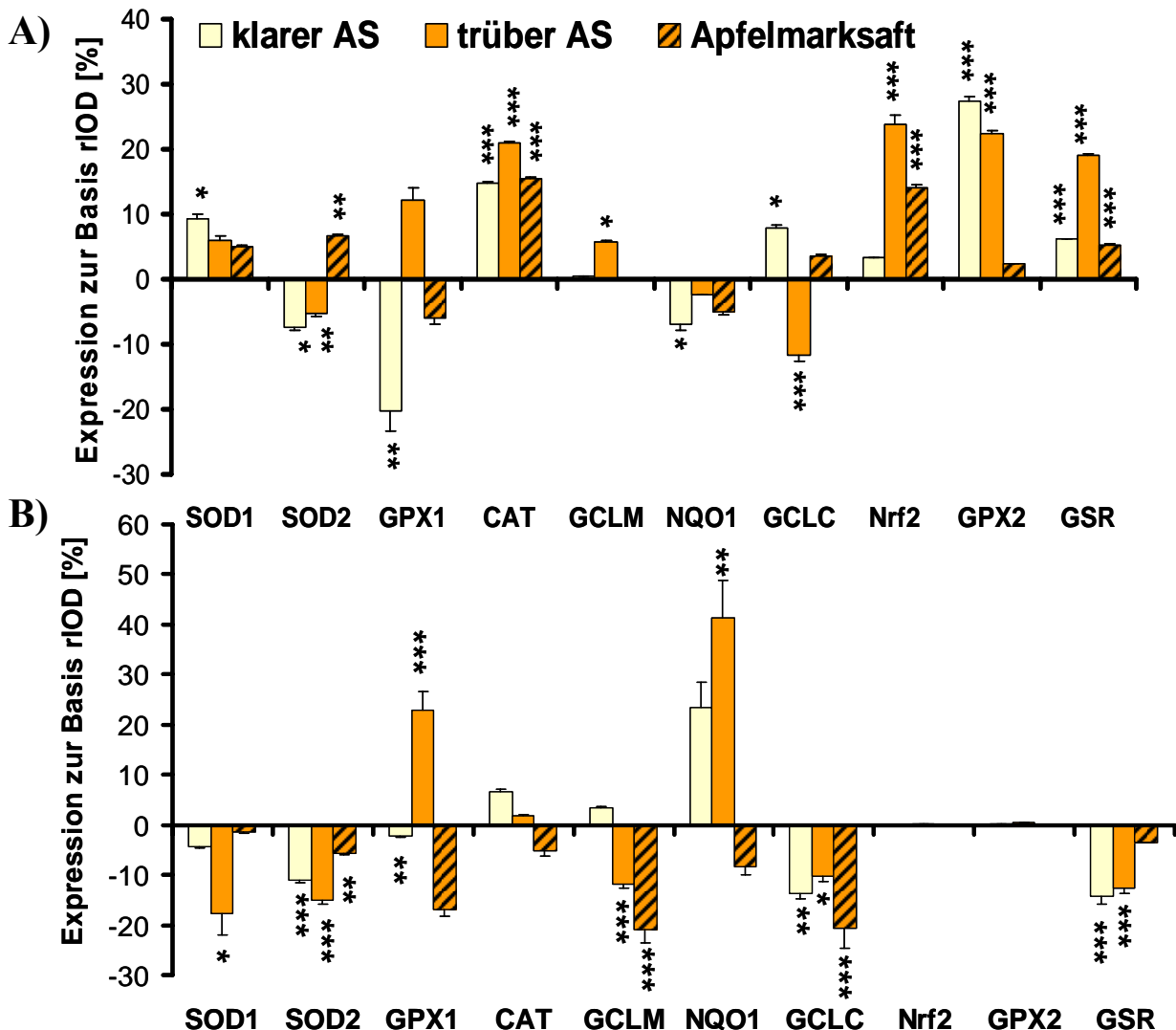


Abbildung 68 a und b: Modulation der Expression redoxsensitiver Gene im A) Kolon und B) in der Leber von Ratten nach Intervention mit klarem und trübem Apfelsaft, sowie Smoothie im Vergleich zu einem polyphenolfreien Kontrollsaft. Daten sind berechnet aus der relativen integrierten optischen Dichte (IOD), normalisiert zum Referenzgen GAPDH (IOD = 1) und dargestellt als prozentuale Unterschiede zum entsprechenden mittleren Basislevel der polyphenolfreien Kontrollsaft-Gruppe. Die Werte sind als prozentualer Unterschied mit Standardabweichung (SD) von acht Tieren je Saftgruppe dargestellt. Mit Hilfe des ungepaarten, einseitigen Mann-Whitney U-Test wurden die Unterschiede zwischen den Apfelsaft und der Kontrollsaft-Gruppe auf Signifikanz überprüft: * $p < 0,05$; # $p = 0,052$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Modulation mit polyphenolreichen AS resultierte in gewebe- und saftspezifischen Veränderungen in der Genexpression (Abb. 68 a und b)). Aufgrund der starken Homogenität der Genexpression innerhalb der Interventionsgruppen konnten geringe aber dennoch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Im distalen Kolon waren die untersuchten Zielgene überwiegend hochreguliert. So konnte eine hochsignifikante mRNA Induktion ($p < 0,001$) für KAT (alle AS), GPX2 (klarere und trübere AS), GSR (klarere und trübere AS) und

dem Transkriptionsfaktor Nrf2 (trüber AS, Smoothie) beobachtet werden. SOD1, GCLC/M und NQO1 waren nur in einem geringeren Ausmaß erhöht und einige Gene wiederum unverändert oder gar herunterreguliert. In einer Rattenstudie, in der Ratten i.p. mit Dimethylhydrazin oder NaCl behandelt wurden, konnte weder durch Intervention mit klarem noch trübem AS eine signifikante Veränderung in der Expression Glutathion-assoziiierter Gene in den Epithelzellen des distalen Kolons beobachtet werden (*Barth et al. 2005; Barth et al. 2007*). Die jedoch in der vorliegenden Studie beobachtete Modulation redoxsensitiver Gene ist möglicherweise auf die höhere Polyphenolkonzentration und antioxidative Aktivität der hier verwendeten Säfte zurückzuführen. Vergleichbar zu den Ergebnissen der eigenen Studie konnten Barth et al. in der zuvor erwähnten Studie eine höhere präventive Wirksamkeit eines trüben AS (im Vergleich zu einem klaren AS) zeigen. Als Endpunkte wurde die Bildung abberanter Kryptfoci, die Zellproliferation und DNA-Schädigung untersucht (*Barth et al. 2005*). In humanen Kolonkarzinoma- (HT-29) und Adenoma- (LT97) Zelllinien, konnte nach Inkubation einer Mischung von Apfelpolyphenolen eine Hochregulierung sämtlicher Glutathion-S-Transferase Gene (darunter auch GSTT2 und GSTP1) gezeigt werden und resultierte gleichzeitig in einer Wachstumshemmung (*Veeriah et al. 2006*). In den Leberproben waren die meisten Zielgene runterreguliert (SOD1, SOD2, GCLC/M, GSR), oder wurden nicht durch die phenolischen AS beeinflusst. Diese Beobachtung ging gleichzeitig mit einer fehlenden Nrf2 Induktion einher, allerdings war die GPX1 und NQO1 Genexpression nach Intervention mit trübem AS signifikant erhöht. Dies spiegelt möglicherweise die Tatsache wieder, dass die ARE abhängige Genexpression nicht ausschließlich über den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert wird, sondern auch durch andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (*Favreau et al. 1995; Dickinson et al. 2003; Moskaug et al. 2005*). Unterschiede in der Bioverfügbarkeit sowie im Metabolismus von Apfelpolyphenolen im Kolon und in der Leber, tragen möglicherweise ebenfalls zu der gewebespezifischen Genexpression bei. Das Ausmaß der Absorption polyphenolischer Apfelinhaltsstoffe im Dünndarm, wird hierbei durch deren molekulare Struktur, sowie der Art und den Grad der Glycosylierung bestimmt (*Kroon et al. 2004*).

9.4 Modulation der antioxidativen Genexpression bei HD-Patienten nach Intervention mit einem anthocyanreichen Mehrfruchtsaft

Ergänzend zu den von Spormann et al. untersuchten Biomarkern (*Spormann et al. 2008*) wurden Genexpressionsuntersuchungen in Proben aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) der HD-Patienten mittels Real Time TaqMan PCR durchgeführt. Hierbei wurde neben der Expression ausgewählter glutathionbezogener Gene (γ -GCL, GPX1, GSR) auch die Nrf2 Transkription, sowie die Genexpression des inflammatorischen Enzyms COX-2 erfasst. Die 10-wöchige Interventionsstudie wurde in drei Phasen unterteilt: Run-in-Phase (Wochen 1-3), Saftaufnahme-phase (Wochen 4-7; 200ml Saft/ Tag), Wash-out-Phase (Wochen 8-10).

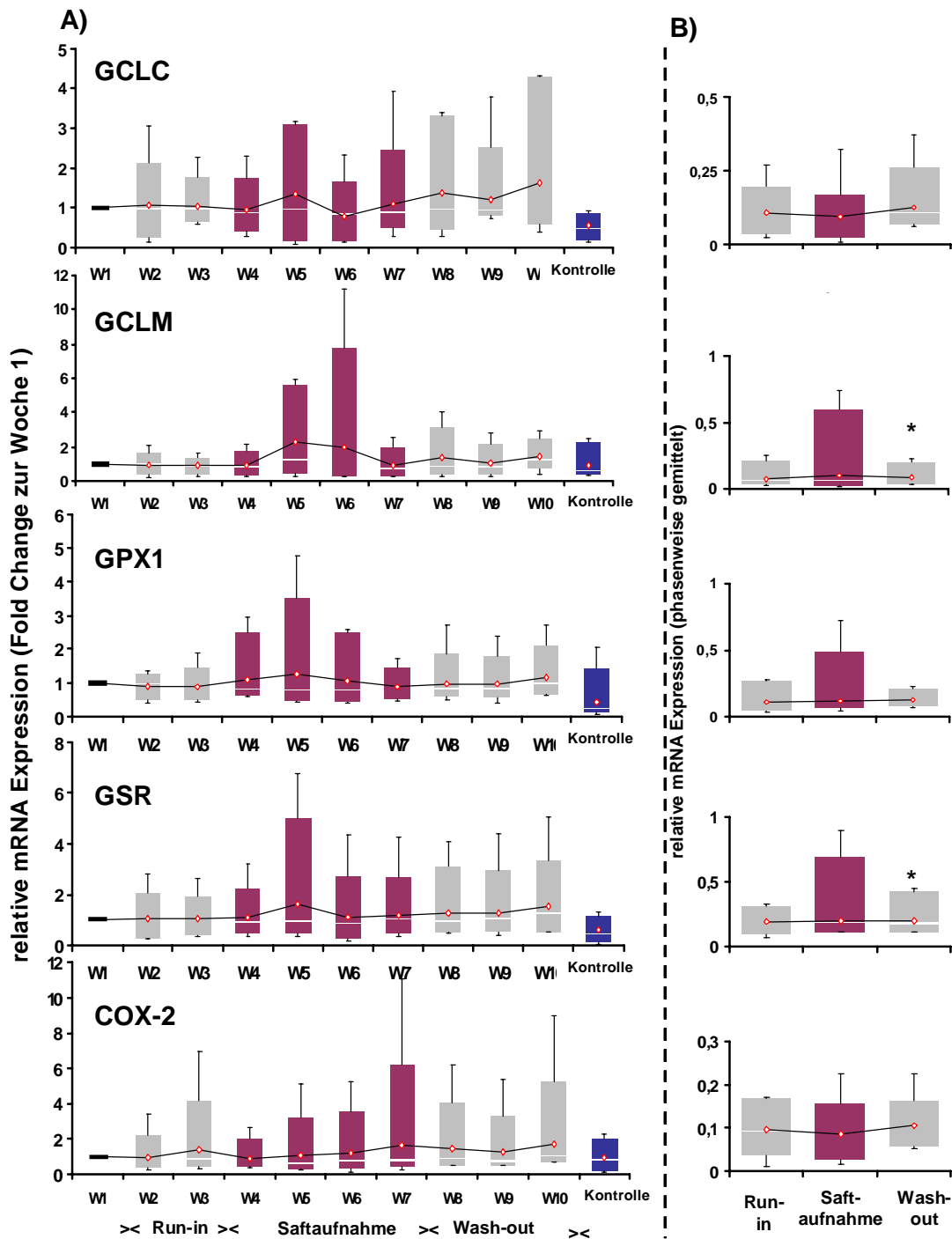


Abbildung 69: Antioxidative Genexpression aus RNA von peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (PBMC) der HD-Patienten (n=11) mittels Real Time TaqMan PCR. Die Abbildung A) zeigt die relative mRNA Expression (Fold Change) bezogen auf die Run-in Woche 1 und Abb. B) die phasenweise (Run-in; Saftaufnahme; Wash-out) gemittelten Wochenwerte. Die Expression des Zielgens wurde auf das endogene Referenzgen β -Actin normalisiert. Ergebnisse sind als Boxplot (Minimum, 5th Quartile; 50th (Median), 95th Quartile, Maximum, Mittelwert (durchgezogene Linie) und Median (Lücke) dargestellt. Im direkten Vergleich zu den HD-Patienten wurden drei unabhängige Blutproben eines gesunden Probanden (ohne Saftintervention) herangezogen, gepoolt und als Kontrolle mitgemessen. Unterschiede in der Genexpression zwischen den Phasen Run-in und „Saftaufnahme“, sowie Run-in und Wash-out, wurden mittels ungepaartem, einseitigem Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz geprüft: * $p < 0,05$.

Im Vergleich zur Woche 1 der run-in Phase zeigt sich nach Intervention mit rotem Mehrfruchtsaft ein deutlicher Anstieg der **GCLC** mRNA Expression (Abb. 69), welcher in der Woche 5 der Saftaufnahme am deutlichsten ausgeprägt ist. Interessanterweise ist ein leichter aber steter Anstieg der GCLC Expression ab der Woche 6 erkennbar, der bis zur Woche 10 anhält. Dies spiegelt sich ebenfalls auch in den Mittelwerten (durchgezogene Linie) wider. Betrachtet man die phasenweise gemittelten Werte, so ist jedoch ein geringer Rückgang der GCLC Expression feststellbar. Dies steht jedoch nicht im Gegensatz zu den Resultaten aus der wochenweisen Darstellung, da im letzteren Fall ein Fold Change auf Woche 1 abgebildet ist, während in der phasenweisen Abbildung Effekte mehrerer Wochen gemittelt dargestellt sind. Auffallend ist jedoch, dass die GCLC Expression aus den Lymphozyten-RNA der Kontrollprobe (gesunder Proband) im Median deutlich geringer ausgeprägt ist, als die der HD-Patienten. Bei diesem Vergleich muss jedoch berücksichtigt werden, dass die wochen- und phasenweisen Ergebnisse aus dem Mittelwert von je 11 HD-Patienten gebildet wurden, die der Kontrolle dagegen, stammen aus drei unabhängigen Proben eines Probanden. Unter Berücksichtigung dieses Unterschieds, offenbart sich dennoch ein (wenn auch kleiner) Unterschied in der GCLC Genexpression von HD-Patienten und eines gesunden Probanden.

Im Vergleich zur GCLC ist die **GCLM** Expression während der Saftphase deutlich stärker ausgeprägt und übertrifft diese in der Woche 5 um das zweifache, bzw. in der Woche 6 sogar um das dreifache im Fold Change zur Woche 1. Hieraus ist ersichtlich, dass in den Lymphozyten der HD-Patienten offenbar eine stärkere GCLM Modulation während der Saftaufnahme stattgefunden hat. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die run-in und die wash-out Phasen beider Gene, so lässt sich feststellen, dass diese sowohl in der wochenweisen, als auch in der phasenweisen Darstellung ähnlich ausgeprägt sind. Auch ein Vergleich der Saftaufnahme in der phasenweisen Darstellung der Expression beider Gene zeigt die deutlich höhere (> Faktor 2) GCLM Expression. Darüber hinaus ist eine signifikante Abnahme der GCLM Genexpression während der wash-out Phase erkennbar und steht vermutlich mit der abnehmenden Saftwirkung zusammen. Mit Ausnahme der Wochen während der Saftintervention, ist die GCLM Expression aus der Kontrollprobe vergleichbar zu denen der run-in und wash-out Phase. Betrachtet man die GCLC und GCLM Expression bezüglich ihrer funktionellen Rolle in der Regulierung der Glutathionsynthese, so ist denkbar, dass in der Summe die Modulation dieser beiden Gene durch den Mehrfruchtsaft folglich auch in einem erhöhten GSH Spiegel resultiert. Interessanterweise konnten Spormann et al. in diesem Zusammenhang einen hochsignifikanten Anstieg des GSH-Spiegels während der Saftaufnahme beobachten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in der vorliegenden Studie und unterstreicht die protektive Wirksamkeit des Mehrfruchtsaftes.

Die **GPX1** Expression zeigt einen deutlichen Einfluss der Saftintervention mit einer ansteigenden Expression beginnend ab Woche 4 bis Woche 5 und dann wieder ab Woche 7 bis Woche 10. Letzterer Anstieg beruht wahrscheinlich auf einen nachhaltigen Effekt der Saftintervention, welche möglicherweise noch in den weiteren Wochen in einen anhaltenden Anstieg der antioxidativen Abwehr resultiert. Wie im einführenden Abschnitt erwähnt wurde ist die Expression und Aktivität der GPX1 sehr stark vom endogenen Selen Spiegel abhängig. Darüber hinaus ist bekannt, dass HD-Patienten aufgrund eines Selenmangelzustandes, einen deutlich geringere GPX1 Expression und Aktivität aufweisen, da Selen als Kofaktor für die GPX

dient. Es ist daher anzunehmen, dass die Intervention mit dem anthocyanreichen Mehrfruchtsaft offensichtlich eine Erhöhung der zellulären Abwehrmechanismen durch Induktion antioxidativer Gene, wie z. B. der GPX1 bewirkt. Gerade die GPX1 ist spezialisiert auf die Dekomposition von reaktiven Sauerstoffspezies und eine Induktion durch den Mehrfruchtsaft bietet möglicherweise eine protektive Wirksamkeit gegenüber weiteren oxidativen Schäden, denen HD-Patienten permanent ausgesetzt sind. Es ist vorstellbar, dass durch die Erhöhung der antioxidativen Abwehrmechanismen weitere pathologische Vorgänge unterdrückt, oder möglicherweise gar verhindert werden könnten. Die **GSR** Expression zeigt ebenfalls einen deutlichen Anstieg mit einem Maximum in der Woche 5. Im Vergleich zur GPX1 Expression zeigt sich auch hier wieder ein nachhaltiger Effekt in den Wochen der wash-out Phase, mit einer leichten Zunahme in der GSR Expression bis zur Woche 10. Möglicherweise spielt auch in diesem Fall eine anhaltende antioxidative Wirksamkeit über die Interventionsphase hinaus eine wichtige Rolle und stellt eine charakteristische Wirkung des Mehrfruchtsaftes dar. Vdeutlicht man sich die funktionelle Bedeutung der GSR, so wird klar, dass durch Reduktion oxidiertes GSH-Äquivalente, dessen Expression eine fundamentale Rolle in der antioxidativen Abwehr zukommt.

Die **COX-2** Expression ist ein klassischer Biomarker unter den inflammatorischen Genen und an der Entstehung verschiedener entzündlicher Prozesse beteiligt. Es ist bekannt, dass die COX-2 Expression bei Patienten mit Nierenerkrankungen deutlich erhöht ist (*Kramer 2001*). Während der Saftintervention konnte eine leichte Erniedrigung der COX-2 Expression beobachtet werden. Dies wird vor allem bei der Betrachtung der Mittelwerte in der phasenweisen Darstellung deutlich. Die starken Schwankungen in der COX-2 Genexpression unter den Patienten, resultieren in hohen Abweichungen innerhalb der wochenweisen Ergebnisse. Es zeigt sich, dass die COX-2 Expression sehr inhomogen verläuft und sogar im Trend während der Saftaufnahme zunimmt. Der Vergleich der Mittelwerte mit dem der Kontrolle deutet jedoch auf eine höhere COX-2 Expression in HD-Patienten hin, was sich mit der Beobachtung aus der Literatur deckt. Auch wenn die Hemmung der COX-2 Expression schwach ausgeprägt ist, ist eine entzündungshemmende Wirkung durch die Intervention mit dem Mehrfruchtsaft denkbar.

10. Gesamtdiskussion der Ergebnisse

Ein Einfluss der AEs (AE02, AE03) und Aglyka (Quercetin, Phloretin) auf die Transkription der γ -Glutamylcysteinylgase (GCL) in Caco-2 und HT29 Zellen wurde im Hinblick auf den beobachteten Anstieg des Glutathionspiegels untersucht (*Schäfer et al 2006*). In Caco2-Zellen wurde durch Quercetin die Transkription der katalytischen und der modulatorischen GCL-Untereinheit erhöht (GCLC < GCLM), nicht aber durch Phloretin und AE02. Nach Inkubation mit AE03 wurde ein leichter Anstieg der GCLM- (50 und 100 μ g/mL) und der GCLC-Transkription (100 μ g/mL) erhalten. In HT29-Zellen wurde durch Aglyka und AEs überwiegend die Transkription der GCLC erhöht. Die Ergebnisse zeigen Effekte der Apfelsaftextrakte/Aglyka auf die GCL-Transkription, die partiell mit der Modulation des tGSH-Spiegels korrelieren. Die Transkription von Nrf2 wurde in Caco2-Zellen durch Quercetin, Phloretin (beide 10 μ M) sowie durch AE02 (6h Inkubation) erhöht; in HT29-Zellen war nur nach 6h-Inkubation mit AE02 eine Transkriptionserhöhung nachweisbar. Ein Vergleich mit der γ -GCL-Transkription legt nahe, dass die untersuchten AEs/Aglyka den Nrf2/ARE-Signalweg nur begrenzt über die Transkription von Nrf2 modulieren. Hieraus folgt, dass auch andere regulative Transkriptionsfaktoren die antioxidative Genexpression beeinflussen können. Darüber hinaus zeigten sich deutliche Effekte der Inkubationszeit. Für die meisten untersuchten Testmaterialien wurde bereits eine Modulation nach 6h Inkubation beobachtet, die auch nach 24h deutlich war. Besonders responsive Gene allerdings, wie z.B. die GPX2, wurden bereits nach 3h Inkubation mit AEs oder phenolischen Inhaltsstoffen signifikant in ihrer Expression herunterreguliert.

Die Untersuchungen zur redoxsensitiven Genexpression zeigten charakteristische, zellspezifische Unterschiede in der Transkription der modulatorischen und katalytischen Untereinheiten der γ -GCL (Caco-2: GCLM > GCLC; HT-29: GCLC > GCLM), sowie in der Transkriptionswirkung der Referenzverbindungen (Sulforaphan: Caco-2 < HT-29; Menadion: Caco-2 > Ht-29). Durch Quercetin wurde die γ -GCL vor allem in Caco-2 Zellen erhöht (Faktor 2 zur Kontrolle), Phloretin dagegen war in beiden Zelllinien nahezu unwirksam. Durch den Apfelsaftinhaltsstoff Kaffeesäure wurden die γ -GCL Transkripte in HT-29 erhöht (GCLC um Faktor 3 zur Kontrolle), während Chlorogensäure keine Steigerung zur Folge hatte. Unter den geprüften Extrakten (AE02, AE03, AE05) waren AE05 und AE03 effektiv in der Induktion der γ -GCL Transkripte, dies korrelierte partiell mit der Modulation des tGSH-Spiegels. Die Transkription der GPX2 und GSR wurde in den Untersuchungen durch AE05, Bohnapfelextrakt, Chlorogensäure und Kaffeesäure in Caco-2 Zellen signifikant erniedrigt. Die Transkription des ARE-bindenden Transkriptionsfaktors Nrf2 wurde in Caco-2 Zellen durch Quercetin (10 μ M, 24h) signifikant und in vergleichbarer Stärke wie durch Menadion (10 μ M) erhöht. Dieser Effekt stimmt überein mit Beobachtungen in anderen Zelllinien. AE06 zeigte in Caco-2 Zellen eine deutliche Erniedrigung des zellulären ROS-Levels (*Bellion et al. 2009*) und der γ -GCL-Expression bereits bei niedrigen AE-Konzentrationen (0,3 – 3 μ g/mL) (*Siener, 2008*). Auch AE05 und Bohnapfelextrakt (BAE) verminderten unter diesen Bedingungen die Genexpression der γ -GCL, sowie der GSR und GPX2. Die Aktivität des antioxidativ wirksamen Enzyms GPX in HT-29 Zellen wurde durch alle untersuchten AEs konzentrationsabhängig erniedrigt; dies korreliert mit der verminderten GPX2-Expression des bereits untersuchten AE05 und BAE.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines polyphenolreichen Smoothies im Hinblick auf Bioverfügbarkeit und antioxidative Wirksamkeit im menschlichen Darm. Die hierzu durchgeführte Verzehrstudie mit Ileostoma-Patienten ermöglichte es, Saftinhaltsstoffe und Metabolite des Smoothies unmittelbar vor der Dickdarmpassage aus den Inhalten der Ileostomabeutel zu gewinnen und diese *in vitro* an der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 auf ihre antioxidative Wirksamkeit hin zu untersuchen. Die Inhalte der Ileostomabeutel wurden unmittelbar vor Saftaufnahme (Zeitpunkt $t = 0$), sowie 1h, 2h, 4h 6h und 8h nach Saftaufnahme gesammelt und für die *in-vitro* Untersuchungen (Polyphenol-Analytik und Wirkungsprüfung in der Zellkultur) bereit gestellt. Zur Prüfung der direkten antioxidativen Aktivität wurden die TEAC- und ORAC-Werte der Ileostoma-Beutelinhalte bestimmt. Die TEAC-Werte der Ileostoma-Proben stiegen nach Smoothie-Konsum an, erreichten nach 4 h bis 6 h ein Maximum und fielen danach wieder ab. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch bei den ORAC-Werten der Ileostoma-Proben erhalten, allerdings gab es hier stärkere individuelle Unterschiede. Gemittelt über alle Patienten erzielte die 4 h-Ileostoma-Probe sowohl den höchsten TEAC- als auch den maximalen ORAC-Wert. Dies hängt vermutlich mit der maximalen Konzentration an Procyanidinen in 4 h-Ileostoma-Proben zusammen (**Gerhauser, 2008**). Die TEAC-Werte der Ileostoma-Proben waren mit 0,1 bis 0,7 mM niedriger als die zugehörigen ORAC-Werte mit 0,01 bis 1,5 mM. Der verwendete Smoothie weist einen TEAC-Wert von 11,5 mM auf und übersteigt deutlich die der konventionellen Apfelsäfte (**Netzel et al. 2005**). Ein möglicher Einfluss der Ileostoma-Proben auf das Zellwachstum sowie die Viabilität der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nach 24 h Inkubation wurde untersucht. Hierbei zeigte keiner der untersuchten Ileostomabeutel-Inhalte einen signifikant wachstumshemmenden Effekt. Im untersuchten Konzentrationsbereich von 1-100 $\mu\text{g/ml}$ hatten die 4h-Ileostoma-Proben keinen Einfluss auf die Viabilität und waren somit nicht zytotoxisch im Hinblick auf die Membranintegrität. Der TBH-induzierten ROS Level der Zellen wurde nach 24 h Inkubation mit den 2h- und 4h- Ileostoma-Proben in der untersuchten Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ signifikant gesenkt. Vermutlich trägt die Chlorogensäure, die zu hohen Anteilen im verwendeten Smoothie enthalten ist zur beobachteten antioxidativen Wirksamkeit bei, da auch Schäfer et al. eine Reduktion des ROS-Levels in HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Chlorogensäure beobachten konnten. Es ist anzunehmen, dass die Wirksamkeit nicht nur auf die polyphenolischen Inhaltsstoffe der Ileostoma-Proben zurückzuführen ist. Kahle et al. stellten fest, dass das Maximum polyphenolischer Ausscheidungen in Ileostoma-Beuteln 2 h nach Intervention mit trüben Apfelsaft beobachtet werden konnte (**Kahle et al., 2005, 2006, 2007**). Durch 24 h Inkubation mit den 2 h-Ileostoma-Proben wurde keine Modulation des Gesamt-Glutathionspiegels festgestellt (**Pickard et al. 2009**). Kahle et al konnten des Weiteren zeigen, dass der Großteil polyphenolischer Verbindungen nach 2h in den Ileostomabeutel-Inhalten wiedergefunden werden konnte. Chlorogensäure war hierbei die prädominante Komponente in der Dünndarmpassage. Letztere Verbindung könnte zu einer Verminderung der Exposition durch genotoxische Verbindungen im Darmlumen beitragen und folglich eine DNA-Schädigung von Kolonzellen verringern (**Glei et al., 2006**). Dies könnte insofern von Bedeutung sein, da die

Chlorogensäure neben Procyanidin B2 einen polyphenolischen Hauptanteil im Smoothie bildet und somit auch höhere Mengen aufgenommen werden können. Veeriah et al. haben in diesem Zusammenhang in einer Studie den Fokus auf die Untersuchung der Genotoxizität von Faeceswasser gelegt, da z.B. in vielen humanen Interventionsstudien zur Untersuchung der Wirkung von Pro- und Prebiotika auf die Darmflora, auch Faeceswasser als Biomarker herangezogen wird (*Veeriah et al. 2008, Oberreuther-Moschner et al., 2004; Glei et al., 2005*). In einer Rattenstudie konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Darmtumoren in der Ratte und der Genotoxizität deren Faeceswasser in HT-29 Zellen festgestellt werden (*Klinder et al., 2004*). Allerdings weisen diese Studien eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität in der Faeceswasser Genotoxizität bei humanen Kolontumorzellen auf (*Osswald et al., 2000*). Dennoch kann eine Interventionsstudie signifikante Resultate erzielen, wenn die Individuen für die Untersuchungen auch ihre eigene Kontrolle darstellen (*Veeriah et al., 2008*). Barth et al. konnten in Kolonzellen von Ratten eine Reduktion von DNA-Schäden nach Intervention mit einem trüben Apfelsaft beobachten (*Barth et al., 2005*). Die Tatsache, dass Apfelsaft antioxidativ wirksame polyphenolische Inhaltsstoffe enthält, wirft die Frage auf, inwieweit dies mit der beobachteten Reduktion von DNA-Schäden zusammenhängt. Bisweilen ist bekannt, dass H₂O₂ im Darm gegenwärtig ist (*Babbs et al., 1992*). Die antigenotoxische Wirksamkeit von Ileostomabeutel-Inhalten nach Apfelsaftintervention ist möglicherweise auf die direkten antioxidative Aktivität der nach 2h erhaltenen polyphenolischen Verbindungen zurückzuführen. Insbesondere für die Chlorogensäure konnte eine antigenotoxische Wirkung in einem sogenannten Challenge Assay demonstriert werden (*Glei et al., 2006a*). Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass sowohl entzündliche Darmerkrankungen als auch Darmkrebs in Verbindung mit der erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies stehen (*Yang et al., 1997, 2002, 2008*), daher kommt der Prävention dieser Krankheiten durch eine obst- und gemüsereiche Ernährung besondere Bedeutung zu. Chrzczanowicz et al. konnten in einer humanen Interventionsstudie mit 12 gesunden Probanden bereits eine Stunde nach Verzehr von 1L trübem Apfelsaft eine erhöhte DPPH Radikal-abfangende Aktivität im Serum beobachten (*Chrzczanowicz et al. 2008*). In einer anderen Studie von Maffei et al., erhielten sechs männliche Probanden (Nichtraucher) ein Homogenat aus 600 g ungeschälten Äpfeln. Im Vergleich zu den 0h Lymphozyten-Proben, konnte drei Stunden nach Verzehr des Apfelhomogenats eine signifikante Hemmung der H₂O₂ induzierten Mikrokernbildung in den Lymphozyten festgestellt werden. Die Werte kehrten dabei allmählich ab 6h bis 24h nach Verzehr auf die ursprünglichen Basiswerte zurück (*Maffei et al. 2007*). In Übereinstimmung mit diesem Resultat berichten Briviba et al. dass 24h Stunden nach einmaligem Verzehr von je 1 kg Äpfeln (aus biologischem und konventionellem Anbau) durch 10 gesunde Probanden, keine Veränderung mehr in der antioxidativen Kapazität im Plasma, endogener DNA-Strangbrüche, sowie im Schutz vor H₂O₂ induzierten DNA-Schäden in Lymphozyten festgestellt werden konnten. Allerdings konnte ein geringerer Level an Endo-III sensitiven Stellen (spezifisch für oxidierte Pyrimidin-Basen) in der Lymphozyten DNA

beobachtet werden. Die Art der Apfelherstellung dagegen hatte keinen Einfluss auf den Polyphenolgehalt, sowie auf die gemessenen biologischen Endpunkte (*Briviba et al., 2007*). In einer größeren Follow-up Studie mit 168 gesunden Probanden erhielten die Teilnehmer einen Mischsaft aus Heidelbeer- und Apfelsaft (1 L täglich, entspricht Aufnahme von 97 mg Quercetin und 16 mg Ascorbinsäure). In dieser Folgestudie wurde u. a. der Effekt von 34 genetischen Polymorphismen auf DNA Schäden in Lymphozyten untersucht. Der Ausgang der Intervention wurde durch genetische Polymorphismen (NQO1*2; Cat1; GSTT1 Deletion, CYP1B1*5 und COMT1) signifikant beeinflusst (*Wilms et al. 2007*). In einer Crossover Studie mit Männern und Frauen konnten Hyson et al. nach sechswöchiger Intervention mit 375 ml Apfelsaft, bzw. 340 g Äpfeln, *ex-vivo* eine signifikante Verzögerung der Cu²⁺ vermittelten Low-Density Lipoprotein Oxidation um 20 % im Vergleich zum Basiswert beobachten. Äpfel und Apfelsaft führten zu einer reduzierten Bildung konjugierter Diene. Die Autoren schlussfolgern aus diesen Resultaten, dass moderater Apfelverzehr möglicherweise einen präventiven Beitrag zum Schutz vor koronaren Gefäßerkrankungen leistet, zumal Letztere Erkrankungen in einem engen Zusammenhang mit erhöhter LDL Oxidation im Plasma steht (*Hyson et al., 2000*). In der vorliegenden Studie konnte eine deutliche antioxidative Wirksamkeit der Ileostomabeutelinhalte nach Saftverzehr gezeigt werden (*Pickard et al. 2009*). In Verbund mit der analytischen Charakterisierung der Ileostomabeutelinhalte könnten aktivitätsgeleitete Strukturen identifiziert werden, deren Anteil im Smoothie durch einen optimierten Herstellungsprozess erhöht wird.

In einer weiteren Studie konnte nach Intervention mit polyphenolfreiem Kontrollsaft in Kolon und Leber von SD-Ratten eine Grundexpression der antioxidativen Gene beobachtet werden. Die relative GAPDH ratio lag im Kolon im Bereich von 2-0,7 und in der Leber im Bereich von 2,5 und 0,3. Durch Intervention mit AS wurde eine leichte aber signifikante Erhöhung der meisten Gene (GPX2, GSR, KAT, Nrf2; p<0,001) im Kolon festgestellt. In der Leber dagegen, konnte nur ein Anstieg der GPX1 und NQO1 mRNA beobachtet werden. Die Expression anderer Zielgene (SOD1, SOD2, GCLC/M, GSR) wurde in der Leber vermehrt runterreguliert oder blieb unverändert. Die Nrf2 Expression blieb unter diesen Bedingungen ebenfalls unverändert. Die Induktion redoxsensitiver Gene variierte in Abhängigkeit vom Safttyp (trüber AS > klarer AS ~ Smoothie). Die Ergebnisse weisen auf das Potenzial polyphenolreicher Apfelsäfte im Hinblick auf die Modulation antioxidativer Genexpression hin und unterstreichen deren gesundheitsfördernde Bedeutung für die Ernährung. Das antioxidative Potenzial variierte hierbei mit dem verarbeiteten Rohmaterial, sowie mit dem Herstellungsprozess, was schließlich in einer charakteristischen Polyphenolzusammensetzung resultierte. Obwohl der trübe, wie auch der klare AS aus dem gleichen Ausgangsmaterial hergestellt wurden und die Polyphenolzusammensetzung des Membranfiltrats nahezu identisch war, stellte sich der trübe AS als wirksamerer als der klare AS im Hinblick auf die Induktion der redoxsensitiven Genexpression heraus. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch Bestandteile der Trubfraktion im trüben AS für dessen höheres antioxidatives Potenzial verantwortlich sein könnten. Hinsichtlich der Zusammensetzung der Trubfraktion konnten Barth et al. zeigen, dass diese eine Partikelgröße von 1 bis 5 µM aufweist und hauptsächlich aus Lipiden (49 %) und

Proteinen (24 %), sowie nicht identifizierten Polyphenolen (18 %) und Zellwandpolysacchariden (7,4 %) zusammengesetzt ist (*Barth et al. 2007*). Daneben können Ballaststoffe aus Äpfeln durch die intestinale Mikroflora fermentiert werden, wobei kurzkettige Fettsäuren (hauptsächlich Butyrat) gebildet werden. Butyrat kann wiederum eine Erhöhung der antioxidativen Genexpression bewirken, wie anhand der Glutathion-S-Transferase in humanen Tumorzelllinien gezeigt werden konnte (*Ebert et al. 2003; Pool-Zobel et al., 2005; Waldecker et al., 2008*). In einer Interventionsstudie mit Ratten, waren jedoch weder die isolierten Polyphenole, noch die heterogen zusammengesetzte Trubfraktion präventiv wirksam (*Barth et al. 2007*). Die Autoren schlossen hieraus, dass Trubkolloide im Saft eine wichtige Rolle spielen. Es wird vermutet, dass die Trubkolloide die Eigenschaft besitzen Procyanidine zu inkludieren und somit ihre vorzeitige Absorption verhindern, wodurch sie im Kolon verfügbar und wirksam sein können (*Barth et al. 2007*). Hinsichtlich des Smoothies das in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde, ist nicht geklärt, welche Inhaltsstoffe für die verringerte Induktion der Genexpression in der Leber verantwortlich sein könnten. Die im Vergleich zum trüben AS geringeren Konzentrationen bestimmter Polyphenole (Procyanidin B2, C1; Coumaroyl-Chinasäuren), könnten möglicherweise eine Ursache für die geringere zelluläre antioxidative Wirksamkeit darstellen. Dagegen resultierte der Zusatz von Apfelpüree in einer Steigerung des Anteils fester zentrifugierbarer Bestandteile von 0,1 auf 8 – 15 % (*Barth et al. 2007*). Letztere wiederum sind möglicherweise in der Lage polyphenolische Inhaltsstoffe kovalent zu binden, wodurch ihre Freisetzung im Gastrointestinaltrakt verhindert wird. Die aus der vorliegenden Interventionsstudie an Ratten gewonnenen Ergebnisse, weisen jedoch auf eine Erhöhung der antioxidativen Abwehr durch polyphenolische Apfelsäfte hin. Die Induktion der redoxsensitiven Genexpression variierte hierbei in ihrer Stärke je nach Zielgewebe (Kolon > Leber) und Art des Saftes (trüber > klarer ~ Smoothie).

Ein Einfluss polyphenolischer Inhaltsstoffe auf die antioxidative Enzymexpression konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. In oxidativ gestressten Chang-Leberzellen z.B., wurde nach Inkubation mit den Flavonoiden Quercetin und Apigenin (25 und 50 µM) eine erhöhte SOD und GPX Expression beobachtet. Eine 23 stündige Vorinkubation der humanen Leberhepatomzelllinie HepG2 mit einem Procyanidinextrakt (15 mg/L) aus Traubenkernen bewirkte ebenfalls einen Anstieg der GPX, sowie der GSR mRNA Expression nach einstündiger Inkubation mit 1 mM H₂O₂ (*Puiggros et al. 2005*). Wurden glatte Aortamuskelzellen mit Resveratrol behandelt, so zeigten diese ebenfalls eine signifikante Induktion der Katalase, GST, NQO1 und SOD mRNA (*Li et al. 2006*). Die Untersuchung antioxidativer Enzymaktivitäten und Expression ist auch Gegenstand in Interventionsstudien mit polyphenolreichen Extrakten bzw. Lebensmitteln bei Tiermodellen (*Oliveras-Lopez et al., 2008*). In einer zehnwöchigen Interventionsstudie mit Ratten konnte nach Gabe von Rotwein, Alkohol, oder einem alkoholfreien Rotwein ein signifikanter Anstieg der renalen Katalase und GPX Aktivität in der Rotwein- bzw Alkohol-Gruppe beobachtet werden. Die SOD Aktivität dagegen wurde nicht verändert (*Rodrigo et al. 2002*). In einer weiteren Studie mit Ratten, bei denen ein akutes Nierenversagen induziert wurde, konnte nach Intervention mit Rotwein ein erhöhter Anstieg der renalen GPX, KAT und SOD Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wasser) beobachtet werden. Die Resultate zeigen eine Abmilderung von oxidativem Stress durch Rotwein-

Intervention (**Rodrigo et al., 2004**). Der Einfluss von Polyphenolen auf die Genexpression ist für *in-vitro* als auch *in-vivo* Modelle beschrieben (**Jeon et al. 2002; Oliveras-Lopez et al. 2008**). Ein Vergleich der Ergebnisse miteinander ist jedoch nur begrenzt möglich, da *in-vitro* oft höhere Konzentrationen eingesetzt werden. In HepG2 Zellen bewirkte eine Inkubation mit 100 µg/ml Panaxadiol Ginsenosiden (einem Extrakt aus der Ginseng-Wurzel) die Aktivierung der SOD und KAT Genexpression (**Chang et al. 1999**). Eine erhöhte SOD Expression wurde ebenfalls in H₂O₂ gestressten humanen K562-Zellen beobachtet, die zuvor mit einem Extrakt aus Kreuzdorn (*Rhamnus alaternus*) vorinkubiert wurden. Der Extrakt selbst wurde zuvor auf den Gehalt an Flavonoiden und Tanninen untersucht (**Ammar et al. 2007**). In einer Fütterungsstudie an Kaninchen erhielten die Tiere eine hoch-cholesterinreiche Diät mit oder ohne Zusatz von Probuocol. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den Probuocol behandelten Tieren eine signifikant erhöhte SOD mRNA Expression gezeigt werden. Die KAT Expression blieb dagegen unverändert und es konnte des Weiteren kein Unterschied in der GPX Expression in beiden Gruppen festgestellt werden (**Jeon et al. 2002**). Die Resultate sind in Übereinstimmung mit der beobachteten Zunahme in der SOD Genexpression nach chronischer Aufnahme von Polyphenolen aus Wein (**Fernandez-Pachon et al., 2009**). Allerdings wird die Expression redoxsensitiver Gene sehr unterschiedlich in den einzelnen Geweben reguliert, was auch im Hinblick auf die dargestellten Ergebnisse eine generelle Aussage erschwert. Tendenziell zeigt sich jedoch in der GPX, KAT, GSR und Nrf2 Genexpression im Kolon eine höhere Response auf die Apfelsaftintervention. Ergebnisse aus *in-vitro* Studien zeigen aber auch, dass polyphenolische Inhaltsstoffe die antioxidative Enzym- und Genexpression nicht nur induzieren, sondern auch herunterregulieren können. Dies konnte z. B. für Quercetin beobachtet werden, welches *in-vitro* eine Abnahme der GPX-, und SOD- mRNA Expression bewirkt (**Röhrdanz et al. 2003**). Eine Erklärung ist möglicherweise, dass durch die direkte antioxidative Wirksamkeit polyphenolischer Inhaltsstoffe ROS bereits *in-situ* abgefangen werden und die endogene Redoxbilanz damit nicht außer Balance gerät, so daß die Gen- bzw. Proteinexpression eher runterreguliert wird. Dies könnte möglicherweise die beobachtete Abnahme in der γ -GCL Genexpression nach Apfelsaftintervention erklären.

Es ist darüber hinaus durchaus denkbar, dass phenolische Verbindungen eine direkte molekulare Wechselwirkung mit Enzymen bzw. Transkriptionsfaktoren eingehen und somit unmittelbar deren Aktivierung bzw. Hemmung regulieren (**Moskaug et al. 2004**). Wird bereits durch diese und andere endogene Mechanismen die ROS-Bildung unterdrückt, liegt die Annahme nahe dass die Zelle keine weitere antioxidative Abwehrkaskaden aktivieren muss und damit ihre enzymatische Batterie herunterreguliert. Es ist unlängst bekannt, dass Polyphenole ihre antioxidative Wirksamkeit über multiple Mechanismen entfalten. In dieser Arbeit wurde ein besonderer Fokus auf die Untersuchung der redoxsensitiven Genexpression gelegt. Die transkriptionelle Steuerung antioxidativer Enzyme stellt eine wichtige Stufe in der Aktivierung zellulärer Abwehrmechanismen dar. Noch bevor das zelluläre Redoxgleichgewicht außer Kontrolle gerät, werden funktionelle Gene aktiviert und codiert, deren Proteine einer oxidativen Dysbalance entgegenwirken. Dies erfolgt in der Regel durch eine gleichzeitige Induktion mehrerer antioxidativer Gene, deren Expression primär durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 orchestriert wird. Für die Zelle bedeutet dies eine schnelle Reaktion auf oxidativen Stress und

stellt eine lebenswichtige Maßnahme dar. Polyphenolische Verbindungen sind in der Lage diese protektiven Mechanismen wirksam zu modulieren. Inwieweit sich dies gesundheitsfördernd auf die Zelle, bzw. den Organismus auswirkt, hängt natürlich von der Konzentration, Absorption und Verteilung im Organismus ab, abgesehen von strukturellen und chemischen Eigenschaften. Obwohl die Bioverfügbarkeit für einige Polyphenole ausreichend charakterisiert ist, sind detrimetale Effekte nicht ausgeschlossen. Letztere werden oft beim Einsatz hoher Konzentrationen *in-vitro* beobachtet und können zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. Es ist bekannt, dass bestimmte polyphenolische Verbindungen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in Zellkulturmedien Wasserstoffperoxid generieren und in der Konsequenz *in-situ* bestimmte Signalkaskaden aktiviert werden (**Lapidot et al. 2002**). Inwieweit dieser Umstand jedoch eine Relevanz für die *in-vivo* Situation hat bleibt noch zu ergründen. Es ist aber davon auszugehen, dass in Zellkultur generierte Artefakte nur bedingt auf die komplexe *in-vivo* Situation übertragbar sind. Die Tatsache, dass polyphenolische Inhaltsstoffe bereits in sehr geringen Konzentrationen antioxidative Effekte zeigen und höhere Dosen dagegen oftmals cytotoxisch wirken, lässt auch auf eine hormetische Wirkung schließen. Die dabei beobachteten biologischen Effekte verlaufen aufgrund der unterschiedlichen Dosen oftmals detrimetale, so dass eine sogenannte „adaptive Response“ der Zellen nur in einem engen Konzentrationsfenster beobachtet wird (**Anderson 2005; Calabrese et al. 2008**). Das Phänomen der Hormesis ist z. B. für Vitamine sehr gut beschrieben, die ihr Wirkoptimum in einem ganz spezifischen Konzentrationsbereich entfalten und in höheren Dosen sogar toxisch wirken (**Penniston et al. 2006**). Es liegt die Vermutung nahe, dass auch polyphenolische Lebensmittelinhaltsstoffe einen optimalen Wirkungsbereich haben, in der eine stimulierende bzw. gesundheitsfördernde Wirkung erwartet werden kann. Dies schließt jedoch nicht aus, dass auch moderater oxidativer Stress eine adaptive Response der Zellen bzw. des Organismus auslöst, was in einer kontinuierlich intrinsischen Abwehr gegenüber erhöhtem ROS-Level resultiert (**Röhrdanz et al. 2003**). Moderater oxidativer Stress löst möglicherweise molekulare Signalkaskaden aus, die protektive Mechanismen aktivieren und somit auch einen Schutz gegenüber weiteren Stressfaktoren darstellen (**Mattson et al. 2006**). Es liegt jedoch auf der Hand, dass der Verzehr isolierter polyphenolischer Einzelstoffe, wie sie in konzentrierter Form in einigen Supplementen und Nahrungsergänzungsmitteln angepriesen werden, durchaus die Gefahr adverser Effekte auf die Gesundheit bergen. Denn solange die Dosis-Wirkung bestimmter isolierter Einzelstoffe für den Menschen nicht gründlich untersucht ist, stellen Nahrungsergänzungsmittel und isolierte Produkte bei Überdosierung durchaus ein potentiell Gesundheitsrisiko für bestimmte Verbrauchergruppen (ältere oder kranke Menschen, Kinder, Schwangere) dar. Darüber hinaus ist der gesundheitsfördernde Nutzen solcher Produkte bei einem bereits stabilen Gesundheitszustand fragwürdig. Daher richtet sich eine gesundheitsfördernde Ernährung immer an die Empfehlung natürliche Lebensmittel wie Obst und Gemüse auf dem täglichen Speiseplan zu berücksichtigen.

In der humanen Interventionsstudie mit Hämodialyse (HD)-Patienten wurde das antioxidative Potenzial eines flavonoid-/polyphenolreichen Mehrfruchtsaftes untersucht (**Spormann et al. 2008**). Hierbei konnte in Proben (periphere mononukleare Zellen des Blutes; PBMCs) aus dieser Studie ein deutlicher Anstieg der antioxidativen Genexpression (GPX1, GSR und GCLM)

während der Saftinterventionsphase (Wochen 4 bis 7) beobachtet werden. Die Expression des inflammatorischen COX-2 Gens wurde dagegen deutlich erniedrigt, was die antioxidative Wirksamkeit des Mehrfruchtsaftes unterstreicht. Im Vergleich zu handelsüblichen Mehrfrucht- bzw. Buntsäften weist der Studiensaft mit 32,1 mmol/L eine sehr hohe TEAC Aktivität auf. Dies ist auf die besondere Zusammensetzung an polyphenolischen Saftinhaltsstoffen zurückzuführen, da für die Safterstellung ausschließlich rote Trauben und Beerensorten verwendet wurden. Ein weiterer Aspekt ist das Herstellungsverfahren, bei der durch Enzymbehandlung eine effektive Enstaffung der Maische erreicht werden konnte. Auffallend ist weiterhin der besonders hohe Gesamtphenol- und Ascorbinsäuregehalt des Mehrfruchtsaftes, denn beide Parameter werden maßgeblich von der Auswahl und der Sorte der verarbeiteten Trauben/ Beeren beeinflusst. So weisen dunkle Beeren besonders hohe Polyphenol- und Ascorbinsäuregehalte auf. Betrachtet man die Anthocyangehalte, so fällt schnell auf, dass insbesondere hohe Mengen an Cyanidin-3-sambubiosid und Malvidin-3-glucosid vorliegen. Der Anthocyangehalt trägt mit bis zu 12 % zum Gesamtphenolgehalt bei und lässt vermuten, dass noch weitere nicht identifizierte polyphenolischen Inhaltsstoffe einen erheblichen Anteil haben. Die Summe der Cyanidin-3-glucoside macht mit 151,4 mg/L ungefähr die Hälfte des gesamten Anthocyangehaltes (301 mg/L) aus, gefolgt von dem Gehalt an Malvidin-3-glucosid mit 65,8 mg/L und Delphinidin-3-glycosiden (44,3 mg/L). Dabei wird insbesondere Cyanidin-3-glycosiden eine Vielzahl antioxidativer und präventiver Wirkmechanismen zugesprochen und in der Summe lässt der vergleichsweise hohe Anthocyangehalt auf eine starke antioxidative Wirksamkeit schließen.

HD-Patienten die unter chronischem Nierenversagen leiden, sind aufgrund der Erkrankung, bzw. durch die Hämodialyse-Prozedur (extrakorporaler Kreislauf) selbst, erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt. Die ROS Bildung wird darüber hinaus noch durch urämische Toxine, Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten, Inkompatibilität/ Reaktion mit der Dialysemembran (Aktivierung der NADPH Oxidase), unsteriles Dialysat, sowie durch Eisenmedikamente begünstigt (*Markert et al. 1988; Müller et al. 2004*). HD-Patienten weisen darüber hinaus eine verringerte Kapazität zur antioxidative Abwehr auf, was sich in einem chronischen Vitamin C-, E- und Selen-Mangel manifestiert. Das Ausmaß an oxidativem Stress erhöht sich zudem durch einen Mangel an enzymatischen antioxidativen Abwehrmechanismen und resultiert in DNA- und Zellschäden, sowie Apoptose, Nekrose und einer höheren Suszeptibilität für infektiöse Krankheiten und Krebs (*Nordberg et al. 2001*). Desweiteren wird eine geringe Glutathionperoxidase-Aktivität beobachtet, was unmittelbar mit einer geringen Selenkonzentration in Erythrozyten und Plasma von HD-Patienten zusammenhängt (*D'Haese, 1996*). Ein weiterer Aspekt der hier mit Sicherheit zu tragen kommt ist die Tatsache, dass Patienten die an akutem und chronischem Nierenversagen leiden, häufig malnutrisiert sind. Die Fehlernährung hängt hierbei hauptsächlich mit dem gestörten Stoffwechsel zusammen und wird vom Verlust von Nährstoffen im Dialysat mitbestimmt (*Horl, 1999*). Ein vielversprechender Präventions- und Therapieansatz für Patienten die an chronischer Niereninsuffizienz und ROS-assoziierten Krankheiten leiden, bietet möglicherweise der Konsum von antioxidativ wirksamen Frucht- und Buntsäften. Die Aufnahme antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe aus Säften könnte eine Alternative zur chronischen Anwendung hochdosierter Supplemente darstellen. Gerade rote Fruchtsäfte mit besonders hoher antioxidativer Kapazität wie schwarzer Johannisbeersaft,

Holundersaft, Brombeersaft (*Pour Nikfardjam, 2000*) zeichnen sich durch hohe Anthocyangehalte aus (*Mazza, 1993*) und zeigen antioxidative, antiinflammatorische, sowie chemopräventive Eigenschaften, schützen vor Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen (*Yoon et al. 2007; Weisel et al. 2006*). Die Bioverfügbarkeit der Anthocyane ist allerdings relativ gering und der genaue Metabolismus noch nicht vollständig aufgeklärt, daher sind weitere in-vitro und in-vivo Untersuchungen für eine aussagekräftige Beurteilung der gesundheitsfördernden Relevanz dieser Verbindungen erforderlich (*Manach et al., 2005*).

Äpfel enthalten bioaktive Inhaltsstoffe, die eine präventive Wirksamkeit gegenüber Darmkrebs entfalten. Dies erfolgt möglicherweise durch direkten Einfluss auf zelluläre Parameter in Kolonozyten oder Kolonzelllinien. Allerdings sind die phenolischen Inhaltsstoffe, denen diese gesundheitsfördernden Effekte zugesprochen werden können, bislang noch nicht vollständig identifiziert. Obwohl potentielle Kandidaten (wie z.B. Dihydrochalkone, Procyanidine und Catechine) erfolgreich charakterisiert werden konnten, verdeutlichen in-vivo Studien ganz klar das bedingte Wirkpotenzial einzelner Inhaltsstoffe bzw. Subfraktionen aus Apfelsäften. Vielmehr scheint gerade die komplexe Mischung aus unterschiedlichen Inhaltsstoffen und Komponenten in ihrer Summe eine höhere antioxidative Wirksamkeit entfalten zu können (*Barth et al. 2005; Barth et al. 2007*). In vielen Studien wird daher vermehrt auf die besonders gesundheitsfördernde Wirkung durch den Verzehr der ganzen Apfelfrucht hingewiesen.

Die zellulären Vorgänge die der antioxidativen Wirksamkeit von polyphenolischen Apfelinhaltsstoffen zugrunde liegen, sind jedoch bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Tatsache, dass Polyphenole eine direkt radikalabfangende Wirkung entfalten können, setzt natürlich voraus, dass die Inhaltsstoffe/ Metabolite direkt am ROS Bildungsort gegenwärtig sind. Diese Möglichkeit ist jedoch aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit und schnellen Transformation in Glukuronide, sowie methylierte und sulfatierte Derivate bedingt gegeben (*Manach et al., 2005*). Ein weiterer Aspekt ist, dass die antioxidativ wirksamen Bestandteile nicht in der gleichen Form in den Zellen wirken, wie sie ursprünglich in der Apfelfrucht vorzufinden sind. Vielmehr ist davon auszugehen, dass das antioxidative Potenzial vor allem durch aktive Zwischenstufen, sowie endogene Metabolite freigesetzt wird. Darüber hinaus können endogen antioxidativ wirksame Enzyme schon vorher auf ROS reagieren und diese effizient abbauen.

Die Untersuchung zum Einfluss von Polyphenolen auf die antioxidative Enzym- und Genexpression gewinnt daher immer mehr Aufmerksamkeit. Wenn eine Erhöhung der antioxidativen Protein-/ Genexpression zu einer verbesserten Abwehr führt, so ist damit ein höherer Schutz des Organismus vor oxidativen Zellschäden zu erwarten. In welchem Ausmaß allerdings das präventive Potenzial polyphenolischer Inhaltsstoffe im menschlichen Organismus zur Wirkung kommt, hängt von zahlreichen physiologischen, metabolischen und genetischen Faktoren ab. In dieser Arbeit lag das Augenmerk vor allem in der Untersuchung der gesundheitsfördernden Wirkung von Apfelpolyphenolen. Die Tatsache, dass eine inverse Korrelation zwischen einer obst- und gemüsereichen Ernährung und dem Risiko an Darmkrebs zu erkranken mittlerweile als erwiesen gilt, lässt auf die Entwicklung gezielter Ansätze und Strategien zur Prävention von Krebserkrankungen durch eine gesundheitsfördernde Ernährung hoffen. Hierzu könnten die aus den zahlreichen Interventionsstudien gewonnenen Resultate

einen Beitrag zur Erkenntnis leisten, mit dem Ziel Menschen die Bedeutung des präventiven Potenzials einer obst- und gemüsereichen Ernährung noch besser zu verdeutlichen. Gerade Äpfel und Apfelprodukte (Apfelsaft, Apfelmark/ Püree, Apfel-Trockenfrucht, usw.) stellen eine ideale Quelle für die Ernährungsforschung dar. Äpfel und Apfelprodukte sind in unserer Gesellschaft bei jung und alt als Nahrungsmittel sehr populär. Aufgrund der Vielfalt der Sorten, ihrer besonderen Reichhaltigkeit an Nährstoffen, Vitaminen, Mineralstoffen und polyphenolischen Inhaltsstoffen machen den Apfel in dieser komplexen Kombination zu einer einzigartigen und unvergleichbar wohlschmeckenden Frucht. So hat eine alte englische Redewendung aus dem 19. Jahrhundert bis heute nicht an Bedeutung und Wahrheit verloren, wenn sie meint „An apple a day, keeps the doctor away“. Es muss jedoch in diesem Zusammenhang die Frage erlaubt sein, welcher Apfel „der Richtige“ ist, bzw. für welche Erkrankungen ein Präventionspotenzial möglich ist. Denn heute ist vielmehr klar, dass nicht jeder Apfel gleich ist und insbesondere der Verzehr alter Mostapfelsorten empfohlen wird, da gerade diese Sorten sich durch relativ hohe Polyphenolgehalte auszeichnen und eine hohe antioxidative Wirksamkeit aufweisen.

Bei der Frage nach dem entsprechenden Arzt erscheint es immer deutlicher, dass der regelmäßige Verzehr von Äpfeln und Apfelprodukten sich positiv auf die Darmgesundheit auswirkt und damit möglicherweise der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie Dickdarmkrebs präventiv entgegenwirkt. Dennoch beschränkt sich das präventive Potenzial nicht nur auf den Darm, sondern erstreckt sich über den gesamten Organismus und entfaltet sich auch im unterschiedlichen Ausmaß in den umliegenden Organen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich beim Apfel um ein natürliches Lebensmittel handelt, dessen gesundheitsfördernde Wirkung sich in erster Linie durch den besonderen Gehalt und die Zusammensetzung an wirksamen Inhaltsstoffen auszeichnet.

Das durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (**BMBF**) geförderte *nationale Forschungsnetzwerk „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten der Prävention durch die Ernährung“*, hat sich der Aufklärung der Wirkung von Apfelsaft-Inhaltsstoffen in der Prävention von Darmkrankheiten verschrieben und verfolgt das Ziel, eine optimale medizinische Versorgung der Bevölkerung sicherzustellen. Das gemeinsame Netzwerkprojekt hat in diesem Sinne eine Pionierleistung auf dem Gebiet der Ernährungsforschung erbracht, indem sie sich der schwierigen Herausforderung und Aufgabe angenommen hat, ein so komplexes Lebensmittel wie den Apfel auf „Herz und Nieren“ zu untersuchen und dessen antioxidatives Potenzial in jeglicher Form zu charakterisieren. Die im Rahmen dieses Netzwerkes erhaltenen Ergebnisse unterstreichen die Relevanz einer gesundheitsfördernden Ernährung für die Bevölkerung durch den Verzehr bzw. Konsum von Äpfeln und Apfelsäften. Die hierbei gewonnen wertvollen Erkenntnisse könnten in Zukunft bei der Herstellung besonders antioxidativ wirksamer Apfelsaftprodukte berücksichtigt werden.

11. Zusammenfassung

Die *in-vitro* Arbeiten an den Kolontumorzelllinien verfolgten das Ziel, die antioxidative Wirksamkeit verschiedener Apfelsaftextrakte zu charakterisieren. Hierbei wurde der Einfluss der Aglyka Quercetin und Phloretin, der Inhaltsstoffe Chlorogensäure und Kaffeesäure, sowie der Apfelsaftextrakte AE02 /03 und AE05 auf die Transkription redoxsensitiver Zielgene in HT-29 und Caco-2 Zellen nach 6- und 24h-Inkubation mittels Real Time TaqMan PCR untersucht. Als Referenzverbindungen wurden Sulforaphan und Menadion eingesetzt. Die für den Glutathion-Redoxstatus relevanten ARE-abhängigen Gene GPX2 und GSR, sowie die Nrf2 Genexpression wurden in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Ergebnisse zeigen u.a. charakteristische, zellspezifische Unterschiede in der Modulation der antioxidativen Genexpression, bei der sich die HT-29 Zellen vor allem im Hinblick auf die gewählte Inkubationszeit und Konzentration der untersuchten Testmaterialien als sensitiver erwiesen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines polyphenolreichen Smoothies im Hinblick auf Bioverfügbarkeit und antioxidative Wirksamkeit im menschlichen Darm. Die Interventionsstudie mit Ileostoma-Patienten ermöglichte es, Saftinhaltsstoffe und Metabolite eines Smoothies der Apfelsorte Winesap unmittelbar vor der Dickdarmpassage aus den Inhalten der Ileostomabeutel zu gewinnen und *in-vitro* auf antioxidative Wirksamkeit hin zu überprüfen. Hierbei konnten sowohl zellfrei (TEAC und ORAC Assay) als auch mit der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 ein antioxidatives Potenzial der Ileostoma-Beutelinhalte nachgewiesen werden. Die TEAC- und ORAC-Werte der Ileostoma-Proben zeigten einen deutlichen Anstieg mit einem Maximum bei 4h nach Saftverzehr. Im Vergleich zu den 0h-Ileostomabeutel-Inhalten bewirkten die 2h- und 4h-Ileostoma-Beutelinhalte eine signifikante Reduktion des TBH-induzierten ROS-Levels (DCF-Assay) nach 24h Inkubation in HT29-Zellen. Die Identifizierung als auch die quantitative Erfassung der in den Ileostoma-Proben enthaltenen polyphenolischen Inhaltsstoffe, sowie deren Abbauprodukte ist Gegenstand laufender Untersuchungen in der AG von Prof. Richling und könnte Hinweise auf aktivitätsgeleitete Strukturen einzelner polyphenolischer Verbindungen geben.

In einer Interventionsstudie an Ratten wurde der Einfluss unterschiedlich hergestellter Apfelsäfte (klarer/ trüber AS, Smoothie, im Vergleich zu einem polyphenolfreien Kontrollsaft) auf die Modulation ARE abhängiger Genexpression in Kolon und Leber männlicher SD-Ratten mittels duplex RT-PCR untersucht. Die aus der vorliegenden Interventionsstudie an Ratten gewonnenen Ergebnisse, weisen auf eine Erhöhung der antioxidativen Abwehr durch polyphenolische Apfelsäfte hin. Die Induktion der redoxsensitiven Genexpression variierte hierbei in ihrer Stärke je nach Zielgewebe (Kolon > Leber) und Art des Saftes (trüber > klarer ~ Smoothie).

Ergänzend zu den von Spormann et al. untersuchten Biomarkern wurden Genexpressionsuntersuchungen aus PBMCs von Hämodialyse-Patienten mittels Real Time TaqMan PCR durchgeführt. Hierbei wurde neben der Expression ausgewählter glutathionbezogener Gene (γ -GCL, GPX1, GSR) auch die Nrf2 Transkription, sowie die Genexpression des inflammatorischen Enzyms COX-2 erfasst. Im Vergleich zur Woche 1 der run-in Phase zeigt sich nach Intervention mit rotem Mehrfruchtsaft ein deutlicher Anstieg der mRNA Expression in den meisten antioxidativen Zielgenen, die COX-2 Genexpression wurde dagegen während der Saftaufnahme leicht herunterreguliert.

12. Materialien und Methoden

12.1 Geräte:

Achtkanalpipette	Abimed
Analysenwaage („CP224 S“)	Sartorius
Autoklav („Varioklav [®] Dampfsterilisatoren“)	H+P Labortechnik GmbH
Biofreezer („Herafreeze“)	Heraeus
Brutschrank („BBD 6220“) Heraeus	
Brutschrank („Cytoperm“)	Heraeus
Bunsenbrenner („Fireboy Plus“)	Integra Biosciences
Eismaschine	Wessamat
Gefriertrocknungsanlage („Alpha“)	Christ
Glaspipetten 5, 10 ml („Silberbrand“)	Brand
Kaffee-Mühle	
Licht-Mikroskop	Zeiss
Multipette	Abimed, Eppendorf
Multiplattenphotometer („MWGt Sirius HT Injektor“)	Biotek
Multiplattenphotometer („Synergie-2“)	Biotek
Multiplattenphotometer Software („Gen5“)	Biotek
Neubauerzählkammer („Neubauer“)	Marienfeld
Neubauerzählkammer („Neubauer-improved“)	Marienfeld
Pipette 1000µl („Discovery Comfort“)	Abimed
200µl („Discovery Comfort“)	Abimed
100µl („Discovery Comfort“)	Abimed
20µl („Discovery Comfort“)	Abimed
10µl („Discovery Comfort“)	Abimed
Pipette 1000µl („Pipetman“)	Gilson
200µl („Pipetman“)	Gilson
100µl („Pipetman“)	Gilson
20µl („Pipetman“)	Gilson
10µl („Pipetman“)	Gilson
Pipettierhilfe („Pipetus–Akku“)	Hirschmann [®] Laborgeräte
Pipettierhilfe („SwiftPet“) Abimed	
Real Time PCR-System („7900HT“)	Applied Biosystems
Real Time PCR-System Software („SDS version 2.1“)	Applied Biosystems
Rotlichtlampe	Osram
UV/VIS Spektralphotometer („Nanodrop ND1000“)	PeqLab
Sterile Werkbank („Hera Safe H 12“)	Heraeus Instruments
Sterile Werkbank („LaminAir HLB 2472 BS“)	Heraeus Instruments
Stoppuhr („Oregon Scientific, Nr. TR 118“)	Roth
Thermal Cycler („Cyclogene“)	Techne
Thermal Cycler („MJ Research PTC 100“)	Biorad
Vakuumpumpe („RD8“)	Vacuubrand
Vortexer („MS1 Minishaker“)	IKA
Vortexer („Vortex Genie 2“)	Bender und Hobein AG
Wasserbad („SW-20C“) Julabo	
Wasserschüttelbad („SW-20C“)	Julabo
Zentrifuge („Biofuge A“)	Heraeus
Zentrifuge („Biofuge fresco“)	Heraeus
Zentrifuge („Centrifuge 5804 R“)	Eppendorf

12.2 Verbrauchsmaterialien:

96-Lochplatte, durchsichtig („ELISA“)	Greiner BIO-ONE GmbH
96-Lochplatte, schwarz, steril („CellBind [®] “)	Corning
96-Lochplatte, schwarz („FluoroNunc“)	Nunc
Adapter Multipette, 5 ml („Ritips [®] “)	Ritter
Einmal-Kanülen, stumpf, steril („Sterican“)	B. Braun
Einmalkanülen, spitz, steril („Sterican“)	B. Braun
Glasflaschen, braun	VWR
Handschuhe („Gentle Skin“)	Meditrade
Optische 96-Well Reaktionsplatte („MicroAmp [®] “)	Applied Biosystems
Pasteurpipetten	Roth
PCR-Tubes, ultradünn, 0,5 ml	Biozym
Petrischalen, steril, 60 mm („Cellstar [®] “)	Greiner BIO-ONE GmbH
Petrischalen, steril, 94 mm („Cellstar [®] “)	Greiner BIO-ONE GmbH
Pipettenspitzen mit Filter 1000µl	Sarstedt
200µl	Sarstedt
Pipettenspitzen ohne Filter 1000µl	Greiner BIO-ONE GmbH
200µl	Greiner BIO-ONE GmbH
10µl	Greiner BIO-ONE GmbH
PP-Röhrchen, 15 ml („Cellstar [®] “)	Greiner BIO-ONE GmbH
PP-Röhrchen, 50 ml („Cellstar [®] “)	Greiner BIO-ONE GmbH
Reagiergefäß, braun 1,5 ml („Plastibrand“)	Sarstedt
Reaktionsgefäß (Eppendorf) 1 ml	Greiner BIO-ONE GmbH
1,5 ml	Greiner BIO-ONE GmbH
2 ml	Greiner BIO-ONE GmbH
Rührspatel	Roth
Spritze, 1 ml, 0,9×40 mm („Omnifix-F“)	B. Braun
Sterilfilter, 13 mm, 0,2 µm Membran („Acrodis“)	Pall Cooperation
Versiegelungsfolie („MicroAmp [®] “)	Applied Biosystems
Zellkulturflasche, mit Filter, steril, 250 ml	Greiner BIO-ONE GmbH
mit Filter, steril, 550 ml	Greiner BIO-ONE GmbH
Zellschaber, steril	Greiner BIO-ONE GmbH

12.3 Reagenzien und Medien:

AAPH (α, α' -Azodiisobutyramidine dihydrochlorid)	Sigma
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS)	Sigma
DEPC Wasser	Gibco/Invitrogen
2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat	Fluka
DMSO	Fluka
DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure))	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol, p.A.	Roth
Fluorescein-Natrium	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco/Invitrogen
GPx2-Sonde (NM_0xxx ergänzen!)	Applied Biosystems
GSH (Glutathion)	Sigma
GSR (Glutathion-Reduktase)	Sigma
HCl	Merck
(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	Fluka
Kaliumperoxodisulfat 99% ($K_2S_2O_8$)	Sigma
Katalase	Sigma
Medium („DMEM“)	Gibco/Invitrogen

NaCl, KCl, NaOH, KH ₂ PO ₄	Merck
NADPH	Sigma
Na ₂ EDTA	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Riedel-de-Häen
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	Riedel-de-Häen
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Merck Penicillin/Streptomycin
	Gibco/ Invitrogen
(10000 Units/ml Penicillin G Natriumsalz, 10000 µg/ml Streptomycin-sulfat)	
SSA (5-Sulfosalicylsäure)	Sigma
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
TBH (tert.-Butylhydroperoxid, 70%, wässrig)	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin (3,5 U/ml)	Serva

12.4 Kits:

BCA-Protein Kit Uptima	KMF Laborchemie
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
PeqGOLD Total RNA Kit (S-Line)	PeqLab

12.5 Lösungen:

ABTS-Stammlösung	115,22 mg ABTS 30 ml H ₂ O bidest. (7 mM) Aktivierung der Radikallösung durch Zugabe von 19,869 mg K ₂ S ₂ O ₈ und anschließender Lagerung über Nacht im Dunkeln
ABTS-Gebrauchslösung	Einstellen der Stammlösung mit PBS auf eine Absorption von 0,70 ± 0,02 bei λ = 734 nm temperieren auf 30°C täglich frisch ansetzen
Trolox-Stammlösung, 30 mM	7,51 mg Trolox in 1 ml DMSO lösen täglich frisch ansetzen
Trolox-Stammlösung, 100 mM	25 mg Trolox in 1 ml DMSO lösen täglich frisch ansetzen
Phosphatpuffer	221 mg NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O (1,6 mM) 1,494 g Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O (10,5 mM) 8,766 g NaCl (150 mM) lösen in 0,8-0,9 l H ₂ O bidest. einstellen auf pH 7,4 mit HCl bzw. NaOH auffüllen auf 1 l mit H ₂ O bidest. Lagerung bei 4°C
NaOH-Lösung (2 M)	4 g NaOH in 50 ml H ₂ O bidest.
Fluorescein-Stammlösung I (0,6 mM)	5,6 mg Fluorescein-Natrium lösen in 25 ml Phosphatpuffer + 1 Tropfen NaOH-Lösung Lagerung bei 4°C für max. 2 Wochen
Fluorescein-Stammlösung II (0,12 mM)	2 ml Fluorescein-Stammlösung I mit 8 ml Phosphatpuffer verdünnen (1:5) Lagerung bei 4°C für max. 2 Wochen
Fluorescein-Arbeitslösung (1,2 µM)	100 µl Fluorescein-Stammlösung II mit 9,9 ml Phosphatpuffer verdünnen (1:100) täglich frisch ansetzen

AAPH-Lösung (129 mM)	875 mg AAPH in 25 ml Phosphatpuffer lösen täglich frisch ansetzen
PBS (Stammlösung 10×)	90 g NaCl 7,26 g Na ₂ HPO ₄ 2,1 g KH ₂ PO ₄ Bis auf 1 l mit H ₂ O bidest. auffüllen, pH 7,2-7,4 bzw. 7,0, vor Gebrauch 1/10 mit H ₂ O bidest. verdünnen und autoklavieren
Trypsin/EDTA	125 mg Trypsin 65,5 mg EDTA auf 250 ml mit PBS auffüllen, kalt rühren, pH 7,2
Katalase-Lösung	Katalase mit PBS auf 100000 U/ml Verdünnen
Puffer A	1,7 g KH ₂ PO ₄ 234 mg Na ₂ EDTA in 100 ml H ₂ O bidest. lösen, Lagerung bei 4°C
Puffer B	2,175 g K ₂ HPO ₄ 234 mg Na ₂ EDTA in 100 ml H ₂ O bidest. lösen, Lagerung bei 4°C
Puffer (A+B)	15 ml Puffer A + 85 ml Puffer B am Versuchstag frisch ansetzen
NaHCO ₃ -Lösung, 0,5%ig	500 mg NaHCO ₃ in 100 ml H ₂ O bidest. lösen, Lagerung bei 4°C
NADPH-Lösung, 20 mM	18 mg NADPH in 1 ml 0,5%iger NaHCO ₃ -Lösung lösen
DTNB-Lösung, 6 mM	24 mg DTNB in 10 ml Puffer (A+B) lösen, frisch ansetzen
GSR-Lösung, 50 U/ml 70 U/ml 100 U/ml	GSR mit Puffer (A+B) einstellen
SSA-Lösung, 5%ig 10%ig	100 g SSA in 1 l H ₂ O bidest. lösen 50 g SSA in 1 l H ₂ O bidest. lösen

12.6 Kultivierung der HT-29 und Caco-2 Zelllinie

12.6.1 Caco-2 Zellen

Die Inkubation der adhären und als Monolayer wachsenden Zellen erfolgt bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Als Medium wird Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM-F12 mit 4500 mg/L Glucose, 20 % FKS (Fetales Kälber Serum) und ein 1 %iges Antibiotikagemisch aus Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet (DSMZ).

12.6.2 HT-29 Zellen

Die Inkubation der adhären und als Monolayer wachsenden Zellen erfolgt bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Als Medium wird Dulbeco's Modified Eagle's Medium DMEM mit 4500 mg/L Glucose, 10 % FKS und ein 1 %iges Antibiotikagemisch aus Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet (DSMZ).

12.6.3 Mediumwechsel

Die Arbeiten mit den humanen Zelllinien erfordern sterile Bedingungen. Die Kultivierung der Zellen als Monolayer erfolgt im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen. Beim Nährmedium (N-Med) handelt es sich um DMEM, dem vorher 10% Fötale Kälber-Serum (FKS) und 1% einer Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt wurde. Medien und PBS werden vor Zugabe zu den Zellen auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Die Ausscheidungsprodukte der Zellen färben den im Medium enthaltenen Indikatorfarbstoff (Phenolrot) nach einigen Tagen von rot nach gelb. Spätestens dann muss ein Mediumwechsel durchgeführt werden, um die Zellen von Stoffwechselprodukten und toten Zellen zu befreien. Dazu wird das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 50 ml frisches N-Med in die Kulturflasche gefüllt.

12.6.4 Subkultivierung (Passagieren der Zellen)

Bei Erreichen der Konfluenz nach 2-3 Tagen werden die Zellen passagiert. Hierzu wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Zellrasen nicht beschädigt wird. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wird 3 ml Trypsin zugegeben, ein Verdauungsenzym das Polypeptidketten nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifiziertem Cystein hochspezifisch spaltet. Nachdem die Zellen sich vom Flaschenboden gelöst haben (3-4 min), wird das Trypsin durch Zugabe von 5 ml N-Med inaktiviert. Danach werden die Zellen durch mehrmaliges resuspendieren mit einer 5 ml Pipette vereinzelt. Von der so erhaltenen Zellsuspension werden 1–2 ml in die die Kulturflasche zurück pipettiert, bzw. nach der dritten Passage in eine neue Zellkulturflasche überführt.

12.6.5 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau

Die Zellzahl wird mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) bestimmt. Vor Benutzung wird die Kammer mit Ethanol gereinigt, entfettet und ein Deckglas durch leichtes Anfeuchten des Objektträgers fest haftend darauf angebracht, indem man das Deckglas mit einer Kante schnell auf den Objektträger schiebt, so dass sich so genannte Newtonringe zwischen Deckglas und Objektträger bilden. Das Erscheinen von Newtonringen zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht ist und gleichzeitig, dass die Tiefe der Zählkammer (0,1 mm) richtig eingestellt ist. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten, wobei jedes große Quadrat eine Fläche von 1 mm² besitzt. Daraus ergibt sich bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1µl/Quadrat. 50 µl der Zellsuspension wird mit 100 µl Trypanblau in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und ca. 10 µl der Suspension in die Zählkammer pipettiert. Dazu setzt man die Pipette an die Kante Kammer/Deckglas an, durch die Kapillarkräfte wird die Suspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer

gesaugt. Anschließend werden die vier Eckquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\text{Mittelwert (aus den vier Quadraten)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Tote Zellen, die sich aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit blau färben, werden nicht mitgezählt, eine Ausnahme stellt der Viabilitätstest mit Trypanblau dar (*Lindl, 2002*). Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen werden sowohl die toten als auch die lebenden Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und jeweils der Mittelwert für 16 Quadrate berechnet. Trypanblau dringt in tote Zellen ein und färbt deren Cytosol blau an, damit lassen sich lebende von toten Zellen mikroskopisch unterscheiden (Abb. 68).

Die Viabilität wird anschließend wie folgt bestimmt:

$$\text{Viabilität \%} = \frac{\text{Mittelwert lebende Zellen}}{\text{Mittelwert lebende Zellen} + \text{Mittelwert tote Zellen}}$$

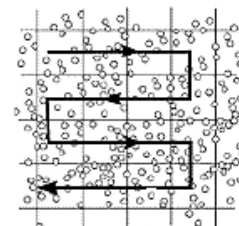
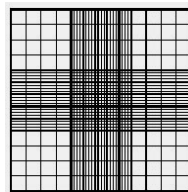


Abbildung 70: Darstellung einer Neubauer-Zählkammer, Messquadranten und Zählrichtung (*Lindl, 2002*)

12.6.6 Prüfung auf Mycoplasmen durch Fluorochromierung mit DAPI

Kontaminationen mit Mycoplasmen können am schnellsten durch die Anfärbung der Mycoplasmen-DNA mit dem speziell an DNA bindenden Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) festgestellt werden. Die Mykoplasmen erscheinen als gleichmäßig geförmte, kleine, hell leuchtende Punkte oder Ansammlungen von solchen. Da sich mitochondriale DNA kaum sichtbar anfärbt, ist die Hintergrundfluoreszenz gering. Kerntrümmer zerfallender Zellen, sowie Bakterien und Pilze sind wesentlich größer und anders geförmte als Mycoplasmen und daher nach Einarbeitung zu unterscheiden. Zur Durchführung des Mycoplasmentests wird ein steriler „Super-frost“- Objektträger in eine Petrischale gelegt und mit Medium überschichtet. Mit einer Pipette werden, über den Objektträger verteilt, einige Tropfen der Zellsuspension aufgetropft und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Der Objektträger wird mittels Pinzette aus der Petrischale genommen und die Zellen auf dem Objektträger im Methanolbad bei -20 °C fixiert. Danach wird der Objektträger getrocknet und nach Auftropfen von ca. 3-4 Tropfen einer DAPI / SR 101-Lösung mit einem Deckglas möglichst luftblasenfrei abgedeckt. Die überschüssige Färbelösung wird in einem Trockenblock entfernt. Im Fluoreszenzmikroskop unter Ölimmersion erscheint das Cytoplasma rot und die Zellkerne / DNA blau (*Lindl, 2002*).

12.7 Ileostoma-Studie

12.7.1 Studiendesign

Sechs Patienten mit Stoma des terminalen Ileums wurden am Westpfalzkrankenhaus Kaiserslautern und vier weitere am Krankenhaus St. Marienwörth Bad Kreuznach rekrutiert. Alle Studienteilnehmer wurden sowohl schriftlich, als auch mündlich am Studientag über den genauen Ablauf der Studie informiert und eine rechtswirksame Einwilligung eingeholt. Der Saftverzehr und die Sammlung der Ileostoma-beutel/ Urinproben der Patienten wurden im jeweiligen Krankenhaus durchgeführt. Die erhaltenen Proben wurden zur weiteren Bearbeitung in die Labors der Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie transportiert und dort für die weiteren Untersuchungen vorbereitet.

Alle Ileostoma-Patienten wurden gebeten sich 24h vor Studienbeginn polyphenolfrei zu ernähren. Am morgen des folgenden Tages tranken sie im nüchternen Zustand zügig 0,7 Liter Smoothie (die Verzehrsmenge basiert hierbei auf Erfahrungen vorausgehender Studien). Die Inhalte der Ileostomabeutel wurden unmittelbar vor Saftaufnahme (Zeitpunkt $t = 0$), sowie 1h, 2h, 4h 6h und 8h nach Saftaufnahme gesammelt und für die *in-vitro* Untersuchungen (Polyphenol-Analytik und Wirkungsprüfung in der Zellkultur) bereit gestellt. Im gleichen Zeitraum gesammelte Urinproben wurden zur analytischen Bestimmung von Saftinhaltsstoffen/ Metaboliten eingesetzt. Während der acht stündigen Probensammel-Phase wurden die Patienten gebeten auf den Verzehr polyphenolhaltiger Lebensmittel zu verzichten, vier Stunden nach Saftaufnahme erhielten die Patienten eine kleine polyphenolfreie Mahlzeit (helles Käsebrötchen ohne Garnitur). Die Studienteilnehmer wurden darüber hinaus gebeten ihre Anamnese sowie ihren Arznei- und Genussmittelkonsum, einschließlich Rauchverhalten mitzuteilen. Während der Teilnahme an der Studie sollten sie ihre Essgewohnheiten nach den Vorgaben des beiliegenden Informationsblattes richten. Der als Studiengetränk angebotene Smoothie ist ein Naturprodukt und gesundheitlich unbedenklich. Es können jedoch nach Verzehr von 0,7 Liter Saft bei nüchternen Patienten Verdauungsstörungen nicht ausgeschlossen werden. Ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme an dieser Studie bildeten Schwangere, Stillende, Diabetiker, Patienten mit Allergien gegen Äpfel/ Apfelsaft, sowie eine Einnahme von Medikamenten, die Einfluss auf den intestinalen Metabolismus nehmen können.

12.7.2 Charakterisierung des verwendeten Apfelsmoothies

Aufgrund der hohen Viskosität und dickflüssigen Beschaffenheit konnte der Smoothie erst nach starker Zentrifugation zur Analyse eingesetzt werden. Die analytischen Kennzahlen des Apfelsmoothie sind in Tabelle 20 dargestellt. Auffallend ist hierbei vor allem der hohe Gesamtphenolgehalt von 1470 mg/L, wobei eine Verminderung des Gehaltes durch die Zentrifugation wahrscheinlich ist. Die Gesamtsäuregehalte bewegen sich in einem sensorisch angenehmen Bereich und der Brixgehalt von 14,3° ist hoch, lässt sich aber durch den Zusatz des Apfelmarks erklären. Alle anderen analytischen Kennzahlen liegen im Bereich der üblichen Schwankungsbreiten.

Tabelle 20: Analytische Kennzahlen des Apfelsmoothie Winesap (nach Zentrifugation)
Quelle: AG Prof. Dietrich, FA Geisenheim, Netzwerkbericht (BMBF, 2007).

Parameter	Einheit	Methode	Apfelsmoothie
Dichte	20/20	Biegeschwinger	1,06195
Brix	°Brix	Refraktometrie	14,33
Leitfähigkeit	µS/cm	Konduktometrie	2490
Gesamtextrakt	g/L	berechnet	159,1
zuckrefreier Extrakt	g/L	berechnet	35,6
Glukose	g/L	Enzymatik	27,8
Fruktose	g/L	Enzymatik	75,3
Saccharose	g/L	Enzymatik	20,4
Gesamtsäure pH 7,0 ber. Weinsäure	g/L	Potentiometrie	7,36
Gesamtsäure pH 8,1 ber. Zitronensäure	g/L	Potentiometrie	6,77
Gesamtsäure pH 8,1 ber. Äpfelsäure	g/L	Potentiometrie	6,47
pH-Wert		Potentiometrie	3,34
L-Äpfelsäure	g/L	Enzymatik	8,59
Zitronensäure	g/L	Enzymatik	0,09
Ascorbinsäure	mg/L	Iodometrie	246
Sorbit	g/L	Enzymatik	6,94
Calcium	mg/L	AAS	33
Kalium	mg/L	AAS	1600
Magnesium	mg/L	AAS	54
TEAC	mmol/L		13
Gesamtphenole	mg/L	Folin	1470

12.7.3 Analytische Methoden und Biomarker

In der Arbeitsgruppe von Prof. Richling werden die erhaltenen Proben (Ileostomabeutel-Inhalte), sowie Urin mittels HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS/MS-Techniken und HRGC-MS auf Aglycone, Konjugate und flüchtige Metabolite wie phenolische Säuren untersucht und eine Pharmakokinetik erstellt.

Zur Feststellung der antioxidativen präventiven Wirksamkeit der Ileostomabeutel-Inhalte werden diese *in-vitro* an Kolonzelllinien auf Modulation oxidativer Zellschädigung und Zellantwort geprüft (Biomarker: Glutathion (GSH/GSSG, photometrisch), Expression redoxsensitiver Gene (Real Time-PCR), sowie zellfreie antioxidative Kapazität (TEAC, photometrisch) und Oxygen Radical Absorbing Capacity (ORAC, Fluoreszenz). Das Spektrum an Biomarkern soll eine zuverlässige Bewertung der antioxidativen präventiven Wirksamkeit des Smoothies ermöglichen.

Die Kombination dieser Techniken erlaubt ein Komplett-Screening auf die gebildeten Metabolite und ermöglicht eine gezielte Beurteilung des antioxidativen Potentials und bioaktiver Wirkungen im Dickdarm nach Verzehr des Smoothies.

12.7.4 Patientendaten und Statistik

Die in dieser Pilotuntersuchung mit 10 Patienten gewonnenen Daten wurden anonymisiert und nach den üblichen statistischen Verfahren ausgewertet. Nach Entblindung wurden für alle erhobenen Parameter pro Probenahme-Zeitpunkt und Behandlungsart statistische Kennwerte berechnet: arithmetisches Mittel, Standardabweichung, Normalverteilung, t-Test, für abhängige Stichproben (oder bei nicht normal-verteilten Messwerten mittels Wilcoxon-Test) verglichen.

Die Studie mit dem laufenden Titel: „Untersuchungen zur intestinalen Metabolisierung und präventiven Wirksamkeit eines Smoothies bei Patienten mit Stoma des terminalen Ileums durch *in vitro* Prüfung der Ileostomabeutel-Inhalte“ wurde im Rahmen des A4-Forschungsprogramms des Landes Rheinland-Pfalz unter dem Projekttitel „Darmgesundheit und Ernährung“ (Teilprojekt 3: Nutrient/ Cell interactions: Interaktionen von Lebensmittelinhaltsstoffen mit Zellen des Blutes und des Verdauungstraktes) gefördert und in Kooperation mit Prof. W. Albert (Medizinische Klinik III des Westfalzklinikums Kaiserslautern und Dr. R. Gosenheimer (Ltd. Oberarzt Strahlenabteilung/Onkologie/ Palliativmedizin, St. Marienwörth, Bad Kreuznach), sowie in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Richling (T.P. 7) durchgeführt. Der Studiensaft (Smoothie mit hohem natürlichen Polyphenol- und Pektingehalt) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Helmut Dietrich in der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt.

12.7.5 Aufarbeitung der Ileostoma-Beutelinhalte

Die aus der humanen Interventionsstudie gewonnenen Ileostoma-Beutel wurden in einer Kunststoffdose gefriergetrocknet, bis das Gewicht bei der Endwaage konstant blieb. Anschließend wurden die Beutel aufgeschnitten und der Inhalt mit Hilfe eines Borstenpinsels entleert. Danach wurde das grobe Lyophilisat zunächst mit einem Spatel vorsichtig zerkleinert und portionsweise in eine elektrische Kaffeemühle gefüllt und für 20 Sekunden gemahlen. Das so erhaltene Pulver wurde anschließend mit Hilfe eines Stahlsiebes (1 mm Maschenweite) gesiebt, um grobe Bestandteile zu entfernen. Das so erhaltene feine Pulver aus jedem Beutelinhalt, wurde in braune Glasflaschen abgefüllt und die Einwaage bestimmt. Der Schraubverschluss der Glasflaschen wurde mit Parafilm luftdicht abgeklebt und die Proben bei – 20 °C aufbewahrt.

12.7.6 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

Durchführung

Von den Lyophilisaten der Ileostoma-Beutelinhalte werden ca. 5-10 mg eingewogen und mit DMSO verdünnt, so dass eine 10 mg/ml Stammlösung entsteht. Aus diesen wird dann mit DMSO eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1,5/ 1,0/ 0,75/ 0,5/ 0,25/ 0,125 mg/ml hergestellt. Die Trolox-Stammlösung (30 mM) wird zunächst 1:10 mit DMSO auf 3 mM verdünnt und aus dieser Lösung ebenfalls eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1,5/ 1,0/ 0,75/ 0,5/ 0,25/ 0,125 mM angesetzt. Von jeder Lösung werden nun zwei Mal 2 µl in die Wells einer durchsichtigen 96-Lochplatte pipettiert. Ferner wird noch eine Reihe mit je 2 µl DMSO pro Well als Nullwert sowie eine Reihe mit je 2 µl pro Well der Trolox-Stammlösung

(30 mM) als Positivkontrolle in die Platte gegeben. Die äußeren Wells der Platte bleiben dabei frei. Zu den vorgelegten 2 µl in der Platte werden 198 µl einer auf 30°C temperierten ABTS-Gebrauchslösung pipetiert und die Platte im Photometer für 6 Minuten bei 30°C inkubiert und danach die Absorption bei 734 nm gemessen.

Auswertung

Für die Bestimmung der TEAC-Werte der Probe wird zunächst die Absorption der Positivkontrolle subtrahiert um die Eigenextinktion der Lösung und der Platte zu korrigieren. Dann wird das Ausmaß der Entfärbung (E%), bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, berechnet:

$$E\% = [(E_{\text{Solv}} - E_{\text{P}}) / E_{\text{Solv}}] * 100$$

E_{Solv} : Absorption der Lösungsmittelkontrolle

E_{P} : Absorption der Probe

Die E%-Werte von Trolox bzw. der zu untersuchenden Substanz werden gegen die Konzentration aufgetragen und anschließend die lineare Regression berechnet. Zur Bestimmung des TEAC-Wertes werden die Steigungen der berechneten Geraden miteinander ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{TEAC} = \text{Steigung (Probe)} / \text{Steigung (Trolox)}$$

Der TEAC-Wert gibt an, welche Konzentration Trolox (mM) nötig ist, um die selbe antioxidative Wirksamkeit zu erreichen, wie eine Lösung der Konzentration 1 mg/ml der zu untersuchenden Substanz.

12.7.7 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Durchführung

Von den Lyophilisaten der Ileostoma-Beutelinhalte werden ca. 5-10 mg eingewogen und mit DMSO verdünnt, so dass eine 10 mg/ml Stammlösung entsteht. Aus diesen wird dann mit DMSO eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 10/ 5/ 2/ 1 mg/ml hergestellt. Aus der Trolox-Stammlösung (100 mM) wird eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 100/ 40/ 20/ 10/ 5/ 2,5/ 1,25 mM in DMSO angesetzt. Alle Lösungen werden dann nochmals mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1:200 verdünnt (5 µl Probe in DMSO + 995 µl Phosphatpuffer). Zusätzlich wird noch als Blank (Nullwert) 5 µl DMSO mit 995 µl Phosphatpuffer verdünnt. Es entstehen Lösungen mit 0,5% DMSO und den Konzentrationen:

Trolox: 6,25 – 500 µM

Proben: 5 – 50 µg/ml

Aus jeder Lösung werden nun 4 x 20 µl in die Wells einer schwarzen 96-Lochplatte mit schwarzem Boden nach folgendem Pipettierschema vorgelegt:

Tabelle 21: Pipettierschema für den ORAC Assay.

	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 25	SPL1 25	SPL1 50	SPL1 50
C	SPL2 5	SPL2 5	SPL2 10	SPL2 10	SPL2 25	SPL2 25	SPL2 50	SPL2 50	SPL3 5	SPL3 5	SPL3 10	SPL3 10
D	SPL3 25	SPL3 25	SPL3 50	SPL3 50	SPL4 5	SPL4 5	SPL4 10	SPL4 10	SPL4 25	SPL4 25	SPL4 50	SPL4 50
E	SPL4 50	SPL4 50	SPL4 25	SPL4 25	SPL4 10	SPL4 10	SPL4 5	SPL4 5	SPL3 50	SPL3 50	SPL3 25	SPL3 25
F	SPL3 10	SPL3 10	SPL3 5	SPL3 5	SPL2 50	SPL2 50	SPL2 25	SPL2 25	SPL2 10	SPL2 10	SPL2 5	SPL2 5
G	SPL1 50	SPL1 50	SPL1 25	SPL1 25	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

Danach werden in jedes Well mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 100 µl Phosphatpuffer zugesetzt und die Fluoreszenz Messung im Multiplattenphotometer gestartet. Die Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 485 nm und die Emission wird bei 528 nm detektiert. Die nachfolgenden Schritte werden durch das Photometer-Programm durchgeführt:

- Zugabe von 25 µl Fluorescein-Arbeitslösung pro Well (aus Dispenser I)
- Temperierung auf 37°C für 10 min
- Messung der Fluoreszenz (0 – 90 min) alle 2 min
- Bei t = 4 min: Zugabe von 100 µl AAPH-Lösung zum Starten der Reaktion (aus Dispenser II)

Auswertung

Zunächst werden die Flächen unter den Fluoreszenzkurven (AUC area under the curve) berechnet:

$$AUC = 1 + \frac{\sum_{i=2}^{48} F_i}{F_1}$$

mit F_i = Fluoreszenz der Messung i

Anschließend wird der sogenannte net AUC bestimmt:

$$AUC_{net} = AUC_{Probe/Standard} - AUC_{Blank}$$

Die AUC_{net} -Werte von Trolox bzw. der zu untersuchenden Substanz werden gegen die Konzentration aufgetragen und jeweils die lineare Regression berechnet. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden wird der ORAC Wert ermittelt:

$$ORAC = \text{Steigung (Probe)}/\text{Steigung(Trolox)}$$

Der ORAC-Wert gibt damit analog zum TEAC-Wert an, welche Konzentration Trolox (mM) nötig ist, um dieselbe antioxidative Wirksamkeit zu erreichen, wie eine 1 mg/ml Lösung der zu untersuchenden Substanz.

12.7.8 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

Aussaat der Zellen

Die nach Passagieren der Zellen gewonnene Zellsuspension wird mit N-Med verdünnt, so dass sich in einem Milliliter 320 000 Zellen befinden. Von dieser Zellsuspension werden 100 µl (ca. 32 000 Zellen) in jedes Well einer sterilen schwarzen 96-Lochplatte gegeben. Die äußeren Reihen der 96-Lochplatte werden mit PBS befüllt, da Vorversuche gezeigt haben, dass die Messwerte in den äußeren Wells mit großen Schwankungen behaftet sind. Anschließend werden die Zellen für 24 h im Brutschrank kultiviert.

Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten

Von den Ileostoma-Beutelinhalten werden ca. 5-10 mg eingewogen und mit DMSO verdünnt, so dass eine 10 mg/ml Stammlösung entsteht. Diese Stammlösung wird mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. . Danach wird eine Verdünnungsreihe in DMSO hergestellt mit den Konzentrationen 10; 6; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03 mg/ml. Von diesen Lösungen wird je 10 µl mit 990 µl I-Med (DMEM mit 5% FKS und 1% Penstrep) und 1 µl Katalase (100000 U/ml) versetzt. Die fertigen Inkubationslösungen enthalten somit 1% DMSO und 100 U/ml Katalase sowie 0,3 bis 100 µg/ml der Ileostoma-Beutelinhalte. Nach 24 h Anwachsen wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden je 100 µl der verschiedenen Inkubationslösungen in die Wells der 96-Lochplatte pipettiert. Einige Wells dienen zur Kontrolle und werden ohne Ileostoma-Beutelinhalte inkubiert (I-Med mit 1% DMSO und 100 U/ml Katalase). Danach folgt eine 24 stündige Inkubation im Brutschrank.

Inkubation mit Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA)

Alle Arbeiten mit DCFH-DA erfolgen aufgrund der Lichtempfindlichkeit dieses Farbstoffs unter Rotlicht. Circa 2 mg DCFH-DA werden eingewogen und mit DMSO auf 10 mmol/l vorverdünnt. Von dieser Lösung werden 100 µl mit 20 ml PBS (pH = 7,0) versetzt. Es entsteht eine 50 µM Farbstofflösung die 0,5% DMSO enthält. Nach der 24h Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Ileostoma-Proben wird das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (pH = 7,4) gewaschen. In jedes Well werden je 100 µl der Farbstofflösung auf die Lochplatte pipettiert. Die Lochplatte wird mit Aluminiumfolie lichtundurchlässig abgedeckt und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wird die TBH-Lösung angesetzt und der Multiplatten-Reader auf 37 °C vortemperiert. Die wässrige 70% ige TBH-Stammlösung wird mit PBS (pH = 7,4) auf 250 µmol/l verdünnt. Die DCFH-DA-Farbstofflösung wird aus den Wells abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (pH = 7,4) gewaschen. Eine bzw. zwei Reihen der 96-Lochplatte werden mit PBS (pH = 7,4) als Kontrolle befüllt, die anderen Reihen werden mit der Oxidanzienlösung versetzt und die Platte sofort gemessen.

Messung und Auswertung

Die DCF-Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 530 nm detektiert. Die erste Messung erfolgt nach 0 min, danach erfolgt alle 10 min eine Zwischenmessung. Der prozentuale Anstieg der Fluoreszenz pro Well der 96-Lochplatte ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Fluoreszenzanstieg \%} = [(F_{t_{30}} - F_{t_0}) / F_{t_0}] * 100$$

$F_{t_{30}}$: Fluoreszenzintensität nach 30 Minuten Inkubation

F_{t_0} : Fluoreszenzintensität nach 0 Minuten Inkubation

Der prozentuale Fluoreszenzanstieg wird gegen die Konzentration des verwendeten Antioxidans graphisch aufgetragen. Zum besseren Vergleich werden die Proben, die nur mit TBH aber nicht mit Ileostoma-Inkubations-Lösungen behandelt werden, als 100% Fluoreszenzanstieg gesetzt.

12.7.9 Quantitative Real Time TaqMan-PCR

Aussaat der Zellen

Die nach Passagieren der Zellen gewonnene Zellsuspension wird mit N-Med verdünnt, so dass ein Milliliter 120000 Zellen enthält. Von dieser Zellsuspension werden je 10 ml (ca. $1,2 \cdot 10^6$ Zellen) in eine Petrischale (Durchmesser 9,4 cm) pipettiert und die Zellen für 48 h im Brutschrank kultiviert.

Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten

Von den Ileostoma-Beutelinhalten werden ca. 5-10 mg eingewogen und mit DMSO verdünnt, so dass eine 10 mg/ml Stammlösung entsteht. Diese Stammlösung wird mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,2 μm filtriert. Danach wird eine Verdünnungsreihe 3 mg/ml und 10 mg/ml in DMSO angesetzt. Nach 48 h Anwachsen der Zellen wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden je 10 ml I-Med (DMEM mit 5% FKS und 1% Penstrep), 10 μl Katalase (100000 U/ml) sowie 100 μl der Verdünnungsreihe in die Petrischalen pipettiert. Die fertigen Inkubationslösungen enthalten somit 1% DMSO und 100 U/ml Katalase sowie 30 bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ der Ileostoma-Beuteinhalte. Als Kontrolle wird eine Petrischale mit 10 ml I-Med, 10 μl Katalase und 100 μl DMSO inkubiert. Danach erfolgt eine weitere 24 stündige Inkubation im Brutschrank.

Aufarbeitung der Zellen

Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Je Petrischale werden 600 μl TRK-Lysepuffer zugegeben, die Zellen mit einem sterilen Schaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die lysierten Zellen können nun direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

RNA-Isolierung

Die lysierten Zellen werden zunächst jeweils mit einer 1 ml Spritze und einer 0,9 gauge Kanüle vorsichtig 10 Mal resuspendiert und homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem

peqGOLD Total RNA Kit (Safety Line) der Firma PeqLab und nach dem Protokoll des Herstellers.

Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die RNA-Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Das Absorptionsmaximum der Proteine liegt dagegen bei 280 nm. Durch Bestimmung des 260/280 nm Verhältnisses lässt sich die Reinheit einer Nucleinsäurelösung abschätzen. Eine reine RNA-Lösung besitzt einen A_{260}/A_{280} -Wert von 2,0 (*Lottspeich et al. 1998*). Die RNA-Konzentration wird mittels eines UV-VIS-Spektralphotometers (NanoDrop) bestimmt. Dazu wird zunächst 1,5 μl des Elutionsmittels (RNase freies Wasser) auf das Messpedal des Spektralphotometers pipettiert und der Background kalibriert, danach werden die Proben gemessen. Bei einem Absorptionsverhältnis zwischen 1,9 und 2,2 werden die Proben zur RT-PCR und eingesetzt.

Reverse Transkription

Für die Amplifikation von RNA ist es notwendig diese zunächst in cDNA umzuschreiben, da die Taq-Polymerase die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize nutzen kann. Dieser als reverse Transkription (RT) bezeichnete Schritt wird durch eine Reverse-Transkriptase durchgeführt (*Lottspeich et al. 1998*). Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgt mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems. Der Pipettieransatz für die RT ist in den folgenden Tabellen (Tab. 22- 24) beschrieben.

Tabelle 22: Pipettieransatz für den Mastermix

[*modifiziert nach dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems*].

Mastermix	Ansatz für n = 1
(10 \times) RT-Buffer	2 μl
(25 \times) dNTP Mix (100 mM)	0,8 μl
(10 \times) RT Random Primer	2 μl
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	1 μl
Nuclease-free H ₂ O	4,2 μl
	$\square = 10 \mu\text{l}$

Tabelle 23: Pipettieransatz für die reverse Transkription [*modifiziert nach Arbeitsanleitung High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*].

	Ansatz für n = 1
Mastermix	10 μl
RNA Probe	X μl
DEPC-H ₂ O	(10-X) μl
	$\square = 20 \mu\text{l}$

Da aus jeder Probe 2000 ng RNA eingesetzt werden, wird das Volumen für den Mastermix berechnet. Das Volumen wird mit DEPC-H₂O auf 10 μl aufgefüllt. Danach werden 10 μl des

Mastermixes zugesetzt und die Proben im Thermal Cycler bei folgendem Temperaturprogramm umgeschrieben:

Tabelle 24: Temperaturprogramm für die reverse Transkription [*modifiziert nach Arbeitsanleitung High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*].

	Temperatur	Zeit
Schritt 1	25°C	10 min
Schritt 2	37°C	120 min
Schritt 3	85°C	5 min
Schritt 4	4°C	∞

Nach der reversen Transkription werden die cDNA Proben entweder direkt zur Real Time PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Real Time PCR

Die Untersuchungen zur Modulation der antioxidativen Genexpression wurden mittels Real-Time TaqMan® PCR nach Inkubation von HT-29 und Caco-2 Zellen mit polyphenolischen Apfelinhaltsstoffen bzw. Extrakten durchgeführt (*Jaiswal, 2004; Lee et al., 2005; Jakubikova et al., 2006*). Die Zellen wurden nach 3, 6 bzw. 24h serumfreier Inkubation mit den Extrakten/ Einzelstoffen lysiert; anschließend wurde die RNA mit Hilfe von Spin-Säulen isoliert, UV-photometrisch auf Quantität und kapillarelektrophoretisch (Agilent Bioanalyser) auf Integrität geprüft und zur cDNA-Synthese eingesetzt (*Bustin, 2005; Bustin et al., 2005*). Mit Hilfe sequenzspezifischer Primer und Sonden wurde eine relative Quantifizierung der Transkripte ARE-abhängiger Gene durchgeführt und mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (aktives Referenzgen β -Actin) (*Pfaffl, 2001*).

Statistik: Die in mehreren unabhängigen Versuchen (n) erhaltenen Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben, die Prüfung auf Ausreißer erfolgte nach Nalimov, die Prüfung auf Signifikanz ($p < 0,05$) mittels Zweistichproben t-Test.

Die in dieser Arbeit untersuchten Zielgene wurden mittels relativer Quantifizierung detektiert. Die Expression des Zielgenes wird hierbei auf ein endogenes Kontrollgen (β -Aktin) normalisiert. [*Pfaffl, 2004*]. Je Probe werden zwei gleiche Ansätze pipettiert und hieraus die beiden Gene quantifiziert.. Die Messung erfolgt als Vierfachbestimmung, d.h. es werden je vier Wells der 96-Well Reaktionsplatte aus dem gleichen Ansatz befüllt. Der Pipettieransatz für die Real Time PCR ist folgender Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 25: Pipettieransatz für die Real time PCR.

	Temperatur	Zeit
Schritt 1	25°C	10 min
Schritt 2	37°C	120 min
Schritt 3	85°C	5 min
Schritt 4	4°C	∞

Nach Pipettieren der Proben wird die 96-Well Reaktionsplatte mit einer adhesiven Folie versiegelt und für 2 min bei 4°C und 800 rpm zentrifugiert. Das Temperaturprogramm der Real Time-PCR ist in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 26: Temperaturprogramm für die Real Time PCR.

	Temperatur	Zeit	
Schritt 1	50°C	2 min	Uracil-N-Glycosidase Aktivierung
Schritt 2	95°C	10 min	Aktivierung der DNA-Polymerase
Schritt 3	95°C	15 s	Denaturierung
Schritt 4	60°C	1 min	Annealing
PCR: 40 Zyklen Schritt 3 und 4			

Quantifizierung

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode erfolgen. Dazu werden zunächst aus den Ct-Werten der Wells mit demselben Ansatz die Mittelwerte gebildet. Dann wird der Ct-Wert der endogenen Kontrolle vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert. Nach dieser Normierung wird die Differenz aus dem ΔCt -Wert der experimentell behandelten Proben und dem ΔCt -Wert der DMSO-Kontrolle gebildet und der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert erhalten. Der relative Expressionsunterschied einer Probe der Behandlung und der Kontrolle (Ratio) ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Pfaffel, 2004).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\beta\text{-Aktin})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Behandlung}) - \Delta\text{Ct}(\text{DMSO-Kontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (\text{Pfaffel, 2004})$$

Die Standardabweichung (SD) des relativen Expressionsunterschiedes wird aus den Standardabweichungen der Ct-Werte der Wells mit demselben Ansatz wie folgt berechnet (Bookout et al 2003):

$$\text{SD}(\Delta\text{Ct}) = \sqrt{\text{SD}(\text{Ct}_{\text{Zielgen}})^2 + \text{SD}(\text{Ct}_{\beta\text{-Aktin}})^2}$$

$$\text{SD}(\Delta\Delta\text{Ct}) = \sqrt{\text{SD}(\Delta\text{Ct}_{\text{Behandlung}})^2 + \text{SD}(\Delta\text{Ct}_{\text{DMSO-Kontrolle}})^2}$$

$$\text{SD}(\text{Ratio}) = (\ln 2)(\text{SD}_{\Delta\Delta\text{Ct}})(2^{-\Delta\Delta\text{Ct}})$$

12.8 Interventionsstudie an Ratten

12.8.1 Behandlung der Tiere und Probeentnahme

Die Fütterungsstudie wurde von Jutta Minn im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt, im Folgenden wird die Behandlung der Tiere, sowie die Probeentnahme nochmals kurz erläutert. Männliche Sprague Dawley Ratten (n=32, 125-150 g KG, Charles River, Sulzfeld) wurden in Standard Laborkäfigen bei Raumtemperatur und 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten.

Über die gesamte Studienzeit hinweg erhielten die Tiere eine pathogenfreie Standard Labordiät (Altromin 1314, altromin Spezialfutter GmbH & Co.), sowie Trinkwasser ad libitum. Nach einer Eingewöhnungszeit wurden die Tiere randomisiert in vier Gruppen zu je acht Tieren unterteilt. Je Gruppe erhielten die acht Tiere für zehn Tage statt Trinkwasser, entweder klaren AS, trüben AS, Smoothie, oder einen polyphenolfreien Kontrollsaft. In der darauffolgenden viertägigen wash-out Phase wurde der Saft wieder durch Trinkwasser (ad libitum) ersetzt. Die vier Gruppen wurden dieser experimentellen Durchführung viermal hintereinander unterzogen, so dass sich hieraus eine Behandlungszeit von 56 Tagen ergab. Am Ende der Interventionszeit wurden die Tiere dekapitiert und der kaudale Leberlappen, sowie der gesamte Kolon resektiert. Jede Probe aus dem kaudalen Leberlappen (20-25 mg/Tier) wurde nach der Entnahme sofort in je 5 ml RNA-Later transferiert. Der gesamte distale Kolonabschnitt wurde mit PBS-Lösung gespült und gleich danach in flüssigem Stickstoff eingedung der Tiere wurde durch die für Kaiserslauternfrozen. Alle Proben wurden bei -80°C aufbewahrt. Das experimentelle Protokoll und die Behandlung der Tiere von der für Kaiserslautern zuständigen Ethikkommission genehmigt und zugelassen. Die Experimente wurden in Anlehnung an die Richtlinien der europäischen Vereinigung zum Schutz und Gebrauch von Tieren durchgeführt.

12.8.2 RNA Extraktion und RT-PCR

Säugetierzellen enthalten durchschnittlich 10^{-5} μg RNA, das zu 80-85 % aus ribosomaler RNA (hauptsächlich 5S, 5,8S, 18S und 28S Spezies) besteht. Dagegen macht die sog. messenger RNA (mRNA) nur 1-5 % der Gesamt RNA-Menge aus und ist bzgl. der Länge (einige Hundert bis mehrere Kilobasen) und der Sequenz sehr heterogen zusammengesetzt. Allerdings besitzt eukaryotische mRNA in der Regel ein Poly A-Strang am 3'-Sequenzende und kann dadurch mittels Affinitätschromatographie an oligo-Cellulose gebunden werden. Die hierbei gebundene gemischte mRNA Population kodiert nahezu alle Polypeptide die von der Zelle synthetisiert werden. RNA ist jedoch aufgrund der Hydroxylgruppen in 2' und 3'-Position sehr anfällig für den Abbau durch RNasen. Letztere sind Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität, haben jedoch die gemeinsame Eigenschaft Diesterbrücken zwischen Phosphat und Ribose-Resten zu hydrolysieren. RNasen sind ubiquitär, treten auf der Haut auf und werden vor allem während der Zelllyse freigesetzt. Die Kontamination mit RNasen stellt ein ernsthaftes Problem im Labor dar, da sie auch über Aerosole im Raum verteilt werden können. Aufgrund starker Disulfidbindungen innerhalb des Enzyms, lassen sich viele RNasen nicht einfach durch Erhitzen oder Denaturierung zerstören, da sie die Eigenschaft besitzen sich schnell zurückzufalten und somit ihre Aktivität wieder zurückerlangen. Auch die Behandlung mit Chelatbildnern wie EDTA und anderen Metallkomplexbildnern ist nicht effektiv, da für die Enzymaktivität von RNasen keine divalenten Kationen erforderlich sind. Der beste Weg im Umgang mit RNasen stellt die Vermeidung einer Kontamination dar. In allen anderen Fällen hat sich die Vorbehandlung von wässrigen Gebrauchslösungen mit Diethylpyrocarbonat oder speziellen RNase Inhibitoren durchaus bewährt. Der Schlüssel zur erfolgreichen RNA-Isolierung ist daher auch eine schnelle Aufarbeitung, dies gewährleistet die frühzeitige Inaktivierung endogener RNasen in den entscheidenden ersten Schritten. In den heutzutage gängigsten Protokollen zur RNA-Isolierung

ist daher der Einsatz von starken Denaturierungsmitteln wie z. B. Guanidiniumhydrochlorid (GHC1) oder Guanidiniumthiocyanat (GTC) gebräuchlich. Ihre Wirkung besteht dabei in einer schnellen Lyse der Zellen und simultanen Denaturierung von RNasen, während der Zellinhalt in Lösung bleibt. Der Einsatz von GTC Salzen zur RNA Extraktion wurde erstmals von Ulrich et al. 1977 erwähnt, weitere Dokumentationen finden sich in Artikeln von Han et al. und Chirgwin et al. (*Chirgwin et al., 1979*). Auf eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Methoden wird hier nicht näher eingegangen und kann aus der genannten Literatur entnommen werden. Diese Methoden sind zudem in ihrer Durchführung sehr labor- und zeitintensiv, da sie meist unter Einsatz von Ultrazentrifugationsschritten und CsCl-Dichtegradienten durchgeführt werden. Eine besonders einfache und effiziente Alternative bietet die von Chomczynski und Sacchi erstmals 1987 beschriebene Technik zur RNA-Isolierung und hat sich bis heute durchgesetzt. Die Methode basiert auf der Möglichkeit RNA als diskrete Phase in einem Phenol- Chloroform Gemisch aus dem GTC Homogenisat zu extrahieren.

Nach Zugabe von 500 µl TRK Lysepuffer wurden alle Leberproben mit Hilfe eines Homogenisators (Precellys 24, PeqLab GmbH) in zwei aufeinanderfolgenden Schritten á 30 sek. und 5000 rpm aufgeschlossen. Anschließend wurde aus diesem Homogenisat die gesamte RNA isoliert und auf chemische Reinheit geprüft (*Manchester, 1995*). Die gesamte RNA aus dem gesamten distalen Kolon wurde mit Hilfe des Total RNA Isolation Reagent (TRIR, ABgene) auf der Basis der sauren Guanidin-Phenol Chloroform-Methode durchgeführt (*Chomczynski et al. 1987*). Die Reinheit und Integrität der RNA wurde mittels optischer Dichte (260/280 ratio > 1,9; Nanodrop 1000, Peqlab GmbH) und visueller Erfassung der 28S und 18S rRNA Gelbilder (2:1 Intensitätsverhältnis) überprüft (*Godá et al. 1995*). Nach gesamte RNA Isolierung wurden alle Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C aufbewahrt.

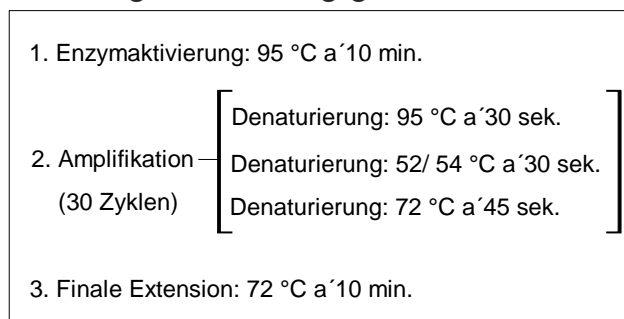
Die reverse Transkription erfolgte in einem Reaktionsgemisch (25 µl) bestehend aus 2 µg gesamte RNA, 5 mM MgCl₂, 1xRT-Puffer, 1 mM dNTP's, sowie 25 U MuLV-Reverse Transkriptase und 2,5 µM Random Hexamere. Der Einsatz von Random Hexameren ermöglicht eine akkurate Abbildung der gesamte RNA Population und verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen (*Resuehr et al. 2003*). Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler (PTC-100, MJ-Research, BIO-RAD) durchgeführt. Nach einem Initialschritt von 10 min bei 25 °C, erfolgte die Reverse Transkription bei 37 °C für 120 min. und wurde anschließend mit einem 10 minütigen Enzymdenaturierungsschritt bei 95 °C beendet. Alle Primer (mRNA Sequenzen der Ratte (*rattus norvegicus*): NCBI Unigene Datenbank) wurden mit Hilfe der Primer Express V. 2.0. (Applied Biosystems) designed und nochmals mit OligoCalc Software (*Rozen et al. 2000; Kibbe 2007*) auf Sequenzkomplementarität überprüft. Forward und Reverse

Die Primer wurden hierbei nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Länge zwischen 19-21 Basen (optimal: 21 Basen)
- T_m zwischen 51 und 60 °C (optimal: 52-54 °C)
- Länge des Amplikons zwischen 290 und 567 bp, so dass es zu keiner Überlappung mit dem 890 bp GAPDH Amplifikationsprodukt kommt.

- G+C-Gehalt > 47 %; keine repetitiven Sequenzen
- Vermeidung von Poly-Strängen mit mehr als fünf identischen Basen (wie z. B. Poly T's)
- Die Spezifität der Primer wurde mittels Primer Blast Suche (NCBI) gegen bekannte DNA Sequenzen sichergestellt (*Altschul et al. 1997; Koski et al. 2001*). Alle Primer Sequenzen sind in Tab. X aufgeführt. GAPDH wurde als endogene Kontrolle eingesetzt (*Chen et al., 2006*).

Die Annealing Temperaturen wurden nach Marmur und Doty (Marmur and Doty, 1962) kalkuliert und Duplex RT-PCR (Zielgen/ Referenzgen) unter Einsatz der AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (Applied Biosystems) durchgeführt. Der finale Reaktionsmix (40 µl) enthielt 3 µl (10 pmol/µl) des jeweiligen Forward- und Reverse Primers, 2µl (2µg) cDNA, 20 µl (1U) DNA Polymerase und 6 µl DEPC-behandeltes RNase freies Wasser (aqua bidest). Das PCR-Temperaturprogramm war in folgende Schritte gegliedert:



Diese PCR Bedingungen sollten sicherstellen, dass die PCR Produkte noch in der exponentiellen Phase der Reaktion erfasst wurden, sowie Konkurrenz der Primerpaare untereinander und einzelner Reagenzien um das jeweilige Substrat (wie z.B. MgCl₂, dNTP's) ausgeschlossen ist. Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit genomischer DNA vorlag, wurde in jedem PCR-Experiment eine Negativ-Kontrolle (gesamt RNA statt cDNA als PCR Template), sowie eine sogenannte No Template Control (NTC) mitgeführt. Alle cDNA Proben (n=32, Zielgen, Kontrollgen) aus der Leber und dem Kolon wurden sowohl gleichzeitig amplifiziert, als auch zeitgleich elektrophoretisch (1,3 %iges Agaraosegel in 1x TAE Puffer, 85 VDC, 90 min) aufgetrennt. Eine 100 bp DNA Leiter diente als Kontrolle und wurde in jedem Gel mitgeführt. Nach 20 minütiger Anfärbung der Gele im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml in 1xTAE Puffer), wurden die DNA-Banden durch UV-Transillumination im Eagle Eye™ (Stratagene) System detektiert. Basierend auf der Tatsache, dass die optische Dichte eine logarithmische Funktion der Helligkeit darstellt, wurde mittels ImageJ Software (V. 1.41.o) die integrierte Net-Bandenintensität (integrated optical density, IOD) des Zielgens und GAPDH quantifiziert (*Rasband 2009; Abramoff et al., 2004*). Hierbei wird aus einer genau definierten Fläche die relative integrierte optische Dichte (relative IOD, rIOD: Zielgen/GAPDH ratio) berechnet (*Tchantchou et al. 2004*). Durch serielle Verdünnungs-experimente konnte mit Ausnahme von SOD1 (R2:0,823) für alle anderen Gene eine Primereffizienz > 90 % (R2: 0,936-0,995) sichergestellt werden. Der Variationskoeffizient (CV) wurde aus mehreren unabhängigen Wiederholungen berechnet und ergab eine Inter-Assay CV (GPX2 und Nrf2: 5,45 und 9,29%), sowie eine Intra-Assay Variation der PCR für alle Zielgene des Kolons (CV: 1,53-13,85%) und der Leber (CV: 3,48-22,98%).

Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Mit Hilfe des Anderson-Darling Tests wurde auf Normalverteilung geprüft. Signifikante Unterschiede in der rIOD zwischen Kontroll- und Apfelsaftgruppen wurden mittels ungepaartem, einseitigem Mann-Whitney U-Test (Daten nicht normalverteilt) berechnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der R-Project Software (**R-Project, 2008**).

12.9 HD-Studie

12.9.1 Studiendesign

Der zehnwöchige Studienverlauf gliederte sich jeweils in drei Phasen (Abb. 69): Woche 1-3 als Run-in-Phase (R), in der sich, bedingt durch die vorgeschriebene Diät, die individuellen Variationen bei den Messwerten reduzieren sollen; Woche 4-7 als Saftaufnahme-Phase (S) und Woche 8-10 als Wash-out-Phase (W). Während der vierwöchigen Saftaufnahme-Phase konsumierten die Probanden täglich eine Saftmenge von 200 mL in zwei gleichen Portionen (**Spormann et al., 2008**). Dabei wurde darauf geachtet, dass eine der beiden Saftportionen etwa eine Stunde vor Dialysebeginn aufgenommen wird, da nach etwa einer Stunde die höchste Anthocyankonzentration im Blutplasma zu erwarten ist (**Kay et al. 2009**).

Teilnehmer	Woche 1-3	Woche 4-7	Woche 8-10
11 „stabile“ HD-Patienten	Run-in (R)	Saftaufnahme (S)	Wash-out (W)

Abbildung 71: Studiendesign

Die Patienten wurden angehalten ihre Ernährungsgewohnheiten beizubehalten, jedoch auf die Aufnahme von Supplementen (z.B. Vitamine) und Nahrungsmitteln mit einem hohen Gehalt an Anthocyanen (z.B. rote Beeren und daraus hergestellte Produkte) zu verzichten. Dazu erhielten sie eine Liste mit Ernährungsvorgaben und einen Terminplan zur Orientierung. (**Spormann et al., 2008**). Der für die Interventionsstudie verwendete Saft wurde am 07.12.2005 an der Getränkeforschungsanstalt Geisenheim hergestellt und abgefüllt.

13. Statistik

Signifikanzen

Um die erhaltenen Messwerte statistisch einordnen zu können, werden Signifikanztests eingesetzt. Dabei werden mit Hilfe von formulierten Hypothesen Gleichheit bzw. Unterschiede oder Effekte innerhalb der Messreihe überprüft. Die Nullhypothese H_0 ist zumeist die Formulierung der Gleichheit, die Gegenhypothese H_1 die Formulierung eines Unterschieds oder Effekts. Die Hypothesen werden in der Regel zweiseitig formuliert (Gleichheit vs. positiver Effekt bzw. Gleichheit vs. negativer Effekt). Statistische Tests bedienen sich oft folgender Schlussweise: Zunächst wird eine Nullhypothese aufgestellt, mit dem Ziel, diese Hypothese zu verwerfen, um die Gegenhypothese annehmen zu können.

Signifikanztests sind nur dann einsetzbar, wenn die Hypothese vor Kenntnis der Daten aufgestellt wurde.

Die Wahl des Signifikanztests ist davon abhängig, ob sich die zu testende Hypothese auf eine Stichprobe bezieht, oder ob mehrere Stichproben verglichen werden sollen. Ebenso muss berücksichtigt werden, ob es sich beim Vergleich der Messwerte um abhängige oder unabhängige Stichproben handelt und welcher Verteilung die Daten unterliegen.

Das Ergebnis eines Signifikanztests wird häufig als p-Wert bezeichnet. Ist der p-Wert kleiner als das gewählte Signifikanzniveau p (häufig $p=0,05$) so wird die Nullhypothese abgelehnt. Das Ergebnis gilt dann als statistisch signifikant (*Lange, 2001*).

In vivo Daten

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden diese bei mehreren unabhängigen Versuchen gemittelt und für $n > 2$ die Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Für die statistischen Berechnungen wurden die Daten der Interventionsstudie zunächst auf Normalität überprüft. Anschließend erfolgte eine Bildung der Mittelwerte der einzelnen Studienphasen, so dass es für jeden Probanden einen Mittelwert für jede Studienphase (Run-in (R), Saftaufnahme (S) und Wash-out (W)) und für jeden Biomarker gab. Anschließend wurden für die beiden verwendeten Signifikanztests die Differenzen der Mittelwerte gebildet: Run-in/Saftaufnahme (R/S), Saftaufnahme/Wash-out (S/W) und Run-in/Wash-out (R/W). Die Differenzen mit Normalverteilung wurden einem einseitig gepaarten STUDENT t-Test unterzogen, während die Signifikanzprüfung der Differenzen ohne Normalverteilung mit dem WILCOXON-Test durchgeführt wurde.

In vitro Daten

Zur Berechnung der signifikanten antioxidativen Wirksamkeit wurde für $n > 2$ der einseitig gepaarte Students t-Test angewendet (*Gottwald, 2000*). Mit Hilfe des t-Testes kann getestet werden, ob zwei Stichproben aus zwei Grundgesamtheiten aus demselben Mittelwert stammen (*Spiegel, 1976*). Bei den in vitro Experimenten wird der Wert der Lösungsmittelkontrolle mit den Werten der behandelten Proben mittels des Einstichproben-t-Test verglichen. Die signifikante Zunahme der antioxidativen Kapazität wird durch Anwendung eines gepaarten Zweistichproben-t-Test überprüft. Als niedrigster signifikanter Unterschied wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Anderson-Darling-Test

Dieser Test prüft auf die Normalverteilung der Daten nach folgender Formel:

$$A^2 = -N - S$$

mit

$$S = \sum_{i=1}^N \frac{(2i-1)}{N} [\ln F(Y_i) + \ln(1 - F(Y_{N+1-i}))]$$

F = Verteilungsfunktion; Y_i = Daten; N = Stichprobenumfang

Waren die betrachteten Daten normalverteilt, so konnte als statistischer Test der STUDENT t-Test angewendet werden. In den Fällen, in denen sich keine Normalverteilung der Messwerte ergab, wurde der WILCOXON-Test angewendet.

Student t-Test

Der STUDENT t-Test kommt zum Einsatz, wenn es um die Prüfung stetiger Zielgrößen geht. Er prüft die Gleichheit bzw. Verschiedenheit zweier Stichproben anhand der Differenz ihrer Mittelwerte. Mittelwerte aus Stichproben sind Schätzwerte für die entsprechenden Erwartungswerte der Grundgesamtheit.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{\sigma^2}{\sqrt{n}}}$$

\bar{x} = Mittelwert 1

μ = Mittelwert 2

σ^2 = Varianz

n = Stichprobenumfang

Vorraussetzung für die Durchführung dieses t-Tests ist die Annahme einer Normalverteilung der zu betrachtenden Messwerte (**Lange, 2001**).

Wilcoxon-Test

Da nach dem ANDERSON-DARLING-Test nicht alle Daten normalverteilt waren, musste für dieses Datenkollektiv ein anderer Signifikanztest eingesetzt werden. Der WILCOXON-Test für Paardifferenzen ist der optimale Test für den Vergleich zweier verbundener Stichproben bei nicht normalverteilten Differenzen (**Sachs, 2003**). Dieser Test gestattet die Prüfung, ob die Differenzen paarig angeordneter Beobachtungen symmetrisch mit dem Median gleich Null verteilt sind und beruht somit ebenfalls auf dem Prinzip die Nullhypothese anzunehmen oder abzulehnen.

$$z = \frac{T - E(T)}{\sigma_T}$$

mit

$$E(T) = \frac{N(N+1)}{4}; \sigma_T^2 = \frac{N(N+1)(2N+1)}{24}$$

T = Summe der Ränge mit dem weniger häufigen Vorzeichen

N = Stichprobenumfang

Lineare Regression

Um den Zusammenhang zwischen einer Einflussvariablen als Verursacher und einer Zielvariablen als Wirkung zu beschreiben, werden sogenannte Regressionsmodelle verwendet. Graphisch dargestellt wird der Zusammenhang zwischen den beiden Variablen in Form einer

Regressionsgeraden und der errechenbare Korrelationskoeffizient r gibt den Grad des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen an.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{vereinfacht zu:} \quad r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

x = Einflussvariable; y = Zielvariable

S = Kovarianz

Der Koeffizient r kann dabei Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Je näher r dem Wert ± 1 kommt, desto besser ist die Korrelation zwischen den beiden Variablen. Die Grenzfälle $r=+1$ und $r=-1$ treten auf, wenn schon alle gemessenen Punkte (x_i, y_i) auf einer Geraden liegen, wobei die Gerade für $r=+1$ steigt und für $r=-1$ fällt. Für $r=0$ verläuft die Gerade dann parallel zur x-Achse.

Ausreißer-Test

Zur Prüfung, ob ein Wert aufgrund seiner hohen Abweichung aus der Mittelwertbildung entfernt werden kann, wurde der Ausreißertest nach NALIMOV durchgeführt.

Es müssen für den Test mindestens drei Werte vorliegen. Die Kontrolle erfolgt auf den kleinsten und auf den größten Wert. Anschließend wird eine Prüfgröße PG nach der Formel:

$$PG = \frac{|x^* - MW|}{s_x} * \sqrt{\frac{N}{N-1}}$$

x^* = ausreißverdächtiger Wert

MW = Mittelwert

s_x = Standardabweichung

N = Anzahl der Stichproben

berechnet und mit dem Tabellenwert für die entsprechende Stichprobenzahl verglichen. Ist der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert, liegt nach NALIMOV kein Ausreißer vor. Die Tabelle und weitere Grundlagen sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen (*Gottwald, 2000*).

14. Literaturverzeichnis

- Abramoff MD, Magelhaes PJ, and Ram SJ.** (2004). Image Processing with ImageJ" *Biophotonics International* **11**(7): 36-42.
- Adamson, R.H., Thorgeirsson, U.P., and Sugimura, T.** (1996). Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. *Arch Toxicol Suppl* **18**, 303-318.
- Afaq, F., Abidi, P., and Rahman, Q.** (2000). N-acetyl L-cysteine attenuates oxidant-mediated toxicity induced by chrysotile fibers. *Toxicol Lett* **117**, 53-60.
- AFG-Markt.** Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauchs von Alkoholfreien Getränken nach Getränkearten 2003-2007. In *Der AFG-Markt 2007*, W.A.G. e.V., ed.
- Aggarwal, B.B., and Shishodia, S.** (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* **71**, 1397-1421.
- Aherne, S. A. and N. M. O'Brien** (2000). "Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells." *Nutr Cancer* **38**(1): 106-15.
- Ahn, K.S., Sethi, G., and Aggarwal, B.B.** (2007). Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic. *Curr Mol Med* **7**, 619-637.
- Akazome, Y.** (2004). Characteristics and physiological functions of polyphenols from apples. *Biofactors* **22**, 311-314.
- Aleksunes, L.M., and Manautou, J.E.** (2007). Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* **35**, 459-473.
- Altomare, E., Vendemiale, G., and Albano, O.** (1988). Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases. *Life Sci* **43**, 991-998.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Ammar, R.B., Bouhlel, I., Valenti, K., Sghaier, M.B., Kilani, S., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Laporte, F., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L.** (2007). Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays. *Chem Biol Interact* **168**, 171-183.
- Anderson, M.E.** (1997). Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacol* **38**, 65-78.
- Andlauer, W., J. Kolb, et al.** (2000). "Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine." *FEBS Lett* **475**(2): 127-30.
- Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Morand, C., Remesy, C., and Demigne, C.** (2003). Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J Nutr* **133**, 1860-1865.
- Aron, P. M. and J. A. Kennedy** (2008). "Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity." *Mol Nutr Food Res* **52**(1): 79-104.
- Arts, I.C., van de Putte, B., and Hollman, P.C.** (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of agricultural and food chemistry* **48**, 1746-1751.
- August, D.A., Landau, J., Caputo, D., Hong, J., Lee, M.J., and Yang, C.S.** (1999). Ingestion of green tea rapidly decreases prostaglandin E₂ levels in rectal mucosa in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 709-713.
- Aw, T.Y., Ookhtens, M., and Kaplowitz, N.** (1986). Mechanism of inhibition of glutathione efflux by methionine from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* **251**, G354-361.
- Babbs, C.F.** (1990). Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med* **8**, 191-200.
- Babbs, C.F.** (1992). Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* **13**, 169-181.
- Babcock, G.T.** (1999). How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12971-12973.

- Bagchi, D., C. K. Sen, et al.** (2004). "Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula." *Biochemistry (Mosc)* **69**(1): 75-80, 1 p preceding 75.
- Baker, S.S.; Baker, R. D. Jr.** (1992). Antioxidant enzymes in the differentiated Caco-2 cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*; Vol. **28**, No. 9-10.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J., and Motterlini, R.** (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* **371**, 887-895.
- Bamias, G., M. R. Nyce, et al.** (2005). "New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease." *Ann Intern Med* **143**(12): 895-904.
- Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., and Brigelius-Flohe, R.** (2005). The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* **25**, 4914-4923.
- Barth, S.W., Faehndrich, C., Bub, A., Watzl, B., Will, F., Dietrich, H., Rechkemmer, G., and Briviba, K.** (2007). Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 1181-1187.
- Barth, S.W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K., and Rechkemmer, G.** (2005). Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* **26**, 1414-1421.
- Baum, L., Chen, X., Cheung, W.S., Cheung, C.K., Cheung, L.W., Chiu, K.F., Wen, H.M., Poon, P., Woo, K.S., Ng, H.K., and Wong, K.S.** (2007). Polymorphisms and vascular cognitive impairment after ischemic stroke. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **20**, 93-99.
- Beck, M.A., Esworthy, R.S., Ho, Y.S., and Chu, F.F.** (1998). Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J* **12**, 1143-1149.
- Beckman, J.S., and Koppenol, W.H.** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**, C1424-1437.
- Behne, D., and Kyriakopoulos, A.** (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* **21**, 453-473.
- Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R.M.** (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* **31**, 1441-1444.
- Bekris, L.M., Shephard, C., Janer, M., Graham, J., McNeney, B., Shin, J., Zarghami, M., Griffith, W., Farin, F., Kavanagh, T.J., and Lernmark, A.** (2007). Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **115**, 221-228.
- Bellion, P., Hofmann, T., Pool-Zobel, B.L., Will, F., Dietrich, H., Knaup, B., Richling, E., Baum, M., Eisenbrand, G., and Janzowski, C.** (2008). Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 6310-6317.
- Bellion, P., Olk, M., Will, F., Dietrich, H., Baum, M., Eisenbrand, G., and Janzowski, C.** (2009). Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular nutrition & food research*.
- Berger NA.** (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage *Radiat. Res.* **101**, 4-15.
- Beutler, E., Moroosse, R., Kramer, L., Gelbart, T., and Forman, L.** (1990). Gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency and hemolytic anemia. *Blood* **75**, 271-273.
- Beyer, W.F., Jr., and Fridovich, I.** (1985). Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochemistry* **24**, 6460-6467.
- Bhaskar, L., B. S. Ramakrishna, et al.** (1995). "Colonic mucosal antioxidant enzymes and lipid peroxide levels in normal subjects and patients with ulcerative colitis." *J Gastroenterol Hepatol* **10**(2): 140-3.
- Blais, A.** (1991). "Expression of Na(+)-coupled sugar transport in HT-29 cells: modulation by glucose." *Am J Physiol* **260**(6 Pt 1): C1245-52.
- Blaut, M., L. Schoefer, et al.** (2003). "Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms." *Int J Vitam Nutr Res* **73**(2): 79-87.

- BMBF** (2004-2008). Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmerkrankungen und Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung. Jahresbericht 2004.
- Bodmer, W.F.** (1999). 1998 Runme Shaw Memorial Lecture: somatic evolution of cancer. *Ann Acad Med Singapore* **28**, 323-329.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, et al.** (2000). "Role of quinones in toxicology." *Chem Res Toxicol* **13**(3): 135-60.
- Boyer, J., and Liu, R.H.** (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* **3**, 5.
- Boyer, J., Brown, D., and Liu, R.H.** (2004). Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 7172-7179.
- Boyer, J., D. Brown, et al.** (2005). "In vitro digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer." *Nutr J* **4**: 1.
- Bravard, J. Beaumatin, E. Dussaulx, T. Lesuffleur, A. Zweibaum, C. Luccioni** (1994). Modifications of the anti-oxidant metabolism during proliferation and differentiation of colon tumor cell line. *International Journal of Cancer*. Vol. **59** Issue 6, Pages 843 - 847
- Bravo, J., Fita, I., Gouet, P., Jouve, H. M., Melik-Adamy, W., Murshudow, G. N.** (1997). *Oxidative Stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. (Raleigh: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Bremer, H.J.D., M.; Kamerling, J. P., et al.** (1981). *Disturbances of Amino acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. (Urban and Schwarzenberg).
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., and Sies, H.** (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* **26**, 256-267.
- Bridgeman, M.M., Marsden, M., Selby, C., Morrison, D., and MacNee, W.** (1994). Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax* **49**, 670-675.
- Brigelius-Flohe, R.** (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* **387**, 1329-1335.
- Brigelius-Flohe, R., and Banning, A.** (2006). Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene regulation. Sulforaphane and selenium, partners in adaptive response and prevention of cancer. *Free Radic Res* **40**, 775-787.
- Briviba, K., Stracke, B.A., Rufer, C.E., Watzl, B., Weibel, F.P., and Bub, A.** (2007). Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 7716-7721.
- Brown, J. E., H. Khodr, et al.** (1998). "Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties." *Biochem J* **330 (Pt 3)**: 1173-8.
- Burda, S., and Oleszek, W.** (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 2774-2779.
- Burdon, R.H.** (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* **18**, 775-794.
- Bustin, S.A., and Mueller, R.** (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* **109**, 365-379.
- Butland, B.K., Fehily, A.M., and Elwood, P.C.** (2000). Diet, lung function, and lung function decline in a cohort of 2512 middle aged men. *Thorax* **55**, 102-108.
- Cai, J., Huang, Z.Z., and Lu, S.C.** (1997). Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem J* **326 (Pt 1)**, 167-172.
- Cai, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P., Jr., and Jones, D.P.** (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* **19**, 205-221.
- Calabrese, E. J., E. J. Stanek, 3rd, et al.** (2008). "Hormesis predicts low-dose responses better than threshold models." *Int J Toxicol* **27**(5): 369-78.
- Cao, G., and Prior, R.L.** (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* **44**, 1309-1315.
- Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M., Nguyen, A.T., Thevenin, M., Jaudon, M.C., Zingraff, J., Verger, C., Jungers, P., and Descamps-Latscha, B.** (1996). Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* **21**, 845-853.

- Chai, P.C., Long, L.H., and Halliwell, B.** (2003). Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 650-654.
- Chan, A., Graves, V., and Shea, T.B.** (2006). Apple juice concentrate maintains acetylcholine levels following dietary compromise. *J Alzheimers Dis* **9**, 287-291.
- Chan, K., and Kan, Y.W.** (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12731-12736.
- Chan, K., Han, X.D., and Kan, Y.W.** (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4611-4616.
- Chance, B., and Herbert, D.** (1950). The enzymesubstrate compounds of bacterial catalase and peroxides. *Biochem J* **46**, 402-414.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Chang, L.S.** (1996). The functional involvement of Lys-38 in the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase: chemical modification and mutagenesis studies. *J Protein Chem* **15**, 321-326.
- Chang, M.S., Lee, S.G., and Rho, H.M.** (1999). Transcriptional activation of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase genes by panaxadiol ginsenosides extracted from *Panax ginseng*. *Phytother Res* **13**, 641-644.
- Chawla, R.K., Lewis, F.W., Kutner, M.H., Bate, D.M., Roy, R.G., and Rudman, D.** (1984). Plasma cysteine, cystine, and glutathione in cirrhosis. *Gastroenterology* **87**, 770-776.
- Chen, C., and Kong, A.N.** (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med* **36**, 1505-1516.
- Chen, C.Y., Jang, J.H., Li, M.H., and Surh, Y.J.** (2005). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 993-1000.
- Chen, D., Milacic, V., Chen, M.S., Wan, S.B., Lam, W.H., Huo, C., Landis-Piowar, K.R., Cui, Q.C., Wali, A., Chan, T.H., and Dou, Q.P.** (2008). Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol* **23**, 487-496.
- Chen, J., Rider, D.A., and Ruan, R.** (2006). Identification of valid housekeeping genes and antioxidant enzyme gene expression change in the aging rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 20-27.
- Chen, M.S., Chen, D., and Dou, Q.P.** (2004). Inhibition of proteasome activity by various fruits and vegetables is associated with cancer cell death. *In Vivo* **18**, 73-80.
- Chen, P. N., S. C. Chu, et al.** (2006). "Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line." *Cancer Lett* **235**(2): 248-59.
- Chen, Y., Saari, J.T., and Kang, Y.J.** (1995). Expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in the liver of copper-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **210**, 102-106.
- Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nebert, D.W., and Dalton, T.P.** (2005). Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem* **280**, 33766-33774.
- Chen, Y., Yang, Y., Miller, M.L., Shen, D., Shertzer, H.G., Stringer, K.F., Wang, B., Schneider, S.N., Nebert, D.W., and Dalton, T.P.** (2007). Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology* **45**, 1118-1128.
- Cheng, K.W., Wu, Q., Zheng, Z.P., Peng, X., Simon, J.E., Chen, F., and Wang, M.** (2007). Inhibitory effect of fruit extracts on the formation of heterocyclic amines. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 10359-10365.
- Cheng, W.H., Combs, G.F., Jr., and Lei, X.G.** (1998). Knockout of cellular glutathione peroxidase affects selenium-dependent parameters similarly in mice fed adequate and excessive dietary selenium. *Biofactors* **7**, 311-321.
- Cheng, Y.Y., and Qian, P.C.** (1990). The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomed Environ Sci* **3**, 422-428.
- Chia, V.M., Newcomb, P.A., Bigler, J., Morimoto, L.M., Thibodeau, S.N., and Potter, J.D.** (2006). Risk of microsatellite-unstable colorectal cancer is associated jointly with smoking and nonsteroidal anti-inflammatory drug use. *Cancer Res* **66**, 6877-6883.

- Chiou, T. J. and W. F. Tzeng** (2000). "The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress." *Toxicology* **154**(1-3): 75-84.
- Chiou, T. J., Y. T. Wang, et al.** (1999). "DT-diaphorase protects against menadione-induced oxidative stress." *Toxicology* **139**(1-2): 103-10.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, et al.** (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." *Biochemistry* **18**(24): 5294-9.
- Cho, H.Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.Y., and Kleiberger, S.R.** (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 175-182.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Chrzczanowicz, J., Gawron, A., Zwolinska, A., de Graft-Johnson, J., Krajewski, W., Krol, M., Markowski, J., Kostka, T., and Nowak, D.** (2008). Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clin Chem Lab Med* **46**, 342-349.
- Chu, F.F., and Esworthy, R.S.** (1995). The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* **323**, 288-294.
- Chu, F.F., Doroshov, J.H., and Esworthy, R.S.** (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* **268**, 2571-2576.
- Clifford, M.N., Scalbert, A.** (2000). Ellagitannins - occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric* **80**, 1118-1125.
- Cohen, E., I. Ophir, et al.** (1999). "Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line." *J Cell Sci* **112 (Pt 16)**: 2657-66.
- Combs, G.F., Jr., and Gray, W.P.** (1998). Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* **79**, 179-192.
- Coppola, S., and Ghibelli, L.** (2000). GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* **28**, 56-61.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., and Remesy, C.** (2001). Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr* **131**, 2109-2114.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N.** (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* **26**, 1001-1043.
- Custodio, H.M., Harari, R., Gerhardsson, L., Skerfving, S., and Broberg, K.** (2005). Genetic influences on the retention of inorganic mercury. *Arch Environ Occup Health* **60**, 17-23.
- Davie, J.R.** (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S-2493S.
- Davis, P.A., Polagruto, J.A., Valacchi, G., Phung, A., Soucek, K., Keen, C.L., and Gershwin, M.E.** (2006). Effect of apple extracts on NF-kappaB activation in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 594-598.
- Day, A. J., J. M. Gee, et al.** (2003). "Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter." *Biochem Pharmacol* **65**(7): 1199-206.
- DCCV e.V.** (2009). "Deutsche Morbus Chron/ Colitis Ulcerosa Vereinigung, DCCV e.V.", from www.dccv.de.
- DeLeve, L.D., and Kaplowitz, N.** (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* **52**, 287-305.
- De Murcia J. M., Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G.** (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7303-7307.
- Deneo-Pellegrini, H., De Stefani, E., and Ronco, A.** (1996). Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay. *Nutr Cancer* **25**, 297-304.

- Deprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., and Scalbert, A.** (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr* **130**, 2733-2738.
- D'Haese, P.C., and De Broe, M.E.** (1996). Adequacy of dialysis: trace elements in dialysis fluids. *Nephrol Dial Transplant* **11 Suppl 2**, 92-97.
- Dickinson, D.A., Iles, K.E., Zhang, H., Blank, V., and Forman, H.J.** (2003). Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *FASEB J* **17**, 473-475.
- Ding, M., Lu, Y., Bowman, L., Huang, C., Leonard, S., Wang, L., Vallyathan, V., Castranova, V., and Shi, X.** (2004). Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract. *J Biol Chem* **279**, 10670-10676.
- Dinkova-Kostova, A.T.** (2002). Protection against cancer by plant phenylpropanoids: induction of mammalian anticarcinogenic enzymes. *Mini Rev Med Chem* **2**, 595-610.
- Dinkova-Kostova, A.T., Fahey, J.W., Wade, K.L., Jenkins, S.N., Shapiro, T.A., Fuchs, E.J., Kerns, M.L., and Talalay, P.** (2007). Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 847-851.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., and Wakabayashi, N.** (2005). Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **44**, 6889-6899.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P.** (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11908-11913.
- Dolphin, D., Forman, A., Borg, D.C., Fajer, J., and Felton, R.H.** (1971). Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: pi-cation radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 614-618.
- Donovan, J.L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., and Remesy, C.** (2001). Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr* **131**, 1753-1757.
- Drew, J.E., Farquharson, A.J., Arthur, J.R., Morrice, P.C., and Duthie, G.G.** (2005). Novel sites of cytosolic glutathione peroxidase expression in colon. *FEBS Lett* **579**, 6135-6139.
- DuPont, M.S., Bennett, R.N., Mellon, F.A., and Williamson, G.** (2002). Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *J Nutr* **132**, 172-175.
- Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., and Liu, R.H.** (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* **405**, 903-904.
- Ebert, M. N., A. Klinder, et al.** (2003). "Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate." *Carcinogenesis* **24**(10): 1637-44.
- Eggler, A.L., Liu, G., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B., and Mesecar, A.D.** (2005). Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10070-10075.
- Elder, D.J., Halton, D.E., Crew, T.E., and Paraskeva, C.** (2000). Apoptosis induction and cyclooxygenase-2 regulation in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines by the cyclooxygenase-2-selective non-steroidal anti-inflammatory drug NS-398. *International journal of cancer* **86**, 553-560.
- Emmerich, B.** (2004). *Innere Medizin*, Bruckmeier Verlag.
- Esworthy, R. S., F. F. Chu, et al.** (1993). "Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione." *Arch Biochem Biophys* **307**(1): 29-34.
- Esworthy, R.S., Swiderek, K.M., Ho, Y.S., and Chu, F.F.** (1998). Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim Biophys Acta* **1381**, 213-226.
- Faintuch, J., Aguilar, P.B., and Nadalin, W.** (1999). Relevance of N-acetylcysteine in clinical practice: fact, myth or consequence? *Nutrition* **15**, 177-179.
- Farber, H.W., and Rounds, S.** (1990). Effect of long-term hypoxia on cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells. *Exp Cell Res* **191**, 27-36.

- Favreau, L.V., and Pickett, C.B.** (1995). The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines. *J Biol Chem* **270**, 24468-24474.
- Feng, R., H. M. Ni, et al.** (2007). "Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress." *J Biol Chem* **282**(18): 13468-76.
- Ferguson, L.R.** (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res* **307**, 395-410.
- Ferguson, L.R., Zhu, S., and Kestell, P.** (2003). Contrasting effects of non-starch polysaccharide and resistant starch-based diets on the disposition and excretion of the food carcinogen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), in a rat model. *Food Chem Toxicol* **41**, 785-792.
- Fernández-Checa, J.L., S. C.; Ookthens, M.; DeLeve, L.; Runnegar, M.; Yoshida, H.; Saiki, H.; Kannan, R.; Garcia-Ruiz, C.; Kuhlenkamp, J. F.; Kaplowitz, N.** (1992). *The Regulation of Hepatic Glutathione.* (Marcel Dekker, NY).
- Fernandez-Pachon, M.S., Bakkali, F., Villano, D., Troncoso, A.M., and Garcia-Parrilla, M.C.** (2006). Acute intake of red wine does not affect antioxidant enzymes activities in human subjects. *Int J Vitam Nutr Res* **76**, 291-298.
- Fernandez-Pachon, M.S., Berna, G., Otaolauruchi, E., Troncoso, A.M., Martin, F., and Garcia-Parrilla, M.C.** (2009). Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 6578-6583.
- Ferre, F.** (1992). "Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth." *PCR Methods Appl* **2**(1): 1-9.
- Ferre, F.** (1994). "Polymerase chain reaction and HIV." *Clin Lab Med* **14**(2): 313-33.
- Feskanich, D., Ziegler, R.G., Michaud, D.S., Giovannucci, E.L., Speizer, F.E., Willett, W.C., and Colditz, G.A.** (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1812-1823.
- Finkelstein, J.D.** (1990). Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* **1**, 228-237.
- Fleschhut, J., F. Kratzer, et al.** (2006). "Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro." *Eur J Nutr* **45**(1): 7-18.
- Foote, C.S.V., J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. F.** (1985). *Active Oxygen in Chemistry.* (Chapman & Hall, New York).
- Foster, H.D.** (2004). How HIV-1 causes AIDS: implications for prevention and treatment. *Med Hypotheses* **62**, 549-553.
- Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., and Kavanagh, T.J.** (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med* **30**,
- Fraser, J.A., Kansagra, P., Kotecki, C., Saunders, R.D., and McLellan, L.I.** (2003). The modifier subunit of *Drosophila* glutamate-cysteine ligase regulates catalytic activity by covalent and noncovalent interactions and influences glutathione homeostasis in vivo. *J Biol Chem* **278**, 46369-46377.
- Fraser, J.A., Saunders, R.D., and McLellan, L.I.** (2002). *Drosophila melanogaster* glutamate-cysteine ligase activity is regulated by a modifier subunit with a mechanism of action similar to that of the mammalian form. *J Biol Chem* **277**, 1158-1165.
- Fridovich, I.** (1986). Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**, 61-97.
- Fridovich, I.** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**, 97-112.
- Fridrich, D., Kern, M., Fritz, J., Pahlke, G., Kohler, N., Winterhalter, P., and Marko, D.** (2007). The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Molecular nutrition & food research* **51**, 192-200.
- Fridrich, D., Kern, M., Pahlke, G., Volz, N., Will, F., Dietrich, H., and Marko, D.** (2007). Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Molecular nutrition & food research* **51**, 594-601.
- Frighetto, R.T.S., Welendorf, R. M., Nigro, E. N., Frighetto, N., Siani, A. C.** (2008). Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chemistry* **106**, 767-771.

- Fu, Y., Zheng, S., Lu, S.C., and Chen, A.** (2008). Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis. *Mol Pharmacol* **73**, 1465-1473.
- Galloway, D.C., Blake, D.G., Shepherd, A.G., and McLellan, L.I.** (1997). Regulation of human gamma-glutamylcysteine synthetase: co-ordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in HepG2 cells. *Biochem J* **328** (Pt 1), 99-104.
- Gallus, S., Talamini, R., Giacosa, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Franceschi, S., Negri, E., and La Vecchia, C.** (2005). Does an apple a day keep the oncologist away? *Ann Oncol* **16**, 1841-1844.
- Galvano, F., L. La Fauci, et al.** (2004). "Cyanidins: metabolism and biological properties." *J Nutr Biochem* **15**(1): 2-11.
- Gastell, S., Lochs, H.** (2002). "Bauchredner". In DCCV-Journal (Deutsche Morbus Chron/ Colitis Ulcerosa Vereinigung (DCCV e.V.)), pp. 23.
- Ge, K., and Yang, G.** (1993). The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr* **57**, 259S-263S.
- Geiger, P. G., F. Lin, et al.** (1993). "Selenoperoxidase-mediated cytoprotection against the damaging effects of tert-butyl hydroperoxide on leukemia cells." *Free Radic Biol Med* **14**(3): 251-66.
- Gerhauser, C.** (2007). Chemoprävention von Krebs. Forum Deutsche Krebsgesellschaft; Sonderheft 2007: Fokus Prävention, 5-8.
- Gerhauser, C.** (2008). Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med* **74**, 1608-1624.
- Gerhauser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauff, J., Liu, G.Y., Sitthimonchai, S., and Frank, N.** (2003). Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* **523-524**, 163-172.
- Gerhauser, C., Klimo, K., Kahle, K., Garreta, A., Steinle, R., Scheppach, W., .** (2008). Cancer chemopreventive potential of apple juice - Results of a short-term human intervention study with ileostomy patients. *EJC Supplements* **6**, 50.
- Ghibelli, L., Coppola, S., Fanelli, C., Rotilio, G., Civitareale, P., Scovassi, A.I., and Ciriolo, M.R.** (1999). Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* **13**, 2031-2036.
- Ginzinger, D. G.** (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream." *Exp Hematol* **30**(6): 503-12.
- Gipp, J.J., Bailey, H.H., and Mulcahy, R.T.** (1995). Cloning and sequencing of the cDNA for the light subunit of human liver gamma-glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 584-589.
- Glei, M., and Pool-Zobel, B.L.** (2006). The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicol In Vitro* **20**, 295-300.
- Glei, M., Habermann, N., Osswald, K., Seidel, C., Persin, C., Jahreis, G., and Pool-Zobel, B.L.** (2005). Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: a biomarker model. *Biomarkers* **10**, 203-217.
- Goda, S.K., and Minton, N.P.** (1995). A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res* **23**, 3357-3358.
- Gonthier, M.P., Donovan, J.L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., and Scalbert, A.** (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med* **35**, 837-844.
- Gonthier, M.P., Verny, M.A., Besson, C., Remesy, C., and Scalbert, A.** (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* **133**, 1853-1859.
- Gonzalez-Gallego, J., Sanchez-Campos, S., and Tunon, M.J.** (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* **22**, 287-293.
- Goodlad, R.A., Ratcliffe, B., Lee, C.Y., and Wright, N.A.** (1995). Dietary fibre and the gastrointestinal tract: differing trophic effects on muscle and mucosa of the stomach, small intestine and colon. *Eur J Clin Nutr* **49 Suppl 3**, S178-181.
- Gosse, F., Roussi, S., Guyot, S., Schoenfelder, A., Mann, A., Bergerat, J.P., Seiler, N., and Raul, F.** (2006). Potentiation of apple procyanidin-triggered apoptosis by the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 in human colon cancer-derived metastatic cells. *Int J Oncol* **29**, 423-428.

- Gottwald, W.** (2000). Statistik für Anwender, Wiley-VCH-Verlag.
- Grant, C.M., MacIver, F.H., and Dawes, I.W.** (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* **8**, 1699-1707.
- Griffith, O.W., and Meister, A.** (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**, 7558-7560.
- Griffith, O.W., and Mulcahy, R.T.** (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **73**, 209-267, xii.
- Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., and Prior, R.L.** (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* **134**, 613-617.
- Gul, M., Kutay, F.Z., Temocin, S., and Hanninen, O.** (2000). Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol* **38**, 625-634.
- Gupta, M., Dobashi, K., Greene, E.L., Orak, J.K., and Singh, I.** (1997). Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* **176**, 337-347.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., and Drilleau, J.F.** (2001). Direct thiolysis on crude apple materials for high-performance liquid chromatography characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices. *Methods Enzymol* **335**, 57-70.
- Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuenod, M., and Do, K.Q.** (2007). Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16621-16626.
- Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., and Lee, W.J.** (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**, 847-850.
- Ha, K.N., Chen, Y., Cai, J., and Sternberg, P., Jr.** (2006). Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf2-dependent pathway by zinc in the RPE: implication for protection against oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 2709-2715.
- Hakimuddin, F., G. Paliyath, et al.** (2004). "Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells." *Breast Cancer Res Treat* **85**(1): 65-79.
- Halliwell, B.** (2000). The antioxidant paradox. *Lancet* **355**, 1179-1180.
- Halliwell, B.** (2003). Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett* **540**, 3-6.
- Halliwell, B.** (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Clarendon Press Oxford).
- Halliwell, B.** (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**, 1634-1658.
- Halliwell, B.** (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* **73**, 341-347.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.** (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**, 501-514.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.** (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* **280**, 1-8.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.** (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* **18**, 125-126.
- Halliwell, B., Rafter, J., and Jenner, A.** (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* **81**, 268S-276S.
- Halliwell, B., Zhao, K., and Whiteman, M.** (1999). Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* **31**, 651-669.
- Hamilton, D., Wu, J.H., and Batist, G.** (2007). Structure-based identification of novel human gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitors. *Mol Pharmacol* **71**, 1140-1147.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams** (2001). "Anthocyanins and other flavonoids." *Nat Prod Rep* **18**(3): 310-33.
- Harborne, J. B. and H. S. Sherratt** (1957). "Variations in the glycosidic pattern of anthocyanins. II." *Experientia* **13**(12): 486-7.

- Hargreaves, R. H., J. A. Hartley, et al.** (2000). "Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents: DNA alkylation by aziridinylquinones." *Front Biosci* **5**: E172-80.
- Harvey, C. J., R. K. Thimmulappa, et al.** (2009). "Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **46**(4): 443-53.
- Hashimoto, T., Hashimoto, K., Miyatake, R., Matsuzawa, D., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., and Iyo, M.** (2008). Association study between polymorphisms in glutathione-related genes and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**, 1040-1046.
- Hassan, H.M., and Schrum, L.W.** (1994). Roles of manganese and iron in the regulation of the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **14**, 315-323.
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., and McMahon, M.** (2009). Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci* **111**, 199-201.
- He, X., and Liu, R.H.** (2007). Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 4366-4370.
- He, X., and Liu, R.H.** (2008). Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 9905-9910.
- He, X., Chen, M.G., Lin, G.X., and Ma, Q.** (2006). Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x Maf to the antioxidant response element enhancer. *J Biol Chem* **281**, 23620-23631.
- Head, K., and Jurenka, J.S.** (2004). Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* **9**, 360-401.
- Hempel, S. L., G. R. Buettner, et al.** (1999). "Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123." *Free Radic Biol Med* **27**(1-2): 146-59.
- Hensel, A., and Meier, K.** (1999). Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. *Planta Med* **65**, 395-399.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, et al.** (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study." *Lancet* **342**(8878): 1007-11.
- Hibi, T., Nii, H., Nakatsu, T., Kimura, A., Kato, H., Hiratake, J., and Oda, J.** (2004). Crystal structure of gamma-glutamylcysteine synthetase: insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15052-15057.
- Hill, M.J., Morson, B.C., and Bussey, H.J.** (1978). Aetiology of adenoma--carcinoma sequence in large bowel. *Lancet* **1**, 245-247.
- Ho, Y.S., and Crapo, J.D.** (1988). Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett* **229**, 256-260.
- Hoffmann, R.G., and Lim, H.J.** (2007). Observational study design. *Methods Mol Biol* **404**, 19-31.
- Hoffmann, T.K.** (2008). ["An apple a day keeps the doctor away". DNA protection by polyphenols]. *HNO* **56**, 750-751.
- Hofmann, T., Liegibel, U., Winterhalter, P., Bub, A., Reckemmer, G., and Pool-Zobel, B.L.** (2006). Intervention with polyphenol-rich fruit juices results in an elevation of glutathione S-transferase P1 (hGSTP1) protein expression in human leucocytes of healthy volunteers. *Molecular nutrition & food research* **50**, 1191-1200.
- Holland, P. W.** (1991). "Cloning and evolutionary analysis of msh-like homeobox genes from mouse, zebrafish and ascidian." *Gene* **98**(2): 253-7.
- Hollman, P. C., J. M. van Trijp, et al.** (1997). "Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man." *Cancer Lett* **114**(1-2): 139-40.
- Horl, W. H.** (1999). "[Nutrition in acute and chronic kidney replacement therapy]." *Internist (Berl)* **40**(1): 49-54.

- Hou, D. X., M. Fujii, et al.** (2004). "Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins." *J Biomed Biotechnol* **2004**(5): 321-325.
- Hsu, J.L., Hsieh, Y., Tu, C., O'Connor, D., Nick, H.S., and Silverman, D.N.** (1996). Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* **271**, 17687-17691.
- Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M.R., Khor, T.O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J.Y., and Kong, A.N.** (2006). Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. *Life Sci* **79**, 1944-1955.
- Hu, Y.J., and Diamond, A.M.** (2003). Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* **63**, 3347-3351.
- Huang, C.S., He, W., Meister, A., and Anderson, M.E.** (1995). Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1232-1236.
- Huang, C.S., Moore, W.R., and Meister, A.** (1988). On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2464-2468.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 1841-1856.
- Huang, H.C., Nguyen, T., and Pickett, C.B.** (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12475-12480.
- Huang, Z.A., Yang, H., Chen, C., Zeng, Z., and Lu, S.C.** (2000). Inducers of gamma-glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 48-55.
- Hubert, C.** (2004). *Chronische Darmkrankheiten des Menschen, Akademische Abhandlungen zur Biologie*, Verlag für Wissenschaft und Forschung mbH.
- Huemmer, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., and Richling, E.** (2008). Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnology journal* **3**, 234-243.
- Huet, C., C. Sahuquillo-Merino, et al.** (1987). "Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation." *J Cell Biol* **105**(1): 345-57.
- Hugot, J. P., P. Laurent-Puig, et al.** (1995). "[Genetics of inflammatory bowel diseases]." *Gastroenterol Clin Biol* **19**(11): 890-8.
- Hutter, D.E., Till, B.G., and Greene, J.J.** (1997). Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Exp Cell Res* **232**, 435-438.
- Hwang, C., Sinsky, A.J., and Lodish, H.F.** (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**, 1496-1502.
- Hyson, D., Studebaker-Hallman, D., Davis, P.A., and Gershwin, M.E.** (2000). Apple juice consumption reduces plasma low-density lipoprotein oxidation in healthy men and women. *J Med Food* **3**, 159-166.
- Iantomasi, T., Marraccini, P., Favilli, F., Vincenzini, M.T., Ferretti, P., and Tonelli, F.** (1994). Glutathione metabolism in Crohn's disease. *Biochem Med Metab Biol* **53**, 87-91.
- Imai, H., and Nakagawa, Y.** (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **34**, 145-169.
- Inamdar, N.M., Ahn, Y.I., and Alam, J.** (1996). The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 570-576.
- Ito, H., Gonthiera, M.P., Manach, C., Morand, C., Mennen, L., Remesy, C., and Scalbert, A.** (2004). High-throughput profiling of dietary polyphenols and their metabolites by HPLC-ESI-MS-MS in human urine. *Biofactors* **22**, 241-243.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y.** (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 313-322.
- Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., and Yamamoto, M.** (1999). Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res* **31**, 319-324.

- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., and Yamamoto, M.** (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* **8**, 379-391.
- Itzkowitz, S. H. and X. Yio** (2004). "Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(1): G7-17.
- Jaiswal, A.K.** (2004). Regulation of antioxidant response element-dependent induction of detoxifying enzyme synthesis. *Methods Enzymol* **378**, 221-238.
- Jakubikova, J., Sedlak, J., Bod'o, J., and Bao, Y.** (2006). Effect of isothiocyanates on nuclear accumulation of NF-kappaB, Nrf2, and thioredoxin in caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 1656-1662.
- Jedrychowski, W., and Maugeri, U.** (2009). An apple a day may hold colorectal cancer at bay: recent evidence from a case-control study. *Rev Environ Health* **24**, 59-74.
- Jedrychowski, W., Maugeri, U., Popiela, T., Kulig, J., Sochacka-Tatara, E., Pac, A., Sowa, A., and Musial, A.** (2009). Case-control study on beneficial effect of regular consumption of apples on colorectal cancer risk in a population with relatively low intake of fruits and vegetables. *Eur J Cancer Prev*.
- Jenner, A.M., Rafter, J., and Halliwell, B.** (2005). Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* **38**, 763-772.
- Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S., Park, Y.B., and Choi, M.S.** (2002). Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin Chim Acta* **317**, 181-190.
- Jez, J.M., and Penning, T.M.** (2001). The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact* **130-132**, 499-525.
- Jiao, H. and S. Y. Wang** (2000). "Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry." *J Agric Food Chem* **48**(11): 5672-6.
- Johnston, L.** (1999). *Colon and Rectal Cancer, O'Reilly Media / Patient Centered Guides*.
- Jonsson, L.S., Broberg, K., Bergendorf, U., Axmon, A., Littorin, M., and Jonsson, B.A.** (2007). Levels of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) and effect modification of polymorphisms of glutathione-related genes in vulcanization workers in the southern Sweden rubber industries. *Int Arch Occup Environ Health* **80**, 589-598.
- Jung, M., Triebel, S., Anke, T., Richling, E., and Erkel, G.** (2009). Influence of apple polyphenols on inflammatory gene expression. *Molecular nutrition & food research* **53**, 1263-1280.
- Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., Erk, T., and Richling, E.** (2007). Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 10605-10614.
- Kahle, K., Kraus, M., and Richling, E.** (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular nutrition & food research* **49**, 797-806.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., and Richling, E.** (2006). Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Molecular nutrition & food research* **50**, 418-423.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., and Richling, E.** (2005). Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Molecular nutrition & food research* **49**, 1143-1150.
- Kang, E.S., Woo, I.S., Kim, H.J., Eun, S.Y., Paek, K.S., Chang, K.C., Lee, J.H., Lee, H.T., Kim, J.H., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C., and Seo, H.G.** (2007). Up-regulation of aldose reductase expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Nrf2 is involved in the protective effect of curcumin against oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **43**, 535-545.
- Kang, H., Schneider, H., and Rudd, C.E.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase p85 adaptor function in T-cells. Co-stimulation and regulation of cytokine transcription independent of associated p110. *J Biol Chem* **277**, 912-921.
- Kang, K.W., Ryu, J.H., and Kim, S.G.** (2000). The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction by decreased glutathione in H4IIE hepatoma cells. *Mol Pharmacol* **58**, 1017-1025.

- Kang, M. I., A. Kobayashi, et al.** (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 2046-51.
- Kanner, J., and Lapidot, T.** (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* **31**, 1388-1395.
- Katoh, Y., K. Iida, et al.** (2005). "Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome." *Arch Biochem Biophys* **433**(2): 342-50.
- Kautenburger, T., Beyer-Sehlmeyer, G., Festag, G., Haag, N., Kuhler, S., Kuchler, A., Weise, A., Marian, B., Peters, W.H., Liehr, T., Claussen, U., and Pool-Zobel, B.L.** (2005). The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **131**, 692-700.
- Kay, C.D.** (2006). Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr Res Rev* **19**, 137-146.
- Kay, C.D., Kroon, P.A., and Cassidy, A.** (2009). The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular nutrition & food research* **53 Suppl 1**, S92-101.
- Kay, C.D., Mazza, G., Holub, B.J., and Wang, J.** (2004). Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr* **91**, 933-942.
- Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussler, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G., Rufer, C., and Marko, D.** (2007). Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Molecular nutrition & food research* **51**, 1163-1172.
- Kern, M., Pahlke, G., Balavenkatraman, K.K., Bohmer, F.D., and Marko, D.** (2007). Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 4999-5006.
- Kern, M., Pahlke, G., Ngiewih, Y., and Marko, D.** (2006). Modulation of key elements of the Wnt pathway by apple polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 7041-7046.
- Kern, M., Tjaden, Z., Ngiewih, Y., Puppel, N., Will, F., Dietrich, H., Pahlke, G., and Marko, D.** (2005). Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Molecular nutrition & food research* **49**, 317-328.
- Kerry, N. and C. Rice-Evans** (1998). "Peroxynitrite oxidises catechols to o-quinones." *FEBS Lett* **437**(3): 167-71.
- Kestell, P., Zhu, S., and Ferguson, L.R.** (2004). Mechanisms by which resistant starches and non-starch polysaccharide sources affect the metabolism and disposition of the food carcinogen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **802**, 201-210.
- Khan, A.U., and Wilson, T.** (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* **2**, 437-445.
- Kibbe, W.A.** (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **35**, W43-46.
- Kidd, P.M.** (1997). Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* **1**, 155-176.
- Kidd, P.M.** (2000). Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev* **5**, 502-529.
- Kim, Y.C., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Itoh, K., Yamamoto, M., and Yodoi, J.** (2001). Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J Biol Chem* **276**, 18399-18406.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-170.
- Kisselev, A.F., and Goldberg, A.L.** (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* **8**, 739-758.
- Klaunig, J.E., and Kamendulis, L.M.** (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 239-267.
- Klinder, A., Forster, A., Caderni, G., Femia, A.P., and Pool-Zobel, B.L.** (2004). Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics

- (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer* **49**, 144-155.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A.** (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* **76**, 560-568.
- Ko, S.H., Choi, S.W., Ye, S.K., Cho, B.L., Kim, H.S., and Chung, M.H.** (2005). Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J Med Food* **8**, 41-46.
- Kobayashi, M., and Yamamoto, M.** (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* **7**, 385-394.
- Koch, T. R., L. X. Yuan, et al.** (2000). "Total antioxidant capacity of colon in patients with chronic ulcerative colitis." *Dig Dis Sci* **45**(9): 1814-9.
- Kong, A.N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R., and Mandlekar, S.** (2001). Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev* **33**, 255-271.
- Kong, J. M., L. S. Chia, et al.** (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." *Phytochemistry* **64**(5): 923-33.
- Koski, L.B., and Golding, G.B.** (2001). The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *J Mol Evol* **52**, 540-542.
- Kramer, B.K.** (2001). Cyclo-oxygenase-2 and renal function. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 180-183.
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., and Williamson, G.** (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* **80**, 15-21.
- Krzywanski, D.M., Dickinson, D.A., Iles, K.E., Wigley, A.F., Franklin, C.C., Liu, R.M., Kavanagh, T.J., and Forman, H.J.** (2004). Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* **423**, 116-125.
- Kubik, A.K., Zatloukal, P., Tomasek, L., Pauk, N., Havel, L., Krepela, E., and Petruzelka, L.** (2004). Dietary habits and lung cancer risk among non-smoking women. *Eur J Cancer Prev* **13**, 471-480.
- Kundu, J.K., and Surh, Y.J.** (2005). Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. *Mutat Res* **591**, 123-146.
- Kuo, P.C., Abe, K., and Schroeder, R.A.** (2000). Superoxide enhances interleukin 1beta-mediated transcription of the hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene. *Gastroenterology* **118**, 608-618.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Kensler, T.W.** (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* **278**, 8135-8145.
- Kyle, J.A., Sharp, L., Little, J., Duthie, G.G., and McNeill, G.** (2009). Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. *Br J Nutr*, 1-8.
- Lam, C.K., Zhang, Z., Yu, H., Tsang, S.Y., Huang, Y., and Chen, Z.Y.** (2008). Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol. *Molecular nutrition & food research* **52**, 950-958.
- Lancaster, T., and Silagy, C.** (1994). Aspirin and neoplasia of the digestive tract: is there a chemopreventive effect? *Dig Dis* **12**, 170-176.
- Lane, N.** (2002). *Oxygen, the Molecule that made the World*. (Oxford University Press).
- Lange, K.** (2001). *Statistik Formelsammlung*, Verlag Wissenschaftliche Scripten.
- Lapidot, T., Walker, M.D., and Kanner, J.** (2002). Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *Journal of agricultural and food chemistry* **50**, 3156-3160.
- Lata, B., and Tomala, K.** (2007). Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds. Cultivar and year implication. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 10795-10802.

- Lata, B., Przeradzka, M., and Binkowska, M.** (2005). Great differences in antioxidant properties exist between 56 apple cultivars and vegetation seasons. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 8970-8978.
- Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., and Kolonel, L.N.** (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 154-160.
- LeBel, C. P., H. Ischiropoulos, et al.** (1992). "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." *Chem Res Toxicol* **5**(2): 227-31.
- Lee, J.I., Kang, J., and Stipanuk, M.H.** (2006). Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *Biochem J* **393**, 181-190.
- Lee, J.M., Li, J., Johnson, D.A., Stein, T.D., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., and Johnson, J.A.** (2005). Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* **19**, 1061-1066.
- Lee, J.S., and Surh, Y.J.** (2005). Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* **224**, 171-184.
- Lee, J.S., Oh, T.Y., Kim, Y.K., Baik, J.H., So, S., Hahm, K.B., and Surh, Y.J.** (2005). Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. *Mutat Res* **579**, 214-224.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.O., Lee, H.J., and Lee, C.Y.** (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 6516-6520.
- Lee, K.W., Lee, S.J., Kang, N.J., Lee, C.Y., and Lee, H.J.** (2004). Effects of phenolics in Empire apples on hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. *Biofactors* **21**, 361-365.
- Lee, S.Y., Choi, K.Y., Kim, M.K., Kim, K.M., Lee, J.H., Meng, K.H., and Lee, W.C.** (2005). [The relationship between intake of vegetables and fruits and colorectal adenoma-carcinoma sequence]. *Korean J Gastroenterol* **45**, 23-33.
- Lee, Y. H. and V. D. Vacquier** (1993). "A method for obtaining high-quality sequences from the non-biotinylated, free ssDNA remaining after solid-phase sequencing." *Biotechniques* **14**(2): 191-2.
- Lee, Y.I., Kang-Park, S., and Do, S.I.** (2001). The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* **276**, 16969-16977.
- Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.M., Westphal, A.H., Berkel, W.J., Aarts, J.M., and Rietjens, I.M.** (2006). Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol* **19**, 1499-1505.
- Lei, X.G., Dann, H.M., Ross, D.A., Cheng, W.H., Combs, G.F., and Roneker, K.R.** (1998). Dietary selenium supplementation is required to support full expression of three selenium-dependent glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. *J Nutr* **128**, 130-135.
- Li, H., Flachowsky, H., Fischer, T.C., Hanke, M.V., Forkmann, G., Treutter, D., Schwab, W., Hoffmann, T., and Szankowski, I.** (2007). Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta* **226**, 1243-1254.
- Li, M.H., Jang, J.H., Sun, B., and Surh, Y.J.** (2004). Protective effects of oligomers of grape seed polyphenols against beta-amyloid-induced oxidative cell death. *Ann N Y Acad Sci* **1030**, 317-329.
- Li, W., Khor, T.O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W.S., Yu, S., and Kong, A.N.** (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* **76**, 1485-1489.
- Li, Y., Cao, Z., and Zhu, H.** (2006). Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res* **53**, 6-15.
- Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C., and Epstein, C.J.** (1995). Dilated cardiomyopathy and

- neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* **11**, 376-381.
- Lih-Brody, L., S. R. Powell, et al.** (1996). "Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease." *Dig Dis Sci* **41**(10): 2078-86.
- Lin, W., Shen, G., Yuan, X., Jain, M.R., Yu, S., Zhang, A., Chen, J.D., and Kong, A.N.** (2006). Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *J Biochem Mol Biol* **39**, 304-310.
- Lindblad, P., Wolk, A., Bergstrom, R., and Adami, H.O.** (1997). Diet and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**, 215-223.
- Lindl, T.** (2002). *Zell- und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Liochev, S.I., and Fridovich, I.** (1991). Effects of overproduction of superoxide dismutase on the toxicity of paraquat toward *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**, 8747-8750.
- Liu, H., Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P.** (2008). Coordinate regulation of enzyme markers for inflammation and for protection against oxidants and electrophiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15926-15931.
- Liu, J.J., Huang, T.S., Cheng, W.F., and Lu, F.J.** (2003). Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *International journal of cancer* **106**, 559-565.
- Liu, R.H., and Sun, J.** (2003). Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 1718-1723.
- Liu, R.H., Liu, J., and Chen, B.** (2005). Apples prevent mammary tumors in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 2341-2343.
- Liu, R.M., Gao, L., Choi, J., and Forman, H.J.** (1998). gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* **275**, L861-869.
- Liu, R.M., Hu, H., Robison, T.W., and Forman, H.J.** (1996). Differential enhancement of gamma-glutamyl transpeptidase and gamma-glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**, 186-191.
- Liu, R.M., Vasiliou, V., Zhu, H., Duh, J.L., Tabor, M.W., Puga, A., Nebert, D.W., Sainsbury, M., and Shertzer, H.G.** (1994). Regulation of [Ah] gene battery enzymes and glutathione levels by 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indole in mouse hepatoma cell lines. *Carcinogenesis* **15**, 2347-2352.
- Liu, T.T., and Yang, T.S.** (2008). Effects of water-soluble natural antioxidants on photosensitized oxidation of conjugated linoleic acid in an oil-in-water emulsion system. *J Food Sci* **73**, C256-261.
- Loguercio, C., D. Taranto, et al.** (1996). "Age affects glutathione content and glutathione-transferase activity in human gastric mucosa." *Ital J Gastroenterol* **28**(9): 477-81.
- Long, L.H., Clement, M.V., and Halliwell, B.** (2000). Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 50-53.
- Lotito, S.B., and Frei, B.** (2004). The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med* **37**, 251-258.
- Lotito, S.B., and Frei, B.** (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* **41**, 1727-1746.
- Lottspeich, F., Zobras, H.** (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lu, S.C.** (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* **30**, 42-59.
- Lu, S.C., and Huang, H.Y.** (1994). Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **47**, 859-869.
- Lu, S.C., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., Salas-Prato, M., and Kaplowitz, N.** (1990). Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem* **265**, 16088-16095.
- Lu, S.C., Kuhlenkamp, J., Garcia-Ruiz, C., and Kaplowitz, N.** (1991). Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest* **88**, 260-269.

- Lu, S.C., Sun, W.M., Yi, J., Ookhtens, M., Sze, G., and Kaplowitz, N.** (1996). Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells. *J Clin Invest* **97**, 1488-1496.
- Lueder, D.V., and Phillips, M.A.** (1996). Characterization of *Trypanosoma brucei* gamma-glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine). *J Biol Chem* **271**, 17485-17490.
- Macheix, J., J., Fleuriet, A., Billot, J.** (1996). *Fruit phenolics*. (Boca Raton, FL: CRC Press).
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., and Thompson, J.A.** (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11853-11858.
- Maffei, F., Tarozzi, A., Carbone, F., Marchesi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Forti, G.C., and Hrelia, P.** (2007). Relevance of apple consumption for protection against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Br J Nutr* **97**, 921-927.
- Manach, C., Mazur, A., and Scalbert, A.** (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* **16**, 77-84.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C.** (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 230S-242S.
- Manchester, K.L.** (1995). Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques* **19**, 208-210.
- Mandir, N., Englyst, H., and Goodlad, R.A.** (2008). Resistant carbohydrates stimulate cell proliferation and crypt fission in wild-type mice and in the *Apc*(Min/+) mouse model of intestinal cancer, association with enhanced polyp development. *Br J Nutr* **100**, 711-721.
- Mann, G.E., Niehueser-Saran, J., Watson, A., Gao, L., Ishii, T., de Winter, P., and Siow, R.C.** (2007). Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia. *Sheng Li Xue Bao* **59**, 117-127.
- Manson, M.M., Gescher, A., Hudson, E.A., Plummer, S.M., Squires, M.S., and Prigent, S.A.** (2000). Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol Lett* **112-113**, 499-505.
- Markert, M., Heierli, C., Kuwahara, T., Frei, J., and Wauters, J.P.** (1988). Dialyzed polymorphonuclear neutrophil oxidative metabolism during dialysis: a comparative study with 5 new and reused membranes. *Clin Nephrol* **29**, 129-136.
- Marmur, J., and Doty, P.** (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109-118.
- Masaki, N., M. E. Kyle, et al.** (1989). "Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide." *Arch Biochem Biophys* **270**(2): 672-80.
- Masters, C.J., and Crane, D.I.** (1995). On the role of the peroxisome in ontogeny, ageing and degenerative disease. *Mech Ageing Dev* **80**, 69-83.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., and Nunez de Castro, I.** (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**, 595-603.
- Mato, J.M., Alvarez, L., Corrales, F. J., Pajares, M. A.** (1994). *S-Adenosylmethionine and the liver*. (Raven Press, NY).
- Mattson, M. P. and T. Magnus** (2006). "Ageing and neuronal vulnerability." *Nat Rev Neurosci* **7**(4): 278-94.
- Mayer, B., Schumacher, M., Brandstatter, H., Wagner, F.S., and Hermetter, A.** (2001). High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Anal Biochem* **297**, 144-153.
- Mazza, G.** (1995). "Anthocyanins in grapes and grape products." *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**(4): 341-71.
- Mazza, G., Miniati, E.** (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. (Boca Raton: CRC Press Inc.).

- McCann, M.J., Gill, C.I., G, O.B., Rao, J.R., McRoberts, W.C., Hughes, P., McEntee, R., and Rowland, I.R.** (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem Toxicol* **45**, 1224-1230.
- McGhie, T.K., Hunt, M., and Barnett, L.E.** (2005). Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 3065-3070.
- McKone, E.F., Shao, J., Frangolias, D.D., Keener, C.L., Shephard, C.A., Farin, F.M., Tonelli, M.R., Pare, P.D., Sandford, A.J., Aitken, M.L., and Kavanagh, T.J.** (2006). Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **174**, 415-419.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D.** (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* **278**, 21592-21600.
- Mehrlander, K., Dietrich, H., Sembries, S., Dongowski, G., and Will, F.** (2002). Structural characterization of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction. *Journal of agricultural and food chemistry* **50**, 1230-1236.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G.** (2000). Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
- Meister, A.** (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**, 17205-17208.
- Meister, A.** (1995). Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Methods Enzymol* **252**, 26-30.
- Meredith, M.J., and Reed, D.J.** (1982). Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* **257**, 3747-3753.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G.** (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* 187-94.
- Meyers, K. J., C. B. Watkins, et al.** (2003). "Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries." *J Agric Food Chem* **51**(23): 6887-92.
- Michels, K.B., Giovannucci, E., Chan, A.T., Singhania, R., Fuchs, C.S., and Willett, W.C.** (2006). Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Res* **66**, 3942-3953.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al.** (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacol Rev* **52**(4): 673-751.
- Milner, J.A.** (2004). Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr* **134**, 2492S-2498S.
- Milner, J.A.** (2006). Diet and cancer: facts and controversies. *Nutr Cancer* **56**, 216-224.
- Minn, J.** (Dissertation 2010). Modulation der akuten und chronischen Darmentzündung an Nagermodellen durch Inhaltsstoffe des Apfels. FB Lebensmittelchemie & Toxikologie. Technische Universität Kaiserslautern.
- Misra, I., and Griffith, O.W.** (1998). Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif* **13**, 268-276.
- Miura, D., Miura, Y., and Yagasaki, K.** (2007). Effect of apple polyphenol extract on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis, and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2743-2750.
- Miura, T., Chiba, M., Kasai, K., Nozaka, H., Nakamura, T., Shoji, T., Kanda, T., Ohtake, Y., and Sato, T.** (2008). Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis* **29**, 585-593.
- Moghadaszadeh, B., and Beggs, A.H.** (2006). Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)* **21**, 307-315.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y.W.** (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9926-9930.
- Moinova, H.R., and Mulcahy, R.T.** (1998). An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem* **273**, 14683-14689.

- Morales, A., Miranda, M., Sanchez-Reyes, A., Colell, A., Biete, A., and Fernandez-Checa, J.C.** (1998). Transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation. *FEBS Lett* **427**, 15-20.
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., and Remesy, C.** (2000). Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res* **33**, 667-676.
- Morison, W.L.** (2004). Clinical practice. Photosensitivity. *N Engl J Med* **350**, 1111-1117.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M., and Blomhoff, R.** (2004). Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev* **125**, 315-324.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M.C., and Blomhoff, R.** (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* **81**, 277S-283S.
- Mulcahy, R.T., and Gipp, J.J.** (1995). Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 227-233.
- Mulcahy, R.T., Wartman, M.A., Bailey, H.H., and Gipp, J.J.** (1997). Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem* **272**, 7445-7454.
- Müller, C., Eisenbrand, G., Gradinger, M., Rath, T., Albert, F. W., Vienken, J., Singh, R., Farmer, P. B., Stockis, J. P., Janzowski, C.** (2004). Effects of Hemodialysis, Dialyser Type and Iron Infusion on Oxidative Stress in Uremic Patients. *Free Radical Research*, **38**, No. 10, 1093-1100
- Muller, C., Winkler, K., and Brigelius-Flohe, R.** (2003). 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem* **384**, 11-18.
- Muller, K. and M. Wirth** (2002). "Real-time RT-PCR detection of retroviral contaminations of cells and cell lines." *Cytotechnology* **38**(1-3): 147-53.
- Musonda, C. A., N. Helsby, et al.** (1997). "Effects of quercetin on drug metabolizing enzymes and oxidation of 2',7-dichlorofluorescein in HepG2 cells." *Hum Exp Toxicol* **16**(12): 700-8.
- Naczki, M., and Shahidi, F.** (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* **41**, 1523-1542.
- Nakamura, S., Sugiyama, S., Fujioka, D., Kawabata, K., Ogawa, H., and Kugiyama, K.** (2003). Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function. *Circulation* **108**, 1425-1427.
- Nakaso, K., Yano, H., Fukuhara, Y., Takeshima, T., Wada-Isoe, K., and Nakashima, K.** (2003). PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* **546**, 181-184.
- Netzel M, Rossberg A, Straß G, Thielen C, Dietrich H, Bitsch R, and Bitsch I.** (2005). Charakterisierung der antioxidativen Kapazität von naturtrüben Apfelsäften mit vier unterschiedlichen Testsystemen. *Lebensmittelchemie* **59**, 33
- Nguyen, T., Huang, H.C., and Pickett, C.B.** (2000). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem* **275**, 15466-15473.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.C., Yang, C.S., and Pickett, C.B.** (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **278**, 4536-4541.
- Nichenametla, S.N., Ellison, I., Calcagnotto, A., Lazarus, P., Muscat, J.E., and Richie, J.P., Jr.** (2008). Functional significance of the GAG trinucleotide-repeat polymorphism in the gene for the catalytic subunit of gamma-glutamylcysteine ligase. *Free Radic Biol Med* **45**, 645-650.
- Nicholls, P.** (1963). Ferrous complexes in the catalase reaction. *Experientia* **19**, 80-82.
- Nordberg, J., and Arner, E.S.** (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**, 1287-1312.
- Numazawa, S., and Yoshida, T.** (2004). Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect. *J Toxicol Sci* **29**, 81-89.
- Nystrom, M., and Mutanen, M.** (2009). Diet and epigenetics in colon cancer. *World J Gastroenterol* **15**, 257-263.
- Oberley, L.W., and Oberley, T.D.** (1988). Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. *Mol Cell Biochem* **84**, 147-153.

- Oberreuther-Moschner, D.L., Jahreis, G., Rechkemmer, G., and Pool-Zobel, B.L.** (2004). Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *Br J Nutr* **91**, 925-932.
- Ochi, T.** (1995). Hydrogen peroxide increases the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Arch Toxicol* **70**, 96-103.
- Ochi, T.** (1996). Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicology* **112**, 45-55.
- O'Dwyer, P.J., Szarka, C.E., Yao, K.S., Halbherr, T.C., Pfeiffer, G.R., Green, F., Gallo, J.M., Brennan, J., Frucht, H., Goosenberg, E.B., Hamilton, T.C., Litwin, S., Balshem, A.M., Engstrom, P.F., and Clapper, M.L.** (1996). Modulation of gene expression in subjects at risk for colorectal cancer by the chemopreventive dithiolethione oltipraz. *J Clin Invest* **98**, 1210-1217.
- Ohkami, H., Tazawa, K., Yamashita, I., Shimizu, T., Murai, K., Kobashi, K., and Fujimaki, M.** (1995). Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* **86**, 523-529.
- Ohnishi-Kameyama, M., Yanagida, A., Kanda, T., and Nagata, T.** (1997). Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**, 31-36.
- Okawa, H., Motohashi, H., Kobayashi, A., Aburatani, H., Kensler, T.W., and Yamamoto, M.** (2006). Hepatocyte-specific deletion of the *keap1* gene activates *Nrf2* and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 79-88.
- Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., and Ono, M.** (2001). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull* **24**, 1202-1205.
- Oliveras-Lopez, M.J., Berna, G., Carneiro, E.M., Lopez-Garcia de la Serrana, H., Martin, F., and Lopez, M.C.** (2008). An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in OF1 mice. *J Nutr* **138**, 1074-1078.
- Olschwang, S., Bonaiti, C., Feingold, J., Frebourg, T., Grandjouan, S., Lasset, C., Laurent-Puig, P., Lecuru, F., Millat, B., Sobol, H., Thomas, G., and Eisinger, F.** (2005). [HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer): identification and management]. *Rev Med Interne* **26**, 109-118.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., and Katan, M.B.** (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* **131**, 66-71.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., Buijsman, M.N., van Amelsvoort, J.M., and Katan, M.B.** (2003). Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr* **133**, 1806-1814.
- Opara, E. C.** (2006). "Oxidative stress." *Dis Mon* **52**(5): 183-98.
- Oppenheimer, L., Wellner, V.P., Griffith, O.W., and Meister, A.** (1979). Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *J Biol Chem* **254**, 5184-5190.
- Oshino, N., B. Chance, et al.** (1973). "The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors." *Arch Biochem Biophys* **154**(1): 117-31.
- Osswald, K., Becker, T.W., Grimm, M., Jahreis, G., and Pool-Zobel, B.L.** (2000). Inter- and intra-individual variation of faecal water - genotoxicity in human colon cells. *Mutat Res* **472**, 59-70.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., and Kolniak, J.** (2009). Effect of Enzymatic Mash Treatment and Storage on Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and Turbidity of Cloudy Apple Juice. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Oszmianski, J., Wolniak, M., Wojdylo, A., Waver, I.** (2007). Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *J Sci Food Agric* **87**, 573-579.
- Owen, R.W., Thompson, M.H., Hill, M.J., Wilpart, M., Mainguet, P., and Roberfroid, M.** (1987). The importance of the ratio of lithocholic to deoxycholic acid in large bowel carcinogenesis. *Nutr Cancer* **9**, 67-71.
- Pace, G.W., and Leaf, C.D.** (1995). The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic Biol Med* **19**, 523-528.

- Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A.** (1996). Control of gene expression by proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 340-347.
- Pan, L., Zessner, H., Will, F., Klimo, K., Frank, N., Dietrich, H.,** (2005). Natural cloudy apple juice and a polyphenol-enriched apple juice extract prevent intestinal adenoma formation in the APC(Min/+) model of colon cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 2715s.
- Park, S.Y., Kim, E.J., Shin, H.K., Kwon, D.Y., Kim, M.S., Surh, Y.J., and Park, J.H.** (2007). Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by phloretin. *J Med Food* **10**, 581-586.
- Parry, J., L. Su, et al.** (2006). "Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours." *J Agric Food Chem* **54**(11): 3773-8.
- Pearson, D.A., Tan, C.H., German, J.B., Davis, P.A., and Gershwin, M.E.** (1999). Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci* **64**, 1913-1920.
- Pegg, M., Crane, D., and Masters, C.** (1986). Confirmation that catalase is a glycoprotein. *Biochem Int* **12**, 831-838.
- Penniston, K. L. and S. A. Tanumihardjo** (2006). "The acute and chronic toxic effects of vitamin A." *Am J Clin Nutr* **83**(2): 191-201.
- Perez A, Lin BH, and J, A.** (2001). Demographic Profile of Apple Consumption in the United States. In *Fruit and Tree Nuts S&O*, pp. 37-47
- Perez A, P.S.** (2008). *Fruit and Tree Nuts Situation and Outlook Yearbook*. In *Market and Trade Economics Division* (U.S. Department of Agriculture).
- Perlmutter, D.** (2000). *BrainRecovery.com*. (Naples, FL: The Perlmutter Health Center).
- Pfaffl, M. W.** (2004). "RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." *Biospektrum* **1**: 92-95.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pickard, S.** (Diplomarbeit 2009). Charakterisierung der antioxidativen Wirksamkeit eines fermentierten Apfelmarksaftes in humanen Kolonkrebszelllinien. (Untersuchung von Ileostoma-Beutelinhalten aus einer Verzehrstudie mit Patienten). *FB Lebensmittelchemie & Toxikologie*. Technische Universität Kaiserslautern.
- Plumb, G.W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., and Williamson, G.** (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res* **29**, 351-358.
- Pohl, C., Will, F., Dietrich, H., and Schrenk, D.** (2006). Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 10262-10268.
- Polonikov, A.V., Ivanov, V.P., Solodilova, M.A., Khoroshaya, I.V., Kozhuhov, M.A., and Panfilov, V.I.** (2007). The relationship between polymorphisms in the glutamate cysteine ligase gene and asthma susceptibility. *Respir Med* **101**, 2422-2424.
- Pool-Zobel, B., Veeriah, S., and Bohmer, F.D.** (2005). 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* **591**, 74-92.
- Pool-Zobel, B.L., Selvaraju, V., Sauer, J., Kautenburger, T., Kiefer, J., Richter, K.K., Soom, M., and Wolf, S.** (2005). Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* **26**, 1064-1076.
- Potter, J.D.** (2000). Colorectal neoplasia and meat: Epidemiology and mechanisms. In *Dietary anticarcinogens and Antimutagens: Chemical and Biological Aspects*, I.T. Johnson, Fenwick, G. R., ed (Cambridge: Royal Society of Chemistry), pp. 3-11.
- Pour Nikfardjam, M., Schmitt K, Rühl EH, Patz CD, Dietrich H.** (2000). Untersuchung rebsortenreiner Traubensäfte auf den Gehalt an Resveratrolderivaten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **96**, 319-324.
- Prasad, A., Andrews, N.P., Padder, F.A., Husain, M., and Quyyumi, A.A.** (1999). Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol* **34**, 507-514.
- Prasain, J. K. and S. Barnes** (2007). "Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus." *Mol Pharm* **4**(6): 846-64.

- Prestera, T., Holtzclaw, W.D., Zhang, Y., and Talalay, P.** (1993). Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2965-2969.
- Price, S.F., Breen, P.J., Vallado, M., Watson, B. T.** (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am J Enol Vitic* **46**, 187-194.
- Prior, R.L., and Gu, L.** (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* **66**, 2264-2280.
- Privalle, C.T., and Fridovich, I.** (1992). Transcriptional and maturational effects of manganese and iron on the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 9140-9145.
- Prochaska, H.J., and Talalay, P.** (1988). Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* **48**, 4776-4782.
- Puiggros, F., Llopiz, N., Ardevol, A., Blade, C., Arola, L., and Salvado, M.J.** (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 6080-6086.
- Rahman, I., and MacNee, W.** (2000). Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* **28**, 1405-1420.
- Rahman, I., Bel, A., Mulier, B., Donaldson, K., and MacNee, W.** (1998). Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* **275**, L80-86.
- Rahman, I., Bel, A., Mulier, B., Lawson, M.F., Harrison, D.J., Macnee, W., and Smith, C.A.** (1996). Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 832-837.
- Rahman, I., Biswas, S.K., and Kirkham, P.A.** (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* **72**, 1439-1452.
- Rasband WS.** (1997-2009). ImageJ (U. S. National Institutes of Health).
- Re, R., N. Pellegrini, et al.** (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radic Biol Med* **26**(9-10): 1231-7.
- Reddivari, L., J. Vanamala, et al.** (2007). "Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways." *Carcinogenesis* **28**(10): 2227-35.
- Ren, Y., and Smith, A.** (1995). Mechanism of metallothionein gene regulation by heme-hemopexin. Roles of protein kinase C, reactive oxygen species, and cis-acting elements. *J Biol Chem* **270**, 23988-23995.
- Renis, M., L. Calandra, et al.** (2008). "Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins." *Br J Nutr* **100**(1): 27-35.
- Renz-Polster, H., Krautzig, S., Braun, J.** (2004). *Basislehrbuch Innere Medizin*. München, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.
- Resuehr, D., and Spiess, A.N.** (2003). A real-time polymerase chain reaction-based evaluation of cDNA synthesis priming methods. *Anal Biochem* **322**, 287-291.
- Rice-Evans, C., and Miller, N.J.** (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* **234**, 279-293.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., and Pridham, J.B.** (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* **22**, 375-383.
- Rios, L.Y., Gonthier, M.P., Remesy, C., Mila, I., Lapiere, C., Lazarus, S.A., Williamson, G., and Scalbert, A.** (2003). Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr* **77**, 912-918.
- Ristoff, E., Augustson, C., Geissler, J., de Rijk, T., Carlsson, K., Luo, J.L., Andersson, K., Weening, R.S., van Zwieten, R., Larsson, A., and Roos, D.** (2000). A missense mutation in the heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia. *Blood* **95**, 2193-2196.
- Roberts, C.K., Barnard, R.J., Sindhu, R.K., Jurczak, M., Ehdiaie, A., and Vaziri, N.D.** (2006). Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* **55**, 928-934.

- Rodrigo, R., Bosco, C., Herrera, P., and Rivera, G.** (2004). Amelioration of myoglobinuric renal damage in rats by chronic exposure to flavonol-rich red wine. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 2237-2244.
- Rodrigo, R., Rivera, G., Orellana, M., Araya, J., and Bosco, C.** (2002). Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sci* **71**, 2881-2895.
- Röhrdanz, E., Bittner, A., Tran-Thi, Q. H., Kahl, R.** (2003). The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells. *Arch Toxicol* **77**: 506–510
- Rozen, S., and Skaletsky, H.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.
- R-Project.** (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (R Development Core Team).
- Ruis, H., Koller, F.** (1997). *Oxidative Stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* (Raleigh: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Rushmore, T.H., and Pickett, C.B.** (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* **265**, 14648-14653.
- Rushmore, T.H., and Pickett, C.B.** (1991). Xenobiotic responsive elements controlling inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *Methods Enzymol* **206**, 409-420.
- Sachs, G.** (2003). *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Berlin, Springer-Verlag.
- Salo, D.C., Lin, S.W., Pacifici, R.E., and Davies, K.J.** (1988). Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **5**, 335-339.
- Scalbert, A., and Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Deprez, S., Mila, I., Albrecht, A.M., Huneau, J.F., and Rabot, S.** (2000). Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors* **13**, 115-120.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., and Remesy, C.** (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* **56**, 276-282.
- Scandalios, J.G.** (1965). Subunit dissociation and recombination of catalase isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**, 1035-1040.
- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., and Janzowski, C.** (2006). Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Molecular nutrition & food research* **50**, 413-417.
- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., and Janzowski, C.** (2006). Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular nutrition & food research* **50**, 24-33.
- Schieber, A., Keller, P., and Carle, R.** (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **910**, 265-273.
- Schneider, H., A. Schwiertz, et al.** (1999). "Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract." *Arch Microbiol* **171**(2): 81-91.
- Schoefer, L., R. Mohan, et al.** (2003). "Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*." *Appl Environ Microbiol* **69**(10): 5849-54.
- Schonbaum, G.R., Chance, B.** (1976). *The Enzymes.* (New York: Academic Press).
- Schreck, R. and P. A. Baeuerle** (1991). "A role for oxygen radicals as second messengers." *Trends Cell Biol* **1**(2-3): 39-42.
- Seelig, G.F., Simonsen, R.P., and Meister, A.** (1984). Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem* **259**, 9345-9347.
- Seeram, N. P., L. S. Adams, et al.** (2006). "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro." *J Agric Food Chem* **54**(25): 9329-39.
- Sekhar, K.R., Long, M., Long, J., Xu, Z.Q., Summar, M.L., and Freeman, M.L.** (1997). Alteration of transcriptional and post-transcriptional expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by diethyl maleate. *Radiat Res* **147**, 592-597.

- Sembries, S., Dongowski, G., Jacobasch, G., Mehrlander, K., Will, F., and Dietrich, H.** (2003). Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr* **90**, 607-615.
- Sembries, S., Dongowski, G., Mehrlander, K., Will, F., and Dietrich, H.** (2006). Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomaces in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 10269-10280.
- Sen, C.K.** (1997). Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutr Biochem* **8**, 660-662.
- Sengupta, S., Muir, J.G., and Gibson, P.R.** (2006). Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 209-218.
- Sesso, H.D., Gaziano, J.M., Liu, S., and Buring, J.E.** (2003). Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* **77**, 1400-1408.
- Shen, G., and Kong, A.N.** (2009). Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters. *Biopharm Drug Dispos* **30**, 345-355.
- Shen, G., Hebbbar, V., Nair, S., Xu, C., Li, W., Lin, W., Keum, Y.S., Han, J., Gallo, M.A., and Kong, A.N.** (2004). Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *J Biol Chem* **279**, 23052-23060.
- Shi, D., and Jiang, B.H.** (2002). Antioxidant properties of apple juice and its protection against Cr(VI)-induced cellular injury. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **21**, 233-242.
- Shi, M.M., Kugelman, A., Iwamoto, T., Tian, L., and Forman, H.J.** (1994). Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* **269**, 26512-26517.
- Shih, P. H., C. T. Yeh, et al.** (2007). "Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis." *J Agric Food Chem* **55**(23): 9427-35.
- Shimizu, J., Yamada, N., Nakamura, K., Takita, T., and Innami, S.** (1996). Effects of different types of dietary fiber preparations isolated from bamboo shoots, edible burdock, apple and corn on fecal steroid profiles of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **42**, 527-539.
- Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T., and Ikeda, M.** (2004). The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food Chem Toxicol* **42**, 959-967.
- Silberberg, M., Morand, C., Mathevon, T., Besson, C., Manach, C., Scalbert, A., and Remesy, C.** (2006). The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European journal of nutrition* **45**, 88-96.
- Siener, J.** (Diplomarbeit 2008). Untersuchungen zur ARE-abhängigen Genexpression in Säugerzellen und der Modulation durch Apfelinhaltsstoffe. *FB Lebensmittelchemie & Toxikologie. Technische Universität Kaiserslautern.*
- Singh, A., Rangasamy, T., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Osburn, W.O., Brigelius-Flohe, R., Kensler, T.W., Yamamoto, M., and Biswal, S.** (2006). Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**, 639-650.
- Siow, R.C., Ishii, T., and Mann, G.E.** (2007). Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Rep* **12**, 11-15.
- Smith, K.J., Johnson, K.A., Bryan, T.M., Hill, D.E., Markowitz, S., Willson, J.K., Paraskeva, C., Petersen, G.M., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and et al.** (1993). The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2846-2850.
- Soltaninassab, S.R., Sekhar, K.R., Meredith, M.J., and Freeman, M.L.** (2000). Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol* **182**, 163-170.
- Spencer, J.P., Schroeter, H., Rechner, A.R., and Rice-Evans, C.** (2001). Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid Redox Signal* **3**, 1023-1039.
- Spormann, T.M., Albert, F.W., Rath, T., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.P., Eisenbrand, G., and Janzowski, C.** (2008). Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 3372-3380.

- Stange, E.F.** (2006). Review article: the effect of aminosalicylates and immunomodulation on cancer risk in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **24 Suppl 3**, 64-67.
- Starke, H., and Herrmann, K.** (1976). [The phenolics of fruits. VIII. Changes in flavonol concentrations during fruit development (authors transl)]. *Z Lebensm Unters Forsch* **161**, 131-135.
- Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., and Alam, J.** (2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* **278**, 2396-2402.
- Stocker, R., Frei, B.** (1991). Endogenous antioxidant defences in human blood plasma, Academic Press; London
- Storch, K.J., Wagner, D.A., Burke, J.F., and Young, V.R.** (1988). Quantitative study in vivo of methionine cycle in humans using [methyl-2H3]- and [1-13C]methionine. *Am J Physiol* **255**, E322-331.
- Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M.M., Yamamoto, M., and Igarashi, K.** (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* **21**, 5216-5224.
- Sun, W.M., Huang, Z.Z., and Lu, S.C.** (1996). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochem J* **320 (Pt 1)**, 321-328.
- Surh, Y.J.** (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**, 768-780.
- Surh, Y.J., Kundu, J.K., Na, H.K., and Lee, J.S.** (2005). Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* **135**, 2993S-3001S.
- Suter, P.M., Domenighetti, G., Schaller, M.D., Laverriere, M.C., Ritz, R., and Perret, C.** (1994). N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest* **105**, 190-194.
- Tabak, C., Arts, I.C., Smit, H.A., Heederik, D., and Kromhout, D.** (2001). Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones: the MORGEN Study. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 61-64.
- Talalay, P., Dinkova-Kostova, A.T., and Holtzclaw, W.D.** (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* **43**, 121-134.
- Tani, H., R. Miyata, et al.** (2009). "Universal quenching probe system: flexible, specific, and cost-effective real-time polymerase chain reaction method." *Anal Chem* **81**(14): 5678-85.
- Tanigawa, S., Fujii, M., and Hou, D.X.** (2007). Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med* **42**, 1690-1703.
- Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A., and Sakamoto, Y.** (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem* **75**, 93-103.
- Tchantchou, F., Graves, M., Ortiz, D., Rogers, E., and Shea, T.B.** (2004). Dietary supplementation with apple juice concentrate alleviates the compensatory increase in glutathione synthase transcription and activity that accompanies dietary- and genetically-induced oxidative stress. *J Nutr Health Aging* **8**, 492-496.
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P.** (1999). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Stuttgart, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH.
- Thielen C, Will F, Zacharlas J, Dietrich H, and Jacob H.** (2004). Polyphenols in apples: Distribution of polyphenols in apple tissue and comparison of fruit and juice. *Dtsch Lebensmitt Rundsch* **100**, 389-398
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., and Biswal, S.** (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* **62**, 5196-5203.
- Tian, L., Shi, M.M., and Forman, H.J.** (1997). Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys* **342**, 126-133.
- Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M. N., .** (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J Sci Food Agric* **80**, 1024-1032.

- Toroser, D., Yarian, C.S., Orr, W.C., and Sohal, R.S.** (2006). Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 233-244.
- Toyokuni, S., Tanaka, T., Kawaguchi, W., Fang, N.R., Ozeki, M., Akatsuka, S., Hiai, H., Aruoma, O.I., and Bahorun, T.** (2003). Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radic Res* **37**, 1215-1224.
- Traber, J., Suter, M., Walter, P., and Richter, C.** (1992). In vivo modulation of total and mitochondrial glutathione in rat liver. Depletion by phorone and rescue by N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol* **43**, 961-964.
- Trosko, J.E.** (2006). Dietary modulation of the multistage, multimechanisms of human carcinogenesis: effects on initiated stem cells and cell-cell communication. *Nutr Cancer* **54**, 102-110.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., and Zhu, H.** (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 6347-6353.
- Tsuji, Y., Ayaki, H., Whitman, S.P., Morrow, C.S., Torti, S.V., and Torti, F.M.** (2000). Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* **20**, 5818-5827.
- Tu, Z., and Anders, M.W.** (1998). Identification of an important cysteine residue in human glutamate-cysteine ligase catalytic subunit by site-directed mutagenesis. *Biochem J* **336 (Pt 3)**, 675-680.
- Tuzun, A., A. Erdil, et al.** (2002). "Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease." *Clin Biochem* **35(7)**: 569-72.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L.** (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* **285**, 1393-1396.
- Usal, A., Acarturk, E., Yuregir, G.T., Unlukurt, I., Demirci, C., Kurt, H.I., and Birand, A.** (1996). Decreased glutathione levels in acute myocardial infarction. *Jpn Heart J* **37**, 177-182.
- USDA Agricultural Research Service, F.S.R.G.** (2008). USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies, 3.0. (Beltsville, MD: United States Department of Agriculture (USDA)).
- Vaidyanathan, J. B. and T. Walle** (2003). "Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2." *J Pharmacol Exp Ther* **307(2)**: 745-52.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84.
- van Acker, S., Best, A, van der Vijgh, WJF,** (1998). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, Marcel Dekker, Inc., New York.
- van der Sluis, A.A., Dekker, M., and van Boekel, M.A.** (2005). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 1073-1080.
- Vanzani, P., Rossetto, M., Rigo, A., Vrhovsek, U., Mattivi, F., D'Amato, E., and Scarpa, M.** (2005). Major phytochemicals in apple cultivars: contribution to peroxyl radical trapping efficiency. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 3377-3382.
- Veeriah, S., Balavenkatraman, K.K., Bohmer, F., Kahle, K., Glei, M., Richling, E., Scheppach, W., and Pool-Zobel, B.L.** (2008). Intervention with cloudy apple juice results in altered biological activities of ileostomy samples collected from individual volunteers. *European journal of nutrition* **47**, 226-234.
- Veeriah, S., Hofmann, T., Glei, M., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Knaup, B., and Pool-Zobel, B.L.** (2007). Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 2892-2900.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., and Pool-Zobel, B.L.** (2006). Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular carcinogenesis* **45**, 164-174.
- Veeriah, S., Miene, C., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Sauer, J., Bohmer, F., Wolf, S., and Pool-Zobel, B.L.** (2008). Apple polyphenols modulate expression of selected genes related

- to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *International journal of cancer* **122**, 2647-2655.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N.** (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* **84**, 627-639.
- Vincenzini, M.T., Favilli, F., and Iantomasi, T.** (1992). Intestinal uptake and transmembrane transport systems of intact GSH; characteristics and possible biological role. *Biochim Biophys Acta* **1113**, 13-23.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L.** (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-532.
- von Sonntag, C.** (1987). *The chemical basis of radiation biology.* (Taylor & Francis, London).
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., and Mattivi, F.** (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 6532-6538.
- Wagner, U.G., Pattridge, K.A., Ludwig, M.L., Stallings, W.C., Werber, M.M., Oefner, C., Frolow, F., and Sussman, J.L.** (1993). Comparison of the crystal structures of genetically engineered human manganese superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: differences in dimer-dimer interaction. *Protein Sci* **2**, 814-825.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Talalay, P.** (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2040-2045.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Veeriah, S., Will, F., Dietrich, H., Pool-Zobel, B.L., and Schrenk, D.** (2008). Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: Fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extracts. *Nutrition* **24**, 366-374.
- Walle, T. and U. K. Walle** (2003). "The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2." *Drug Metab Dispos* **31**(11): 1288-91.
- Walle, T., Otake, Y., Walle, U.K., and Wilson, F.A.** (2000). Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J Nutr* **130**, 2658-2661.
- Walle, T., Walle, U.K., and Halushka, P.V.** (2001). Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* **131**, 2648-2652.
- Walle, U. K., K. L. French, et al.** (1999). "Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal CACO-2 cells: potential role for MRP2." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **103**(1): 45-56.
- Walsh, A.C., Feulner, J.A., and Reilly, A.** (2001). Evidence for functionally significant polymorphism of human glutamate cysteine ligase catalytic subunit: association with glutathione levels and drug resistance in the National Cancer Institute tumor cell line panel. *Toxicol Sci* **61**, 218-223.
- Wang, H., and Joseph, J.A.** (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**, 612-616.
- Wang, S. Y. and H. Jiao** (2000). "Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen." *J Agric Food Chem* **48**(11): 5677-84.
- Watanabe, H., Numazawa, M., Shoji, K., Hiwatashi, N., and Goto, Y.** (1979). Diagnosis of early cancer of the colon and rectum. *Tohoku J Exp Med* **129**, 183-195.
- Wee, L.M., Long, L.H., Whiteman, M., and Halliwell, B.** (2003). Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium. *Free Radic Res* **37**, 1123-1130.
- Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.P., Kulling, S., Rufer, C., Johannes, C., and Janzowski, C.** (2006). An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology journal* **1**, 388-397.
- Wild, A.C., and Mulcahy, R.T.** (2000). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic Res* **32**, 281-301.
- Wild, A.C., Gipp, J.J., and Mulcahy, T.** (1998). Overlapping antioxidant response element and PMA response element sequences mediate basal and beta-naphthoflavone-induced expression of the

- human gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene. *Biochem J* **332** (Pt 2), 373-381.
- Will F, Bauckhage K, and Dietrich H.** (2000). Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 291–297.
- Will F, Roth M, Olk M, Ludwig M, and Dietrich H.** (2008). Processing and analytical characterisation of pulp-enriched cloudy apple juices *LWT - Food Science and Technology* **41**, 10, 2057-2063.
- Will F OM, Hopf I, Dietrich H.** Charakterisierung von Polyphenolextrakten aus Apfelsaft. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* 2006;102:297-302.
- Willers, S.M., Devereux, G., Craig, L.C., McNeill, G., Wijga, A.H., Abou El-Magd, W., Turner, S.W., Helms, P.J., and Seaton, A.** (2007). Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax* **62**, 773-779.
- Williamson, G., and Manach, C.** (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 243S-255S.
- Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K., and Terao, J.** (2005). In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radic Res* **39**, 457-469.
- Wilms, L.C., Boots, A.W., de Boer, V.C., Maas, L.M., Pachen, D.M., Gottschalk, R.W., Ketelslegers, H.B., Godschalk, R.W., Haenen, G.R., van Schooten, F.J., and Kleinjans, J.C.** (2007). Impact of multiple genetic polymorphisms on effects of a 4-week blueberry juice intervention on ex vivo induced lymphocytic DNA damage in human volunteers. *Carcinogenesis* **28**, 1800-1806.
- Winawer, S.J.** (1999). Natural history of colorectal cancer. *Am J Med* **106**, 3S-6S; discussion 50S-51S.
- Wolfe, K., Wu, X., and Liu, R.H.** (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 609-614.
- Wong, C.S., Sengupta, S., Tjandra, J.J., and Gibson, P.R.** (2005). The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. *Dis Colon Rectum* **48**, 549-559.
- World-Cancer-Research-Fund, A.I.f.C.R.** (1997). *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective.* (Washington DC: American Institute for Cancer Research).
- Wrba, F.** (2001). *Grundlagen der Tumorgenese: Suppressorgene und Onkogene.* (Wien: Facultas Universitätsverlag).
- Wu, L.C., and Siebert, K.J.** (2002). Characterization of haze-active proteins in apple juice. *Journal of agricultural and food chemistry* **50**, 3828-3834.
- Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., and Murayama, K.** (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* **273**, 14085-14089.
- Yan, N., and Meister, A.** (1990). Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **265**, 1588-1593.
- Yanagida, A., Murao, H., Ohnishi-Kameyama, M., Yamakawa, Y., Shoji, A., Tagashira, M., Kanda, T., Shindo, H., and Shibusawa, Y.** (2007). Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* **1143**, 153-161.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., and Newmark, H.L.** (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**, 381-406.
- Yang, H., Zeng, Y., Lee, T.D., Yang, Y., Ou, X., Chen, L., Haque, M., Rippe, R., and Lu, S.C.** (2002). Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone. *J Biol Chem* **277**, 35232-35239.
- Yang, Y., Chen, Y., Johansson, E., Schneider, S.N., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., and Dalton, T.P.** (2007). Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. *Biochem Pharmacol* **74**, 372-381.
- Yant, L.J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J.G., Motta, L., Richardson, A., and Prolla, T.A.** (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med* **34**, 496-502.

- Ye, L., Dinkova-Kostova, A.T., Wade, K.L., Zhang, Y., Shapiro, T.A., and Talalay, P.** (2002). Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* **316**, 43-53.
- Yeh, C.T., and Yen, G.C.** (2006). Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr* **136**, 11-15.
- Yoon, H., and Liu, R.H.** (2007). Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF-kappaB activation in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 3167-3173.
- Yu, R., Chen, C., Mo, Y.Y., Hebbar, V., Owuor, E.D., Tan, T.H., and Kong, A.N.** (2000). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* **275**, 39907-39913.
- Zatloukal, P., Kubik, A., Pauk, N., Tomasek, L., and Petruzelka, L.** (2003). Adenocarcinoma of the lung among women: risk associated with smoking, prior lung disease, diet and menstrual and pregnancy history. *Lung Cancer* **41**, 283-293.
- Zessner, H., Pan, L., Will, F., Klimo, K., Knauff, J., Niewohner, R., Hummer, W., Owen, R., Richling, E., Frank, N., Schreier, P., Becker, H., and Gerhauser, C.** (2008). Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Molecular nutrition & food research* **52 Suppl 1**, S28-44.
- Zhang, Y., Gonzalez, V., and Xu, M.J.** (2002). Expression and regulation of glutathione S-transferase P1-1 in cultured human epidermal cells. *J Dermatol Sci* **30**, 205-214.
- Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J.L., and Li, Y.** (2005). Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* **579**, 3029-3036.
- Zhu, M., and Bowden, G.T.** (2004). Molecular mechanism(s) for UV-B irradiation-induced glutathione depletion in cultured human keratinocytes. *Photochem Photobiol* **80**, 191-196.
- Zipper, L.M., and Mulcahy, R.T.** (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem* **277**, 36544-36552.

15. Anhang

Daten zu den dargestellten Abbildungen

Genexpression (HD-Studie)

GCLC Expression in RNA aus peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (PBMC) von HD-Patienten (n=11)

Patient	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	Kontrolle
K	1	0,3224024	0,5866483	0,92104018	0,69668988	0,82647404	0,90454057	0,78819079	0,86681109	1,14428888	0,49449863
L	1	0,14895768	1,08284607	0,27492882	0,24372703	0,20872726	0,28421619	0,27419364	0,97493649	0,38801696	0,46469737
N	1	3,06442271	2,27191239	2,30621874	3,17168427	2,32956808	3,92778904	3,23473237	3,77476111	4,29371429	0,92091339
P	1	0,93762992	0,86209893	1,17907773	2,99881701	0,1470192	0,9157927	0,96400918	1,22645108	1,23982066	0,72488122
Q	1	1,03302378	0,72259917	0,9899742	1,05526586	0,21279976	0,99428645	0,88739959	0,87333704	0,88207355	0,24788686
R	1	0,88425096	0,78303471	0,82648717	0,08572901	0,17769708	0,91079101	0,60439966	0,73418534	0,90568149	0,39637867
S	1	1,2109764	1,24030748	0,87557578	2,73121373	0,99271646	0,87512096	2,17231203	1,10931178	1,38694545	0,61866144
T	1	1,08859492	1,05414346	0,83328758	0,96048616	0,97383688	1,00556287	1,06290903	1,05720791	1,36677132	0,83240549
U	1	0,97766835	1,00757994	0,83928243	0,72072344	0,8354418	0,77575722	0,71462784	0,90213708	0,77646846	0,76572761
X	1	0,8669439	0,9399332	0,59228643	1,16744179	0,95486896	0,71049422	3,38513729	0,93323742	4,32529675	0,12161054
Y	1	1,14863698	0,98070925	0,95284113	0,90407961	0,85565259	0,76126566	1,04049608	0,88398968	1,26104892	0,45714382

GCLM Expression in RNA aus peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (PBMC) von HD-Patienten (n=11)

Patient	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	Kontrolle
K	1	0,55197549	1,05126111	1,36505632	1,22762259	1,32999582	1,39388792	1,3815877	1,47831909	1,71359374	0,85274605
L	1	0,16716771	0,28039205	0,22324006	0,24738101	0,21761946	0,24664095	0,27117089	0,25574238	0,40857523	0,39398145
N	1	2,09389462	1,6511921	2,12788135	2,14066573	11,2141109	2,54499735	2,17893531	2,83912008	2,9419068	0,9502573
P	1	0,9429629	0,88223422	0,90079208	4,45477938	4,29577805	0,72426929	0,88922873	1,01154173	1,45309796	0,65714045
Q	1	0,94056822	0,77193948	0,88757196	0,81496021	0,89392091	0,94300205	0,9082069	0,83772053	1,47212035	0,46845701
R	1	1,00607744	0,93264803	0,82939296	5,33745744	0,28731986	0,83807453	0,61849544	0,76878537	1,23561112	0,49816177
S	1	0,55055145	0,55829772	0,45131398	2,81952429	0,57821123	0,53206698	2,24255117	0,59472851	0,96440221	0,48072249
T	1	1,01710025	1,04077718	0,79670093	0,67768691	0,91469306	0,88593908	0,98937344	1,00839302	1,25948553	0,32928564
U	1	1,04747724	0,82124854	0,83927864	0,76450679	0,98337975	0,68478671	0,74630317	0,87929282	0,96932936	2,18760104
X	1	1,15807036	1,03122783	0,57716516	0,66506792	0,62528775	0,22450102	4,03810644	0,81189339	1,96924868	0,61035459
Y	1	0,97029063	0,79999787	0,84575027	5,94554557	0,62511321	0,64006084	0,90358245	0,72644435	1,11568435	2,45746346

GPX1 Expression in RNA aus peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (PBMC) von HD-Patienten (n=11)

Patient	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	Kontrolle
K	1	0,42051028	0,43716471	0,58438287	0,91937472	0,48461156	0,77165846	0,69142078	0,71011041	0,68744231	0,23278578
L	1	1,34706731	1,89160297	2,97193196	2,20232722	2,60816248	1,74988201	2,70940199	2,37666959	2,72179717	2,0535263
N	1	1,19319925	0,57853582	1,95798248	0,8149626	2,39064842	1,13248526	0,91391745	1,20119028	0,9942058	0,21544574
P	1	1,0608228	0,98172187	1,02291724	0,7419089	0,70440997	0,92628353	0,99849969	1,0762198	1,0229558	0,37501334
Q	1	0,98594989	0,6540153	0,8059776	0,74042774	0,70247274	0,98090543	0,89773129	0,972124	0,63150047	2,24966047
R	1	0,9275973	0,90060166	0,81433114	1,16208322	1,02444163	0,79974365	0,75460538	0,73502679	0,91589674	0,19079169
S	1	0,69450836	0,6601301	0,76955493	0,43396225	0,57706971	0,61936873	0,51406871	0,78646059	0,70615279	0,2739215
T	1	0,79516824	0,81909602	0,77277623	0,53699689	0,91730271	0,67789543	0,73622908	0,7948136	0,75751114	0,19943065
U	1	0,99680252	1,0568718	0,85276855	0,7760667	0,89576969	0,964877	0,77397355	0,83758268	1,36232965	0,79206684
X	1	0,57506969	0,55124789	0,71255281	0,51856032	0,39231443	0,45671943	0,83135678	0,39786029	1,53427159	0,06772534
Y	1	1,04957261	1,04327378	0,81747824	4,78244555	0,78032225	0,74741608	0,85974588	0,90104464	1,22312106	0,24849658

GSR Expression in RNA aus peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (PBMC) von HD-Patienten (n=11)

Patient	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	Kontrolle
K	1	0,32527007	0,74353874	0,92706223	0,94062441	0,86436733	1,05781099	1,02528797	1,03770153	1,21111852	0,40596111
L	1	0,22432779	0,35611718	0,37167977	0,35737724	0,3128383	0,34846016	0,48036908	0,40722692	0,53042674	0,46565326
N	1	2,8148238	2,61786633	3,21075606	3,22062462	4,35554161	4,26370399	4,08500837	4,39220947	5,0498257	0,89122163
P	1	1,01493088	1,00217782	1,30728173	0,83814104	0,73885345	1,12193307	1,10910517	1,46664991	1,48013232	0,98271579
Q	1	0,58958162	0,44076426	0,55508205	0,66807267	0,14949296	0,61806329	0,58759116	0,63252431	0,53075906	0,23975083
R	1	1,29899554	1,00151753	0,96633785	1,16990697	0,99414011	1,02048998	0,84383714	0,8732826	1,2845442	0,56727805
S	1	1,20639292	1,23257954	1,17304472	1,34403471	1,03795136	0,97725165	0,95154785	1,19891913	1,64227733	0,66465545
T	1	1,0002431	1,03526648	0,95403793	0,93472955	0,95119481	1,03891769	1,08235343	1,07160666	1,29374217	0,45307204
U	1	0,97574531	1,0295381	0,88239961	0,86061914	1,06139745	1,10272197	0,87474778	1,03574206	1,22079031	1,30398958
X	1	0,97505746	0,95864288	0,66698893	0,62149266	0,7355958	0,71558848	2,1083665	0,73108628	1,09928454	0,31867688
Y	1	1,1857609	1,0791506	0,89489821	6,76495627	0,83891525	0,83505697	0,92075701	1,01855307	1,38236206	0,04595365

COX-2 Expression in RNA aus peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (PBMC) von HD-Patienten (n=11)

Patient	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	Kontrolle
K	1	0,25784063	0,56076649	0,78995176	0,58677952	0,76325265	0,75789451	0,46635168	0,54595813	0,78023393	0,28573635
L	1	3,44804891	6,94768102	2,67280291	5,09853436	5,25984812	11,0630567	6,20157673	5,37573855	8,98688626	
N	1	0,5235482	1,17021946	0,545598	0,43452063	1,82963374	0,87441635	1,06503423	1,20331906	0,89246162	0,27991464
P	1	0,69030266	0,33856618	0,37999557	0,22797276	0,49243232	0,23377974	0,51937378	0,54172874	0,68546738	0,51841721
Q	1	0,96172073	0,76892907	1,3296691	0,91201086	0,134838	1,31111963	1,37883452	1,23099704	1,26380095	0,33296366
R	1	0,58448851	0,62626201	0,4931927	1,357149	1,02691456	0,79683403	0,91419171	0,75833144	1,10788286	1,7564649
S	1	0,93814368	0,94729359	0,59235585	0,49256277	0,46974726	0,64978599	1,18329744	1,23644542	1,48017535	1,47249972
T	1	0,70196947	0,6476117	0,72303505	0,70359165	0,68105663	0,82031039	0,47273854	0,71333244	0,95857985	1,43966401
U	1	0,9351556	0,98139726	0,75011442	0,60314195	0,71029329	0,66049689	0,74587644	0,95601729	0,73610584	1,09993233
X	1	0,68052658	1,41221877	0,62740538	0,57590909	0,78694305	0,64023201	1,88634076	0,73089214	1,04547278	0,1373862
Y	1	0,8558915	0,87510993	0,74753877	1,20197456	0,82524389	0,78163866	0,89409261	0,73589339	1,0962775	2,27623398

Genexpression in HT-29 Zellen

GCLC Expression in HT-29 nach 6h Inkubation

	GCLC 6h			MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
Quercetin 10 µM	1,1742511	1,2223243	0,9008564	1,057269	0,213191579	
Quercetin 30 µM	1,594516	1,5395992	1,3230256	1,4383702	0,013949972	*
Phloretin 10 µM	1,2532382	1,0643858	0,7942954	0,99933356	0,402846645	
Phloretin 30 µM	1,1752839	1,1420453	1,089692	1,1074975	0,016051268	*
Sulforaphan 5 µM	4,6598067	3,3001385	3,434731	3,6453977	0,011535092	*
Sulforaphan 10µM	4,383293	3,612522	3,152987	3,585674	0,008508252	**
Menadion 5 µM	0,99919784	1,0178535	0,89223576	0,94285214	0,260275567	
Menadion 10 µM	1,5694209	1,4544867	1,4630517	1,4749093	0,002758227	**

GCLC Expression in HT-29 nach 24h Inkubation

	GCLC 24h			MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
Quercetin 10 µM	1,4231414	1,1014968	0,9922301	1,1479855	0,15716345	
Quercetin 30 µM	1,0458972	1,3415126	1,5043238	1,2327523	0,078552405	
Phloretin 10 µM	1,2737659	1,1294087	1,1896459	1,165083	0,021033366	*
Phloretin 30 µM	1,0543996	1,1551485	1,0310955	1,0784817	0,084830358	
Sulforaphan 5 µM	3,013098	3,9184563	2,553902	2,9159236	0,016353682	*
Sulforaphan 10µM	3,5618725	4,0038996	3,1763709	3,3918107	0,004236458	***
Menadion 5 µM	0,89638937	1,0748601	1,1322643	1,0004311	0,337543543	
Menadion 10 µM	1,0029565	1,8152863	1,4140172	1,3101594	0,110972924	

GCLM Expression in HT-29 nach 6h Inkubation

	GCLM 6h			MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
Quercetin 10 µM	1,0527755	1,0997797	0,8333254	1,0092741	0,479752007	
Quercetin 30 µM	1,4119139	1,2108628	1,1501229	1,2811611	0,041374667	*
Phloretin 10 µM	1,1244667	0,8327692	0,8091724	0,9118235	0,261402415	
Phloretin 30 µM	1,0595728	0,84035516	1,0155455	0,97914857	0,357393682	
Sulforaphan 5 µM	3,083329	4,085503	3,1527953	3,4197786	0,008539674	**
Sulforaphan 10µM	3,4547102	3,1011043	3,2131674	3,2892	0,001065669	***
Menadion 5 µM	0,8149732	1,1014094	0,88865113	0,93192416	0,264089914	
Menadion 10 µM	1,2453138	1,5051951	1,5226018	1,4262714	0,020931852	*

GCLM Expression in HT-29 nach 24h Inkubation

	GCLM 24h				Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III	EXCEL	p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
Quercetin 10 µM	0,5782573	0,86682105	0,7921309	0,73953414	0,049405671	*
Quercetin 30 µM	1,3363755	1,2492994	0,79802996	1,0990083	0,261719351	
Phloretin 10 µM	1,1084168	1,0926538	0,84209347	1,0011475	0,441438768	
Phloretin 30 µM	1,0621619	1,4423826	0,8056562	1,0854611	0,316189481	
Sulforaphan 5 µM	2,4650495	1,8085119	1,8944758	2,0540235	0,01800843	*
Sulforaphan 10µM	3,2647793	4,4630427	2,3992393	3,2827606	0,02898644	*
Menadion 5 µM	1,0601865	1,4288557	1,0151522	1,1509191	0,16411145	
Menadion 10 µM	1,2634546	2,3738968	1,0968148	1,4939947	0,143000959	

Nrf2 Expression in HT-29 nach 6h Inkubation

				MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
Quercetin 10 µM	1,0376198	0,8840529	0,9109021	0,93440914	0,179898728	
Quercetin 30 µM	1,7150104	0,9840729	0,7215861	1,0552958	0,341769661	
Phloretin 10 µM	1,012817	1,0003768	0,9221466	0,9732785	0,263433713	
Phloretin 30 µM	0,9513896	1,0395572	0,9675971	0,9731907	0,330377346	
Sulforaphan 5 µM	1,1843933	0,9439251	0,8864334	0,9793269	0,480963627	
Sulforaphan 10µM	1,179178	1,0094869	0,83843756	0,9829602	0,467596321	
Menadion 5 µM	0,9187235	0,88512766	0,65724564	0,8086326	0,08013157	
Menadion 10 µM	1,0604094	1,1030313	0,96880037	1,039839	0,190750185	

Nrf2 Expression in HT-29 nach 24h Inkubation

				MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
Quercetin 10 µM	1,4250768	1,0307194	0,4246952	0,8787919	0,451814632	
Quercetin 30 µM	0,8960611	0,9678876	0,8232031	0,90773034	0,064942659	
Phloretin 10 µM	0,811568	0,94539255	0,7912004	0,8301804	0,044740571	*
Phloretin 30 µM	0,93372625	1,0390269	0,74352664	0,9208565	0,194114728	
Sulforaphan 5 µM	0,9077283	1,0908495	0,83104795	0,95322025	0,268950862	
Sulforaphan 10µM	0,8274761	0,85751086	0,77621853	0,84773153	0,008508316	**
Menadion 5 µM	1,0315019	0,976259	0,7885125	0,9375576	0,22663273	
Menadion 10 µM	1,011725	1,0836122	1,0585325	1,0518174	0,067642445	

GCLC Expression in HT-29 nach 6h Inkubation mit AEs

	GCLC 6h				MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III			p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart		
AE02 50 µg/ml	0,881208	1,0465058	1,098655	1,0462302	0,452798754		
AE02 100 µg/ml	0,9862167	1,0653417	1,2044953	1,1267539	0,156399434		
AE03 50 µg/ml	0,8595562	1,0805322	1,4754738	1,1500043	0,261164159		
AE03 100 µg/ml	0,8416238	1,0295522	1,1396848	1,0215112	0,485296615		
TME 50 µg/ml	0,95215344	1,207354	1,1248444	1,1391877	0,1672946		
TME 100 µg/ml	0,91045177	1,0952469	1,169988	1,0991384	0,263499698		

GCLC Expression in HT-29 nach 24h Inkubation mit AEs

	GCLC 24h			MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
AE02 50 µg/ml	1,3957928	0,8290847	1,1043388	1,2397294	0,285744138	
AE02 100 µg/ml	1,270661	1,2413112	1,3133847	1,272485	0,00286752	***
AE03 50 µg/ml	0,72204417	1,1754518	1,5230509	1,0866838	0,303480631	
AE03 100 µg/ml	1,8314518	1,9344039	2,747102	2,2821934	0,028032249	*
TME 50 µg/ml	1,2674949	1,9836366	3,484595	2,083192	0,098442859	
TME 100 µg/ml	1,6758467	2,766499	1,9761581	1,8180002	0,036352318	*

GCLM Expression in HT-29 nach 6h Inkubation mit AEs

	GCLM 6h			MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
AE02 50 µg/ml	0,91116107	1,0502843	0,9651658	0,9788716	0,303587357	
AE02 100 µg/ml	0,95932406	0,98328745	0,83173823	0,9250977	0,12544792	
AE03 50 µg/ml	0,8146252	1,1134001	0,7779466	0,8872207	0,226810149	
AE03 100 µg/ml	0,81817406	0,8767016	0,85325086	0,84346455	0,006254382	**
TME 50 µg/ml	0,7790149	1,0960464	1,3427049	1,049021	0,349943816	
TME 100 µg/ml	0,83534616	1,0010397	0,78549206	0,8704701	0,096348453	

GCLM Expression in HT-29 nach 24h Inkubation mit AEs

	GCLM 24h			MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
AE02 50 µg/ml	0,9829365	0,85355437	0,94929516	0,966062	0,103376551	
AE02 100 µg/ml	1,0945332	1,0961726	0,9693231	1,0269306	0,165968816	
AE03 50 µg/ml	0,65572417	0,9238159	1,0873635	0,8927125	0,235299655	
AE03 100 µg/ml	1,336061	1,3111553	1,4007249	1,4660189	0,002894147	***
TME 50 µg/ml	1,0046074	1,3322705	1,9585781	1,40974	0,131394582	
TME 100 µg/ml	1,1855934	1,7323544	1,0065551	1,1021231	0,14676483	

Nrf2 Expression in HT-29 nach 6h Inkubation mit AEs

Nrf2, 6h				MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
AE02 50 µg/ml	0,83869255	0,72902524	1,04573	0,85926646	0,149811523	
AE02 100 µg/ml	0,90895206	0,7818544	1,1417358	0,9146648	0,32461025	
AE03 50 µg/ml	0,87807965	0,7797692	0,565216	0,72700787	0,05357693	
AE03 100 µg/ml	0,7923938	0,78789353	0,5528443	0,6988712	0,033729585	*
TME 50 µg/ml	0,940737	1,3017884	0,5834639	0,88102657	0,40298375	
TME 100 µg/ml	0,7784836	0,77685505	0,62669283	0,7236755	0,016211483	*

Nrf2 Expression in HT-29 nach 24h Inkubation mit AEs

Nrf2, 24h				MW	Signifikanz	
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III		p
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart	
AE02 50 µg/ml	1,0680296	0,9595727	0,92872536	0,9905734	0,381624434	
AE02 100 µg/ml	1,0754813	1,2122017	0,8552205	1,0392845	0,345926222	
AE03 50 µg/ml	0,943065	0,9081569	0,74054235	0,8446513	0,080704163	
AE03 100 µg/ml	1,1986114	1,0195086	0,83990866	1,0003392	0,434524902	
TME 50 µg/ml	1,0915946	0,8510529	1,2759047	1,0734857	0,306853881	
TME 100 µg/ml	1,454406	1,5559137	1,0865617	1,402909	0,062164651	

GSR Expression in HT-29 nach 6h Inkubation

	GSR	STABW	t-test
ChA 10	1,01464197	0,04625481	0,31926114
ChA 30	0,92858202	0,05730245	0,08175912
CA 10	0,94249944	0,06249346	0,12601801
CA 30	1,50373218	0,22726382	0,03082077
BAE 50	0,52497256	0,05001807	0,00183766
BAE 100	0,58659571	0,02576944	0,00064635
AE05 50	1,46514405	0,18485735	0,02441196
AE05 100	1,35273065	0,23592943	0,06117624

NQO1 Expression in HT-29 nach 6h Inkubation

NQO1	Exp.I	Exp.II	Exp.III	MW	STABW
DMSO 0,1%	1	1	1		
AE05 50	1,29126938	0,74731635	0,97037593	1,00298722	0,27343892
AE05 100	1,08481823	0,54382674	0,8168056	0,81515019	0,27049955
BAE 50	0,28259627	0,51461366	0,2760293	0,35774641	0,1358907
BAE 100	0,10768882	0,54081697	0,38489958	0,34446846	0,2193764

Genexpression in Caco-2 Zellen

GCLC Expression in Caco-2 nach 6h Inkubation

	GCLC 6h				Signifikanz
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III	
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart
Quercetin 10 µM	1,4904485	0,98184425	1,2379683	1,2285297	0,124088899
Quercetin 30 µM	1,1708995	0,8999743	0,7346	0,91808516	0,330415849
Phloretin 10 µM	0,797666	0,8508976	0,7520575	0,7991504	0,009914836
Phloretin 30 µM	0,7797537	1,0731575	0,47276688	0,73453104	0,162078816
Sulforaphan 5 µM	1,9106947	1,9711223	1,3112819	1,6969693	0,036954711
Sulforaphan 10µM	2,315884	1,5567862	0,9126029	1,4826511	0,139983933
Menadion 5 µM	0,9681576	1,0440391	0,85362995	0,9547782	0,251926477
Menadion 10 µM	2,832536	1,993875	1,6337001	2,1016378	0,041578923

GCLC Expression in Caco-2 nach 24h Inkubation

	GCLC 24h				Signifikanz
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III	
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart
Quercetin 10 µM	1,3295923	0,9944259	1,0629036	1,1173564	0,167166747
Quercetin 30 µM	1,434682	1,54488	0,93455744	1,2764661	0,123071718
Phloretin 10 µM	0,99794364	0,81860256	0,9062235	0,9010318	0,108109349
Phloretin 30 µM	1,2991408	1,0922651	1,0488647	1,1395842	0,098862869
Sulforaphan 5 µM	1,6410494	1,3085907	1,2612833	1,3739393	0,038785302
Sulforaphan 10µM	1,6111676	1,8377581	1,389926	1,6052053	0,020860662
Menadion 5 µM	1,1505456	0,8674848	0,9384563	0,96678615	0,440124876
Menadion 10 µM	2,0480924	1,4193927	1,2269613	1,5316696	0,075202518

GCLM Expression in Caco-2 nach 6h Inkubation

	GCLM 6h				Signifikanz
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III	
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart
Quercetin 10 µM	3,0092683	1,8658928	1,5434713	2,06654	0,062244069
Quercetin 30 µM	2,0126736	0,8740109	0,67747074	1,0697798	0,347830281
Phloretin 10 µM	0,8429066	0,90276164	0,7180735	0,8221636	0,040735087
Phloretin 30 µM	1,0751272	1,0873995	0,46711564	0,817701	0,303903038
Sulforaphan 5 µM	3,598365	3,3565936	1,7833419	2,8061807	0,039124148
Sulforaphan 10µM	5,773353	2,706682	1,0920674	2,6030056	0,12580733
Menadion 5 µM	1,2643385	1,1095325	0,7326273	1,023358	0,421495333
Menadion 10 µM	4,7930827	3,257411	1,8484528	3,066427	0,056920657

GCLM Expression in Caco-2 nach 24h Inkubation

	GCLM 24h				Signifikanz
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Exp.: I+II+III	
DMSO 0,1%	1	1	1	1	einseitig,gepaart
Quercetin 10 µM	1,3313514	1,6093303	1,3744848	1,4433573	0,018347481
Quercetin 30 µM	2,2093112	2,5257702	1,6974045	2,1301146	0,020863102
Phloretin 10 µM	1,0350481	0,80181706	0,77100956	0,8550158	0,128696148
Phloretin 30 µM	1,532994	1,4472554	1,09334	1,3463191	0,058533263
Sulforaphan 5 µM	1,4390569	1,8264272	1,6267451	1,6311934	0,015016217
Sulforaphan 10µM	1,9146926	2,7411196	1,8262582	2,125572	0,028805664
Menadion 5 µM	1,2764817	0,7683476	0,9516022	0,9851407	0,497169433
Menadion 10 µM	2,5834124	1,5469872	1,5174754	1,8332857	0,064043786

GCLC und GCLM Expression in Caco-2 nach 24h Inkubation mit Rutin [µM]

	GCLC	Exp. I	Exp. II	Exp. III	STABW	Signifikanz
DMSO 0,1%	1	1	1	1		
Ru 1	0,9957849	0,76326615	0,95456014	0,90453706	0,12406842	0,15708838
Ru 3	1,0477227	0,99674773	1,01735487	1,02060843	0,02564276	0,14925562
Ru 10	0,7997378	0,9204597	0,96902335	0,89640695	0,08716823	0,08789054
Ru 30	0,71966255	0,5021397	0,77683997	0,66621407	0,14494004	0,02874293
Ru 60	0,79173195	0,84044296	0,48623602	0,70613698	0,19199092	0,05884409
Ru 100	0,6410518		0,81197394	0,72651287	0,12086021	0,09640737

	GCLM	Exp. I	Exp. II	Exp. III	STABW	Signifikanz
DMSO 0,1%	1	1	1	1	0	
Ru 1	0,73454463	0,74918854	0,68704508	0,72359275	0,03248708	0,00228657
Ru 3	1,2684437	0,8100319	0,80154569	0,9600071	0,26714763	0,40982888
Ru 10	0,5129174	0,93934005	0,98683378	0,81303041	0,26098808	0,17023785
Ru 30	0,868737	0,76399505	0,6024199	0,74505065	0,13416545	0,04061142
Ru 60	0,4033509	0,75057846	0,60923202	0,58772046	0,17461044	0,02745621
Ru 100	0,60181946		0,48696242	0,54439094	0,08121619	0,03991178

GPX2 Expression in Caco-2 nach 3h-, 6h- und 24h Inkubation [µM Phenolsäure bzw. µg/ml AE]

	3h	6h	24h	
ChA 10	0,43709382	0,52198808	0,69117318	
ChA 30	0,41689703	0,46921307	0,55368529	
CA 10	0,4879919	0,48840301	0,65607735	
CA 30	0,638507	0,77241633	1,24825423	
BAE 50	0,46367527	0,6387215	0,72261918	
BAE 100	0,52275793	0,40543878	0,26995842	
AE05 50	0,64168176	0,49061123	0,68463728	
AE05 100	0,5405453	0,83679343	1,3977837	
STABW	3h	6h	24h	Statistik
ChA 10	0,11845779	0,18882096	0,22725166	0,03819005
ChA 30	0,08313337	0,12297179	0,08285433	0,00042168
CA 10	0,05759004	0,05759444	0,17140236	0,00193725
CA 30	0,0030001	0,23195717	0,18175641	0,00696218
BAE 50	0,1821256	0,21314606	0,05834451	0,0072213
BAE 100	0,0231252	0,12243528	0,08950491	0,00335369
AE05 50	0,05799103	0,0439185	0,03873984	0,00209533
AE05 100	0,09857337	0,42410814	0,06271039	1,1479E-05

GSR Expression in Caco-2 nach 6h Inkubation [μM Phenolsäure bzw. $\mu\text{g/ml}$ AE]

	GSR	STABW	t-test
ChA 10	0,70529592	0,20288106	0,06413683
ChA 30	0,82225087	0,41523953	0,26783675
CA 10	0,91278944	0,31789357	0,34075115
CA 30	1,0578485	0,27387981	0,37477766
BAE 50	0,32810239	0,28634346	0,02777231
BAE 100	0,54165847	0,20511982	0,03037041
AE05 50	0,78636692	0,19950284	0,14408244
AE05 100	0,8379059	0,19587767	0,14408244

NQO1 Expression in Caco-2 nach 6h Inkubation [$\mu\text{g/ml}$ AE]

	Exp.I	Exp.II	Exp.III	MW	STABW	t-test
DMSO	1	1	1			
AE05 50	1,31590135	1,00912554	0,90743571	1,07748753	0,2126407	0,29622189
AE05 100	0,73033857	0,56007489	0,59580618	0,62873988	0,08978252	0,00947104
Bohnafel 50	0,36845772	0,67563501	0,50045052	0,51484775	0,15409391	0,0160105
Bonafel 100	0,32752698	0,44577841	0,07806646	0,28379062	0,187717	0,0110704

Daten zur Rattenstudie

Basalexpression antioxidativer Zielgene im Rattenkolon

SOD1	GPX1	GCLC	GSR	SOD2	GPX2	Catalase	GCLM	NQO1	Nrf2
2,115942029	1,550742978	1,550794483	1,276132404	1,338563093	1,201906735	1,166325541	0,895883599	0,819800785	0,740670047
1,986111111	1,907802122	1,361049079	1,325449102	1,286632487	1,294554679	1,197158868	0,807334354	0,80789826	0,722311646
2,260273973	1,825006371	1,349898742	1,264240067	1,318272901	1,177540286	1,177631005	0,819420075	0,713598075	0,703215161
1,913043478	1,75758724	1,338519355	1,308604523	1,227395314	1,289369018	1,177071582	0,847628035	0,703289684	0,721334604
1,924731183	1,817765667	1,284649776	1,287390029	1,191567442	1,268393803	1,186894533	0,796507205	0,792470442	0,669313051
2,063291139	1,689294725	1,396067308	1,306996542	1,233632235	1,225960396	1,188788381	0,846661344	0,743144424	0,666184717
2,045454545	1,377036608	1,269283815	1,318789201	1,277296552	1,213635673	1,21432842	0,771117144	0,775581766	0,689701923
1,89010989	1,272505116	1,492926942	1,31752125	1,213055998	1,23592504	1,218474799	0,763567269	0,842807425	0,756371878
p-Wert									
6,69021E-08	8,79181E-05	1,11212E-05	2,11863E-09	2,1621E-06	9,11357E-07	1,31836E-08	7,58636E-06	4,61E-06	3,781E-08

Basalexpression antioxidativer Zielgene in der Rattenleber

SOD1	GPX1	SOD2	Catalase	GCLC	GCLM	GSR	Nrf2	NQO1	GPX2
2,20121731	1,501276268	1,301878417	1,69592866	0,910979508	0,703764177	0,579497132	0,397964559	0,443421412	0,014273068
2,33129973	1,412826049	1,246778277	1,322746588	0,860992395	0,614783942	0,542728826	0,380633021	0,358905729	0,012079393
2,45105124	1,524408706	1,316952418	1,443612109	0,905163889	0,67291709	0,559836993	0,405586887	0,2843897	0,013729543
2,60371194	1,591640523	1,38032359	1,254493825	0,826928315	0,604448801	0,541985454	0,380075494	0,226449626	0,011146109
2,56825457	1,500376699	1,332363893	1,189549239	0,861822473	0,630844023	0,538448179	0,389528408	0,29575252	0,01350027
3,08978657	1,518926145	1,309720469	1,201893217	0,850550208	0,629624906	0,602000823	0,383648217	0,242043107	0,015110375
2,54228848	1,449684331	1,385069157	1,196493822	0,742786458	0,67130661	0,611934453	0,452006612	0,343973864	0,015475308
2,51200991	1,583040827	1,364259625	1,2491889	0,706809274	0,692338135	0,63705042	0,444486524	0,38778823	0,020897799
p-Wert									
6,7234E-07	5,71597E-08	1,87904E-07	0,001271207	0,000346943	2,8715E-08	7,10265E-09	1,06397E-10	3,34756E-08	3,94737E-19

Modulation antioxidativer Zielgene in der Rattenleber nach Saftintervention

Modulation der Expression redoxsensitiver Gene in Kolon und Leber von Ratten nach Intervention mit klarem und trübem Apfelsaft, sowie Smoothie im Vergleich zu einem polyphenolfreien Kontrollsaft. Daten sind berechnet aus der relativen integrierten optischen Dichte (IOD), normalisiert zum Referenzgen GAPDH (IOD = 1) und dargestellt als prozentuale Unterschiede zum entsprechenden mittleren Basislevel der polyphenolfreien Kontrollsaft-Gruppe. MW und Standardabweichung (SD) von acht Tieren je Saftgruppe.

Kolon	klarer AS	trüber AS	Smoothie
SOD1	9,27596235	5,96493705	4,91153811
SOD2	-7,35535509	-5,32831136	6,71482985
GPX1	-20,3007726	12,206354	-5,85432857
CAT	14,7723777	21,0299182	15,5139288
GCLM	0,40612362	5,71488232	0,03172669
NQO1	-6,93182962	-2,36356668	-4,88760388
GCLC	7,8150002	-11,7498096	3,66123556
Nrf2	3,2247635	23,8367373	13,944119
GPX2	27,3966486	22,3529463	2,2619573
GSR	6,12769064	19,0286017	5,25063559
STABW	clear juice	cloudy juice	pulp juice
SOD1	0,75050843	0,77094779	0,38035659
SOD2	-0,42220747	-0,33894793	0,22198889
GPX1	-2,9830501	1,73315743	-0,95196826
CAT	0,22943046	0,21228025	0,3042462
GCLM	0,0351084	0,31015571	0,00246531
NQO1	-0,86035926	-0,12996402	-0,47285192
GCLC	0,52391935	-0,85872393	0,17544052
Nrf2	0,14799918	1,45753568	0,64603475
GPX2	0,71849774	0,60668649	0,14151462
GSR	0,08937203	0,18782946	0,16945083

Leber	klarer AS	trüber AS	Smoothie
SOD1	-4,30256608	-17,7360998	-1,2997043
SOD2	-10,9365958	-15,0058504	-5,60849954
GPX1	-2,18908019	22,9456553	-16,874265
CAT	6,63320676	1,73169502	-5,11973625
GCLM	3,30263988	-11,950663	-21,0051019
NQO1	23,54484	41,3735307	-8,4971516
GCLC	-13,838114	-10,2178093	-20,564855
Nrf2	-0,21527806	0,13296782	-0,16861651
GPX2	0,2354484	0,41373531	-0,08497152
GSR	-14,1306707	-12,770544	-3,47467937
STABW	klarer AS	trüber AS	Smoothie
SOD1	-0,43752585	-4,37796524	-0,27770854
SOD2	-0,65415262	-0,75760143	-0,425686
GPX1	-0,22745535	3,79916402	-1,4082477
CAT	0,54960884	0,37407123	-1,09333926
GCLM	0,26559082	-0,80763923	-2,66041662
NQO1	5,02823383	7,52240354	-1,37900216
GCLC	-0,8507161	-1,11963323	-4,06692612
Nrf2	-0,01576033	0,006619	-0,00803706
GPX2	0,05028234	0,07522404	-0,01379002
GSR	-1,60654276	-0,88620092	-0,19776355

Daten zur Ileostoma-Studie

Kumulativer Verlauf der Gefriertrocknung

Ztpkt.	Ileostoma-Probe									
	A	B	C	D	E	F	G	H	i	J
1h	2,699	10,329	6,898	10,898		11,547	1,587	4,841	3,716	1,276
2h	22,521	21,182	17,846	15,498	15,360	22,319	8,199	11,811	11,409	2,976
3h				22,662	22,591					
4h	26,247	23,089	19,149	24,619	25,814	26,313	18,372	25,100	19,699	12,288
6h	27,459	25,766	24,949	27,951	31,156	27,806	27,203	32,548	24,701	16,544
8h	27,634	30,719	28,236	30,661	37,493	31,497	33,277	34,462	30,453	19,635

Wachstumshemmung

Modulation des relativen Zellwachstums von HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ileostoma-0h-, 2h-, und 4h- Ileostomabeutel-Inhalten (% zur DMSO-Kontrolle); MW \pm SD.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Ileostoma-Proben		
	0h	2h	4h
0,3	100,2166667	95,1	94,2324
1	98,54333333	106,3333333	95,2532
3	105,1866667	97,2	94,6974
10	99,77666667	101,0166667	94,5626
30	100,3733333	98,55333333	93,2098
60	97,16	110,62	96,0634
100	96,46	106,54	93,9126
STABW			
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	0h	2h	4h
0,3	6,559057351	5,755319279	2,724840836
1	11,36012471	16,40664906	1,266422652
3	7,281794651	11,71786243	2,423962046
10	12,26094749	3,603891415	2,497968391
30	1,04428604	14,20452862	2,964329702
60	8,438240338	7,956864961	0,722784604
100	18,88380523	13,06964422	4,226520269

Viabilität

	Viabilität [%]	STABW
DMSO 0,1%	94,2324	5,00700263
1	95,2532	2,34566381
3	94,6974	1,53683467
6	92,82333333	1,99681905
10	94,5626	2,42228421
30	93,2098	2,54358589
60	96,0634	0,91005648
100	93,9126	3,33714598

TEAC-Werte

TEAC-Werte der 10 Ileostoma-Proben; n = 1 je Probe.

Zeitpkt.	Ileostoma-Probe									
	A	B	C	D	E	F	G	H	i	J
0h	0,227908966	0,0861862	0,072086	0,263482	0,179527	0,143002	0,0425654	0,07871	0,232742337	0,05207537
1h	0,208349342	0,22524629	0,166007	0,237072		0,22549	0,1299393	0,503565	0,391943816	0,09411964
2h	0,3483773	0,40147107	0,290788	0,511252	0,353674	0,35867	0,4090836	0,31414	0,528976431	0,12776449
4h	0,449975668	0,55634595	0,364555	0,602476	0,436338	0,445845	0,5435376	0,210032	0,552349706	0,36696131
6h	0,286809799	0,6596471	0,360781	0,705624	0,248416	0,367676	0,3051382	0,106475	0,38592461	0,29489519
8h	0,36109894	0,35587168	0,120819	0,369153	0,238238	0,224683	0,2208836	0,475915	0,225310043	0,30314212

Zeitpkt.	TEAC [mM Trolox]	
	MW	Standardab.
0h	0,1378285	0,08272451
1h	0,24241458	0,12884524
2h	0,36441974	0,113709
4h	0,45284163	0,11817457
6h	0,37213866	0,18191386
8h	0,28951146	0,10269886

ORAC-Werte

ORAC-Werte der 10 Ileostoma-Proben; n = 1 je Probe.

Zeitpunkt	Ileostoma-Probe									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0h	0,41725638	0,02987198	0,00783003	0,31850271	0,03775733	0,1323596	0,05733916	0,12360971	0,06087339	0,01175821
1h							0,09641404	1,81882709	0,82067149	0,21724094
2h	0,99560872	0,96004425	1,24669867	1,20676271	0,96397715	0,53598043	0,21533807	0,65908682	0,75665028	0,2282897
4h	1,11778073	1,52222189	1,14421403	1,37662976	1,26983428	1,15141662	0,74859882	0,51794428	0,80761537	0,48498499
6h	1,05947111	1,30943981	1,14667176	1,50823697	0,352672	0,60797604	0,4206943	0,20509775	0,40034567	0,46110009
8h	1,35109281	0,7926188	0,17489502	0,55534118	0,3249495	0,13687777	0,04586693	0,86263918	0,12732197	0,18463362

Zeitpunkt	ORAC [mM Trolox]	
	MW	STABW
0h	0,11971585	0,13925887
1h		
2h	0,77684368	0,36674593
4h	1,01412408	0,35602916
6h	0,74717055	0,46308859
8h	0,45562368	0,42656735

Daten zum ROS-Level

Modulation des TBH induzierten ROS-Level in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten (100 µg/ml) in % zur TBH-Kontrolle; 10 Patienten, n = 3 je Patient; MW ± SD.

Patient	0h	2h	4h	6h	8h
A	100	86,8269319	89,8207686	98,7734868	100,754613
B	100	93,8878395	97,2018435	89,5249793	93,1030466
C	100	77,2350491	72,1462884	76,2789426	76,3486492
D	100	103,913381	104,760421	98,7131037	93,9528168
E	100	99,545565	99,5601948	100,072355	89,605171
F	100	99,545565	99,5601948	100,072355	89,605171
G	100	95,3111727	97,2321194	105,842551	107,768745
H	100	104,149976	100,256683	113,414186	101,957574
i	100	99,1687109	97,7223814	102,926777	96,3209264
J	100	96,4685174	93,1681432	92,166682	97,8209369
MW	100	95,6052708	95,1429039	97,7785417	94,7237649
STABW	0	8,19276207	9,03080645	10,0567249	8,59120988

Daten zur mRNA Expression antioxidativer Zielgene

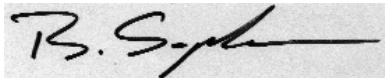
Modulation der antioxidativen Genexpression in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation mit Ileostoma-Beutelinhalten (0h-, 2h-, und 4h-Ileostomabeutelinhalte; je 100 µg/ml). Dargestellt als prozentuale Änderung bezogen auf die DMSO-Kontrolle; n = 10 Patienten; MW ± SD.

Change [% zur DMSO Kontrolle]	Nrf2	GCLC	GCLM	GSR	HO-1	NQO1	SOD2	GPX3
0h	-3,70264938	2,94277665	10,8361105	6,17440503	8,53084557	1,1819363	2,12807716	17,370817
2h	-1,60820389	7,33321582	2,06485694	14,2850595	4,19203333	2,12981863	6,86128202	9,68113289
4h	28,6586715	12,1502243	11,4535339	24,1257393	-2,24361415	4,77930577	2,19199286	18,9053301
STABW								
0h	-0,78281718	0,05183653	1,16840074	0,65937067	0,961056	0,09308502	0,08999257	2,67180363
2h	-0,64941665	1,18545391	0,11286403	3,22152862	0,68536657	0,19978648	1,04580738	1,98433164
4h	1,71555187	0,91861228	1,65910156	1,20701466	-0,18861713	0,25756416	0,16281024	0,91039579

16. Erklärung der Eigenleistung

Ich, Bülent Soyalan, geb. am 15.07.1978 in Bolvadin (Türkei) erkläre hiermit, dass ich die vorstehende Dissertation gemäß § 4 Abs. 2 Promotionsordnung der Technischen Universität Kaiserslautern selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ergebnisse anderer Autoren sind eindeutig mit einem Verweis bzw. Zitat unterschieden. Weder die vorliegende Dissertation noch Teile dieser Dissertation sind als Prüfungsarbeit (vgl. § 1 Abs. 1 Satz 4) in keinem anderen Fachbereich eingereicht worden und es existiert kein Antrag auf ein Promotionsverfahren an einer anderen Hochschule/ Universität.

Norheim, den 04.03.2010

A handwritten signature in black ink on a light gray background. The signature is written in a cursive style and appears to read 'B. Soyalan'.

Bülent Soyalan

17. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

B. Soyalan, J. Minn, H. Schmitz, D. Schrenk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski. Modulation of antioxidant gene expression by apple juice in rats; in: Symposiumsband: „Risk assessment of phytochemicals in food – novel approaches“ DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM); Wiley-VCH; *im Druck*

B. Soyalan, J. Minn, H. Schmitz, D. Schrenk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski. Apple juice intervention modulates expression of antioxidant ARE-dependent genes in rat colon and liver; (eingereicht).

Abstraktpublikationen

B. Soyalan, J. Siener, H. Dietrich, F. Will, M. Baum, G. Eisenbrand, und C. Janzowski: Polyphenolische Apfelinhaltsstoffe modulieren die Expression antioxidativer Gene in humanen Kolonzellen; Lebensmittelchemie, 2009, 63, 3

B. Soyalan, H. Dietrich, F. Will, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Modulation redoxsensitiver Genexpression durch phenolische Fruchtsaftextrakte und Einzelstoffe in humanen Kolonzelllinien, Lebensmittelchemie, 2008, 62, 14

B. Soyalan, Siener J., F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Untersuchungen zum Einfluss von Quercetin und einem phenolischen Apfelsaftextrakt auf die Genexpression in Caco-2 und HT-29 Zellen, Lebensmittelchemie, 2008, 62, 120

C. Janzowski, **B. Soyalan**, F. Albert, T. Rath, H. Dietrich, F. Will, G. Eisenbrand: Modulation of antioxidant gene expression by a fruit juice rich in polyphenols: an intervention study with hemodialysis patients
Cancer Prevention Research, 1. November 2008

Tagungs- und Posterbeiträge

C. Janzowski, **B. Soyalan**, J. Minn, H. Schmitz, D. Schrenk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum and G. Eisenbrand: Modulation of hepatic antioxidant gene expression by polyphenol rich apple juices in rats, AACR Jahrestagung 2009, Denver

Spormann T., **Soyalan B.**, Blatz V., Albert F.W., Rath T., Dietrich H., Will, F., Eisenbrand G. und Janzowski C.: Antioxidative Wirkung eines polyphenolreichen roten Mehrfruchtsaftes in einer Interventionsstudie mit Hämodialysepatienten; 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern, 08.-10. September 2008

B. Soyalan, J. Siener, H. Dietrich, F. Will, M. Baum, G. Eisenbrand, und C. Janzowski: Polyphenolische Apfelinhaltsstoffe modulieren die Expression antioxidativer Gene in humanen Kolonzellen; Regionaltagung Südwest der GDCh, Stuttgart-Hohenheim, 03.-04. März 2008

C. Janzowski, P. Bellion, **B. Soyalan**, M. Baum, F. Will, H. Dietrich, G. Eisenbrand: Apple polyphenols modulate antioxidant defense in human colon cancer cells, Sixth AACR International Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research, Philadelphia, PA, 5.-8. Dezember 2007

Soyalan B.; Will F.; Dietrich H.; Baum M.; Eisenbrand G. and Janzowski C.: Glutathione related gene expression by phenolic apple juice extracts and constituents in human colon cell lines; Food, GUT, and the Immune System: A Challenge in Environmental Medicine, Graduate College 1427, 1st Symposium, Düsseldorf, 04. - 05. Oktober 2007

B. Soyalan, J. Siener, H. Dietrich, F. Will, M. Baum, G. Eisenbrand, und C. Janzowski: Untersuchungen zum Einfluss von Quercetin und einem phenolischen Apfelsaftextrakt auf die Genexpression in Caco-2 und HT-29 Zellen, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg-Erlangen, 10.-12. September 2007

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, AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, CA, 14.-18. April 2007

Spormann T., **Soyalan B.**, Blatz V., Albert F.W., Rath T., Dietrich H., Will, F., Eisenbrand G. und Janzowski C.: Antioxidative Wirkung eines polyphenolreichen roten Mehrfruchtsaftes in einer Interventionsstudie mit Hämodialysepatienten; Regionaltagung Südwest der GDCh, Giessen, 05.-06. März 2007

C. Janzowski, T. Spormann, **B. Soyalan**, F.W. Albert, T. Rath, H. Dietrich, F. Will, G. Eisenbrand: Reduction of oxidative cell damage by an anthocyanin/polyphenolic rich fruit juice in an intervention study with patients on hemodialysis, Frontiers in Cancer Prevention Research, Boston, MA, 12.-15. November 2006

Soyalan B., Dietrich H., Will F., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C.: Phenolic apple juice extracts: Modulation of glutathione-synthesis by transcription of γ -glutamate-cysteine ligase in human colon cell lines, 10th Karlsruhe Nutrition Congress, Health Aspects of Vegetables and Fruits: Scientific Evidence for „5-a-day“, 15-17 Oktober 2006, Karlsruhe

Soyalan B., Dietrich H., Will F., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C.: Phenolische Apfelsaftextrakte: Modulation der Glutathion-Synthese über Transkription der γ -Glutamylcystein-Ligase in humanen Kolonkarzinomzelllinien, 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 18.-20. September 2006

Soyalan B., Dietrich H., Will F., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C.: Modulation of redox-sensitive gene expression by phenolic fruit juice extracts in human colon cell lines, 1st International Symposium on Nutrition and Intestinal Health, NutIntest 2007, Kaiserslautern, 28.02.-01.03.2007

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit wahrnehmen und einigen Mitmenschen für ihre Hilfe und Unterstützung in der Zeit meines Studiums, während der Promotion und in der Zeit darüber hinaus danken.

Vorab möchte ich Herrn Prof Eisenbrand dafür danken, dass er mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und mir die Möglichkeit und Vorraussetzung zur Promotion in seinem Arbeitskreis geboten hat. Ich danke Ihnen für Ihre kompetente Unterstützung, die fachlichen Ratschläge und Ihre beeindruckende wissenschaftliche Exzellenz, die meine wissenschaftliche Ausbildung nachhaltig geprägt hat.

Ein besonderer Dank sei Frau Dr. Janzowski gewidmet! Ohne Ihre unermüdliche Unterstützung und Betreuung hätte ich diese Arbeit nicht bewerkstelligen können. Ich danke Ihnen für das Vertrauen, dass sie mir geschenkt haben, sowie Ihr Wohlwollen und Ihre wertvollen Ratschläge die Sie mir über die gesamte Zeit hinweg bedingungslos mitgegeben haben. Ich bin mit äußerster Hochachtung und Dankbarkeit erfüllt, dass ich unter Ihrer wissenschaftlichen Betreuung promovieren durfte und blicke mit Wehmut an diese schöne und einmalige Zeit zurück.

Herrn Prof. Schrenk danke ich für die wohlwollende Unterstützung, kompetente Koordination und Kooperation in den gemeinsamen Projekten. Diesbezüglich bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeitern der AG Prof. Schrenk, insbesondere bei Jutta Minn für die nette Zusammenarbeit im gemeinsamen Projekt, sowie Andreas Kamyschnikow für die kompetente Hilfe bei technischen und experimentellen Fragen.

Ich danke Prof. Richling für die Kooperation und ihren kompetenten fachlichen Support für die Realisierung der Ileostoma-Studie. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank ebenfalls an das gesamte Team um Prof. Richling, die mit Rat und Tat stets ausgeholfen haben.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dietrich und Herrn Dr. Will von der Forschungsanstalt Geisenheim (Fachgebiet Weinanalytik und Getränkforschung) für die Herstellung, Bereitstellung und Lieferung der unterschiedlichen Apfelsaftextrakte und verschiedenen Apfelsäfte im Rahmen der gemeinsamen Projekte. Diesbezüglich danke ich auch Melanie Olk für die kompetente fachliche Hilfe und Informationen bei allen Fragen zur Herstellung und Analytik der Apfelsaftextrakte/ -Säfte.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Albert, Herrn Dr. Rath, Frau Dr. Herrmannspahn und Herrn Dr. Dehmel von der Medizinischen Klinik III des WestpfälzklNIKUM Kaiserslautern, sowie Frau Weik für ihren Einsatz bei der Verwirklichung und Umsetzung der humanen Interventionsstudie bedanken. Ich danke ihnen für die Rekrutierung der Patienten und Bereitstellung des Studienortes im WestpfälzklNIKUM. Ein weiterer Dank gilt hier auch an Frau Knorr und Frau Dr. Teiwes für ihre fachliche und kompetente Unterstützung während der Studiendurchführung.

Danken möchte ich auch Frau Niederhöfer vom Sanitätshaus Ank in Kaiserslautern für die Zusammenarbeit, sowie ihre Hilfe zur Auswahl und Rekrutierung der Studienteilnehmer und Koordination der Studientermine mit den Patienten.

Ich danke Herrn Dr. Gosenheimer, Herrn Dr. Nissen und Frau Harvey vom Krankenhaus St. Marienwörth in Bad Kreuznach für die Kooperation und Rekrutierung vier weiterer Ileostoma-Patienten, sowie die Bereitstellung der Räumlichkeiten im Krankenhaus zur Studiendurchführung. Ich danke Herrn Dr. Gosenheimer für die nette Zusammenarbeit und dafür dass Sie sich freundlicherweise als weiterer Prüfarzt zur Verfügung gestellt haben. Ihrem Engagement ist es zu verdanken, dass noch weitere notwendige Patienten kurzfristig lokal rekrutiert werden konnten und die Studie die erforderliche Anzahl erreicht hat.

Ich danke Herrn Prof. Wessler und der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland Pfalz (Mainz) für die fachliche Begutachtung und Zulassung des eingereichten Ethikantrags zur Ileostoma-Studie, sowie

die schnelle und unkomplizierte Genehmigung zur Erweiterung des Studienortes um das Krankenhaus St. Marienwörth Bad Kreuznach.

Ein Dank auch den netten Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie in Jena unter der Leitung von PD Dr. Gleis, darunter Dr. Thomas Hofmann, Dr. Daniel Scharlau und Dr. Selvaraju Veeriah, für die nette Zusammenarbeit und kompetenten fachlichen Support im Rahmen des Netzwerkprojektes.

Ich danke dem Land Rheinland-Pfalz für die Finanzierung des A4-Projektes „Darmgesundheit und Ernährung“ das im Rahmen der Schwerpunktförderung Forschung unter dem Hochschulprogramm „Wissen schafft Zukunft“ des Landes initiiert wurde. Weiterer Dank gilt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Projektfinanzierung des Forschungsverbundes „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten der Prävention durch die Ernährung“, sowie die Bereitstellung von Mitteln zur Realisierung dieser Arbeit im Rahmen des Teilprojektes TP. 1.6 mit dem Titel „Erfassung der antioxidativen Wirksamkeit von Nahrungsmittelbestandteilen mit Markern oxidativer Zellschädigung“ (Förderkennzeichen 01EA0101). Darüberhinaus bedanke ich mich bei allen Netzwerkteilnehmern/-Partnern und Projektmitgliedern, deren Mühen und wissenschaftlichen Beiträge zum erfolgreichen Gelingen der Projekte beigetragen haben.

Ich danke Herrn Dr. Martin Schehl, sowie Herrn Dipl.-Kfm Minko Kostov, vom Institut für Verbundwerkstoffe GmbH, dass sie mir während meines Studiums eine Tätigkeit als Hilfwissenschaftler ermöglicht haben. Ich danke Ihnen Herr Schehl, für das Vertrauen das Sie mir geschenkt haben, sowie die nette Zusammenarbeit und Ihre Geduld mit mir. Ich habe in dieser Zeit viel von Ihnen erlernen können und weiß dass sehr zu schätzen.

Ich danke Herrn Dr. Friedbert Pistel, Frau Dr. Monika Hofer und Herrn Dr. Thomas Roth, sowie den netten Kollegen/-innen und Mitarbeiter/-innen der SCC GmbH, für das Vertrauen, Verständnis und ihren Support, sowie die freundliche Aufnahme in den Mitarbeiterkreis der SCC GmbH.

Ich möchte Daniel Bertow für die Freundschaft und seine Hilfsbereitschaft danken. Dafür dass Du immer als Freund da bist, mich mit Rat und Tat unterstützt und mir Vertrauen und Freundschaft geschenkt hast.

Ich möchte des Weiteren nicht versäumen einen Dank an einige Kollegen/-innen, sowie Mitarbeiter/-innen der Lebensmittelchemie auszusprechen, die mich in dieser Zeit mit viel Freude und Spass ermuntert haben.

Ein großer Dank sei den Sekretärinnen des Fachbereichs Chemie und insbesondere denen der Lebensmittelchemie gewidmet. Ich möchte in diesem Sinne mich ganz herzlich bei Frau Hemm, Frau Schramm, Frau Strohauer, Frau Bressemer und Frau Heieck für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Kompetenz in allen Situationen und Belangen danken. Ohne eure Unterstützung, wäre vieles nicht so einfach von Statten gegangen, denn ihr habt immer dafür gesorgt, dass alles schnell und unkompliziert abläuft.

Lieber Ari, unter den Menschen die mir begegnet sind, bist Du höchstwahrscheinlich „The Man of constant sorrow“. Auch wenn bei Dir „The Torture never stopps“, hast Du stets ein „Heart of Gold“ gezeigt und bleibst ein feiner Mensch. Bei technischen Fragen und Problemen warst Du immer mit Rat und Tat zur Stelle und hast keine Mühen dabei gescheut. Auch wenn man es Dir nicht immer anmerken konnte, bist Du ein sehr humorvoller und netter Zeitgenosse, dessen Gegenwart ich vermissen werde.

Lieber Rainer, was soll ich zu Dir sagen, bzw. wo soll ich da anfangen? Das einzige was wir tatsächlich gemeinsam haben ist die Leidenschaft zur Musik! Aber diese eine Gemeinsamkeit hat gereicht, um in den vergangenen Jahren hieraus eine nette Freundschaft gedeihen zu lassen. Von ABBA bis Zappa, Blues, Pop, Folk und Rock haben wir nichts ausgelassen und hatten immer viel Spass und Material für Diskussionen und Gespräche. Ich konnte dabei viele neue und interessante Aspekte über Musik erfahren. Wenn Du bloß nur Gitarre spielen könntest! Als Mensch hast Du mir immer zugehört, Aufmerksamkeit geschenkt und warst jederzeit zur Hilfe bereit. Es verging kein Tag, an dem Du mit Deiner humorvollen

und lustigen Art mich und die meisten Kollegen zum Lachen gebracht hast. Ich wünsche mir, dass wir die Gelegenheit finden uns mal wieder zu sehen. Diese schöne Zeit wird für mich unersetzlich bleiben.

Ich danke Sylvia Schmidt, dass sie mir das tägliche Chaos, das ich im Labor verursacht habe, immer wieder aufs Neue verziehen hat und niemals nachtragend war. Ich weiß, ich habe Dir oft viel Ärger bereitet, aber Du musst zugeben, es war nie langweilig und wir haben uns trotz allem immer gut verstanden. Ich hoffe Du vermisst Deinen „Elitetürken“ etwas.

Liebe Tamara Bakuradze, ich möchte Dir für Deine vertrauensvolle Art und Hilfsbereitschaft danken. Durch Deine immer freundliche, hilfsbereite und selbstlose Art, bist Du eine Bereicherung für den Arbeitskreis, ganz zu Schweigen von dem leider oft zu seltenen Genuss der „georgischen Küche“, den Du uns allen hin und wieder großzügig bereitet hast. Ich wünsche Dir weiterhin viel Erfolg, Glück und Gesundheit in Deinem Leben.

Ich danke meinen ehemaligen Diplomandinnen Claudia Schmitz, Judith Siener und Stephanie Pickard für die tolle und nette Zusammenarbeit. Ich wünsche euch ebenfalls viel Erfolg, Glück und Gesundheit auf euren weiteren Lebenswegen.

Des Weiteren danke ich den Ehemaligen Doktoranden/-innen der Lebensmittelchemie, insbesondere Yufanyi Ngiewih, Tamara Weisel, Sandra Schäfer, Yvonne Fery, Manuela Göttel, Thomas Spormann, Silke Thielen, Xinlai Cheng, Jochen Zeller und allen anderen die ich hier vergessen habe.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern, Schwiegereltern, sowie Freunden und Bekannten, die mich stets unterstützt haben.

Da es mir mit Rücksicht auf den Umfang dieser Danksagung nicht möglich ist, alle Personen zu nennen, möchte ich allen anderen dennoch gerecht werden und danke hiermit denen die ich hier vergessen haben sollte namentlich zu erwähnen und bitte um nachsehen.

Es gibt da aber noch einen Menschen, dem ich mein höchsten Dank schulde:

- dafür, dass Du immer an meiner Seite warst und fest an mich geglaubt hast.
- dafür, dass wir in schweren Zeiten stets zusammengehalten haben und füreinander da waren.
- dafür, dass Du mit Deiner bedingungslosen Liebe, Aufmerksamkeit und Deiner unvergleichlichen Art mein Leben bereichert und mit Glück erfüllt hast.
- und für unsere kleine Tochter,
denn ihr seid für mich das schönste Geschenk auf Erden.

Liebe Bine, mein größter Dank gilt Dir, denn ich bin sehr glücklich dass es Dich gibt!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Vorname / Name: Bülent Soyalan
Geburtsdatum: 15.07.1978
Geburtsort: Bolvadin/Türkei
Familienstand: verheiratet
eMail: bsoyalan@yahoo.de

Akademische Ausbildung

- 05/2006 – 08/2009 **Promotion**, Technische Universität Kaiserslautern,
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie,
AG Prof. G. Eisenbrand/ Dr. C. Janzowski
Thema: Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von
Apfelsäften und polyphenolischen Inhaltsstoffen *in-vitro* und an Ratten
- 10/2005 – 03/2006 **Diplomarbeit**, Technische Universität Kaiserslautern,
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie,
AG Prof. G. Eisenbrand/ Dr. C. Janzowski
Thema: Einfluss von Flavonoiden auf die Transkription der γ -
Glutamylcystein-Synthetase in humanen Kolonzellen
Abschluß: Diplom Lebensmittelchemiker

Schulbildung

- 10/1998 – 03/2006 **Studium**, Lebensmittelchemie & Toxikologie, TU-Kaiserslautern
- 08/1995 – 06/1998 **Gymnasium**, Heidenmauer 14, Bad Kreuznach
- 08/1989 – 07/1995 **Realschule**, Heidenmauer 16, Bad Kreuznach
- 06/1985 – 06/1989 **Grundschule**, Hofgartenstr.14, Bad Kreuznach

Lebenslauf

Praktika

01. 12. 2001

–

30. 04. 2006

Institut für Verbundwerkstoffe GmbH (IVW GmbH), Kaiserslautern

Schwerpunkte:

- EDV-gestützte Auswertung und Verdichtung von Projektdaten verschiedener Fördergeber (DFG, BMBF, EU, etc.)
- Evaluierung und Anfertigung geeigneter Statistiken, Fragebögen, sowie Analysen zur Implementierung der IVW Strategie 2015
- Mitarbeit in der graphischen und inhaltlichen Umsetzung zum Entwurf des IVW-Jahresberichts 2004
- Leitende Funktion für die graphische Umsetzung und den Druck der wissenschaftlichen Institutsposter
- Entwicklung einer auf MS Access basierenden Datenbank mit Tabellen, Formularen, Abfragen und Berichten zur Projektverwaltung
- Mitarbeit bei der Erfassung eines ganzheitlichen Risikomanagements mit Hilfe von Diagrammen und Tabellen

Weiterbildung / Qualifikationen

23. – 27. 02. 2009

DGPT-Kurs 10013: **Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie**
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin

21. 01. 2009

Interdisziplinäres Tumorboard
Krankenhaus St. Marienwörth, Bad Kreuznach

20. – 31. 10. 2008

DGPT-Kurs 10021: **Klinische Toxikologie**
Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben (BBGes), Institut für Toxikologie - Klinische Toxikologie und Giftnotruf Berlin, Berlin

15. – 17. 10. 2007

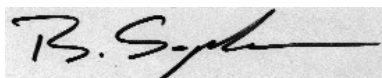
DGPT-Kurs 10023: **Lebensmitteltoxikologie**
Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie, Kaiserslautern

27. – 31. 08. 2007

DGPT-Kurs 10018: **Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik**
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Zürich, Zürich

18. 11. 2002

Eingeschränkte **Sachkunde** nach §5 Chemikalien-Verbotsordnung (ChemVerbotsV.)



Norheim, den 04.03. 2009