
**Abschlussbericht des BMBF Netzwerkprojektes
„Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und
Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung“**

für den Zeitraum 01.07.2002 bis 30.06.2009

Zuwendungsempfänger

Friedrich-Schiller-Universität Jena

I.4.1 Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Institut für Ernährungswissenschaften,
PD Dr. Michael Glej; Prof. Beatrice L. Pool-Zobel†

I.4.2 Institut für Molekulare Zellbiologie, Zentrum für Molekulare Biomedizin, HD Prof. Dr. Frank
Böhmer

Projektbezeichnung

Teilvorhaben 1.4

**Bestimmung der Modulation von entgiftenden Enzymsystemen als Biomarker der
Chemoprotektion in humanen Kolonzellen**

Förderkennzeichen

FKZ 01EA0503

I. Einleitung

1. **Aufgabenstellung Teilprojekt 1.4**

Kolorektale Tumore sind eng mit Ernährungsfaktoren assoziiert. Zu diesen gehören Risikosubstanzen, die in den Stammzellen Mutationen in krebsrelevanten Genen induzieren sowie protektive Stoffe, die Stammzellen vor den Risikosubstanzen schützen. Zu den Schutzmechanismen zählt die Induktion der Glutathion S-Transferasen (GST) und anderer Phase II Enzyme, die zur Entgiftung von Fremdstoffen beitragen. Möglicherweise können pflanzliche Lebensmittel durch Genaktivierung in Darmzellen und Erhöhung der Entgiftungskapazität einen Beitrag zur Reduktion des Kolonkrebsrisikos leisten. Lösliche Inhaltsstoffe oder Produkte, die bei der Fermentation von nicht verdaulichen Pflanzenstoffen im Darm entstehen, kommen für diese Schutzwirkungen in Betracht.

Für dieses Teilvorhaben stellte sich die Frage, ob Apfelinhaltsstoffe und deren Metabolite chemopräventiv wirken und welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Entsprechend den Fachkompetenzen der Partner wurde geklärt, (1) welche Gene des Chemoprotektionssystems im Kolon induzierbar sind, (2) welche Signaltransduktionswege zur Genaktivierung führen und (3) inwiefern funktionelle Konsequenzen der Protektion die Folge sind. Darüber hinaus wurden neue Wirkungsparameter (4) als Biomarker etabliert. Diese wurden dann im Rahmen der humanen Interventionsstudien mit trübem Apfelsaft erprobt.

2. **Voraussetzungen für das Vorhaben**

Forschungsschwerpunkte des **Arbeitskreises Pool-Zobel / Gle1** sind Untersuchungen zur Ernährungsprävention, zu den Mechanismen der Kolonkarzinogenese und zur Entwicklung relevanter Biomarker. Die Gruppe erhält regelmäßig Resektionsmaterial (Dr. Sendt, Dr. Scheele, Universitätsklinikum Jena) um an Kolonzellen [1, 2] Interaktionen zwischen Genen und nutritiven Faktoren (Genexpression, Gentoxizität) zu untersuchen. Bestimmt werden auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene die Induzierbarkeit der GST. Weitere Expertise auf dem Gebiet der Entwicklung und Anwendung von neuen Biomarker-Methoden zeichnet die Gruppe ebenfalls aus. Dies war eine wichtige Basis für die Durchführung der geplanten Untersuchungen [2, 3, 4; 5; 6].

1. Liegibel, U.M., **Pool-Zobel, B.L.**, Abrahamse, S.L., and Rechkemmer, G. (2000) Detection of oxidative stress in human colon cells using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Free Rad Res*, **32**, 535-547.
2. 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. *Mutation Res*, **472**, 59-70.
3. **Pool-Zobel, B.L.**, Bub, A., Müller, H., Wollowski, I., and Rechkemmer, G. (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of an intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, **18**, 1847-1850
4. Branca, F., Hanley, A. B., **Pool-Zobel, B. L.**, Verhagen, H. (2001): "Biomarkers in disease and health." *British Journal of Nutrition*, **85 (Suppl. 1)**, S55-S92

5. **Glei, M.**, Habermann, N., Osswald, K., Seidel, C., Persin, C., Jahreis, G., **Pool-Zobel, B.L.** (2005): "Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using Comet assay: a biomarker model." **Biomarkers**, **10 (2-3)**, 203-17
6. **Glei, M.**, Hofmann, T., Küster, K., Hollmann, J., Lindauer, M.G., **Pool-Zobel, B.L.** (2006): "Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide." **J Agric Food Chem**, **54(6)**, 2088-95

Die Expertise der **Arbeitsgruppe Böhmer** betrifft die Analyse von Signaltransduktionsketten, insbesondere von Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Selektive Blocker von RTK und cytoplasmatischen Tyrosinkinasen wurden identifiziert und in zellulären Systemen analysiert [1, 2]. Ein wesentlicher bisheriger Arbeitsschwerpunkt war die Modulation von RTK-Signalwegen durch Protein-Tyrosinphosphatasen [3, 4], einschließlich der Modulation durch UV-Strahlung und Oxidation [5]. Methoden zur Messung verschiedenster Signaltransduktionsereignisse, einschließlich von Transkriptions-Ereignissen [6], sind im Labor etabliert und bildeten die Voraussetzung für die Untersuchungen.

1. Mahboobi, S., Teller, S., Pongratz, H., Hufsky, H., Sellmer, A., Botzki, A., Uecker, A., Beckers, T., Baasner, S., Schächtele, C., Überall, F., Kassack, M.U. Dove, S., **Böhmer, F.D.** (2001) Bis(1H-2-indolyl)methanones as a novel class of inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor kinase. *J.Med. Chem.*, im Druck
2. Kovalenko, M., Rönstrand, L., Heldin, C.H., Loubtchenkov, M., Gazit, A., Levitzki, A., **Böhmer, F.D.** (1997) Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor -receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrophostin AG1296 *Biochemistry* **36**, 6260-6269
3. Keilhack, H., Müller, M., Böhmer, S.A., Frank, C., Weidner, M., Birchmeier, W., Berndt, A., Kosmehl, H., Günther, B., Müller, T., Birchmeier, C., **Böhmer, F.D.** (2001) Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling - an epithelial function of the SH2 domain protein-tyrosine phosphatase SHP-1, *J. Cell Biol.* **152**, 325-334
4. Kovalenko, M., Denner, K., Sandström, J., Persson, C., Groß, S., Jandt, E., Gayá, A., **Böhmer, F.D.**, and Östman, A. (2000) Site-selective dephosphorylation of the PDGF β -receptor by the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1 *J. Biol. Chem.* **275**, 16219-16226
5. Groß, S., Knebel, A., Tenev, T., Neininger, A., Gaestel, M., Herrlich, P., and **Böhmer, F.D.** (1999) Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 26378-26386
6. Tenev, T., Böhmer, S. A., Kaufmann, R., Frese, S., Bittorf, T., Beckers, T., **Böhmer, F. D.** (2000) Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells *Eur. J. Cell Biol.*, **79**, 1-11

In der ersten Förderphase des Projektes (01.07.2002-30.06.2005) wurden zahlreiche wissenschaftliche Ergebnisse erzielt, die Grundlage für die Planung der zweiten Förderphase waren. Die Ergebnisse der ersten Förderphase wurden im entsprechenden Endbericht detailliert dargestellt. Der hier vorgelegte Bericht stellt deshalb detailliert nur die Arbeitsergebnisse der zweiten Förderphase (01.07.2005-30.06.2009) dar.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Wenig ist über die ernährungsabhängige Modulation der entgiftenden Enzyme nach Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln im humanen Kolon bekannt. Es war deshalb Ziel der Arbeiten, Parameter zu finden und anzuwenden, um Mechanismus der Chemoprotektion gezielt *in vitro* zu charakterisieren. Ausgewählte Parameter, die hier besondere Substanzwirkungen widerspiegeln, wurden als Biomarker im Rahmen der im Netzwerk durchgeführten Apfelsaftinterventionsstudien (insbesondere die Studie mit gesunden Probanden) untersucht. *In*

in vitro Untersuchungen sowie die anschließenden humanen *ex vivo* Interventionsuntersuchungen wurden unter Berücksichtigung der zu erwartenden biologischen Variationsbreite mehrfach wiederholt und einer statistischen Auswertung unterworfen. Im Folgenden sind die Aufgaben und Ziele des Teilprojektes als Meilensteine formuliert:

I. Voruntersuchungen:
Effekte von Apfelproben (Extrakte, Trubstoffe, Polyphenol-Mischungen), Fermentationsüberständen, Metaboliten, Butyrat an Kolonazellen unterschiedlichen Transformationsgrads <i>in vitro</i>
Inkubation, Bestimmung von Cytotoxizität, H ₂ O ₂ -Bildung, Zellproliferation, Apoptose, Ermittlung der EC50, RNA- und Zytosol-Isolierung (Pool-Zobel)
Meilenstein 1: Kenntnis der "bioaktiven" Konzentrationsbereiche der apfelrelevanten Komponenten bzw. Fermentationsprodukte (Einfluss auf Zellzahl, pro-oxidative Kapazität, Apoptose)
II. Parameter der Chemoprotektion:
II.A. Gen-Expression
Design Custom Array (Pool-Zobel)
Statistische Analyse und Optimierung des Custom Array, (Pool-Zobel, Thijs)
Expressionsuntersuchungen mit Superarray und mit Custom Array (Pool-Zobel)
RealTime PCR & Northern Blot (Pool-Zobel)
Proteinexpression, Enzymaktivitäten
Meilenstein 2: Kenntnisse zur modulierenden Wirkung von Apfelinhaltsstoffen und Fermentationsprodukten auf die Expression von ausgewählten Genen der Chemoprotektion, Identifizierung möglicher Zielgene/Enzyme, deren Modulierung zur Erhöhung der Protektion führt
II.B. Antigenotoxizität
Meilenstein 3: Charakterisierung protektiver Wirkungen durch apfelrelevante Substanzen gegenüber genotoxischen Risikosubstanzen, basierend auf den Kenntnissen der modulierten Genexpression
II.C. Mechanismen der Gen-Aktivierung
GSTT2, Nrf2 Reporterger Assays (Böhmer)
neue Zellmodelle mit GSTT2 Über- und Unterexpression (Böhmer)
Apfelinhaltsstoffe als Modulatoren der Dep-1 Expression (Böhmer)
Meilenstein 4: Kenntnis über die Mechanismen durch welche relevante Zielgene durch Apfelverbindungen moduliert werden a) Charakterisierung der Effekte auf die DEP-1 Expression b) Analyse der GSTT2- und Nrf2-Promoterregulation c) Eingrenzung der relevanten Verbindungen durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung
Meilenstein 5: Ist die Modulation von GSTT2 kausal mit der Chemoprotektion verknüpft? Untersuchungen an Zelllinien mit manipulierter GSTT2 Expression.
III. BIOMARKER der Chemoprotektion:
III.A. Grundlagen, <i>in vitro</i>
Ileostomieproben (Pool-Zobel, Böhmer)
Meilenstein 6: Charakterisierung der protektiven Wirkungen von Ileostomieproben nach Apfelsaftaufnahme
III.B. Biomarker Grundlagen, <i>ex vivo</i>
Vergleich der Expression an Lymphozyten, Kolonozyten (Pool-Zobel, Böhmer)
Meilenstein 7: Vergleichende Analysen der Expressionshöhen an Lymphozyten und Kolonozyten, um Aussagen zu treffen inwiefern beide mögliche Biomarker übereinstimmend sind
III.C. Biomarker Anwendung
Messung der Parameter an Lymphozyten, Stuhlwasser (Pool-Zobel, Böhmer)
Meilenstein 8: Biomarkeranalysen an Stuhlproben und Lymphozyten

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zur Anknüpfung des Vorhabens

In den industrialisierten Ländern mit vorherrschender „western style diet“ sind maligne Veränderungen des humanen Kolons eine der häufigsten Krebserkrankungen und Krebstodesursachen. Eine Umstellung der Ernährungsweise kann das Risiko zu erkranken, allerdings erheblich minimieren. Der Verzehr von Obst und Gemüse erhöht die Aufnahme von bioaktiven Komponenten, denen ein krebsprotektives Potential zugeschrieben wird. Insbesondere die Polyphenole weisen chemopräventive Eigenschaften auf. Äpfel enthalten signifikante Gehalte an Polyphenolen und können damit als potentiell chemoprotektiv eingestuft werden. Die Resorptionsrate von Polyphenolen im Dünndarm ist als allgemein gering einzustufen, so dass beträchtliche Konzentrationen das Kolon erreichen und dort einer mikrobiellen Metabolisierung unterliegen. Ziel dieses Teilprojektes waren die Untersuchungen zur Bedeutung von Apfelpolyphenolen und deren phenolischen Abbauprodukte in der Chemoprävention von Kolonkrebs *in vitro*. Dabei sollten der Modulation von entgiftenden Enzymen sowie der Hemmung der Tumorprogression eine besondere Rolle zukommen.

Die wichtigste Grundlage für die Konzipierung und stete Anpassung des Projektes waren die eigenen Ergebnisse und die Ergebnisse der Forschung der anderen Teilprojekte des Netzwerkes in der ersten Förderphase. In den eigenen Untersuchungen wurden vor allem die folgenden, für die Weiterarbeit wichtigen Ergebnisse erzielt:

- (1) Apfelinhaltsstoffe hemmten das Wachstum von humanen Kolonepithelzellen (darunter Karzinom- und Adenomzellen)
- (2) Unter Verwendung von verschiedenen Techniken konnten wir Hinweise erhalten, dass subtoxische Konzentrationen der Apfelextrakte in Kolonepithelzellen GST-Gene sowie die Expression des Tumorsuppressorproteins DEP-1/PTPn_j, einer Protein-Tyrosinphosphatase, induzieren.
- (3) Im Rahmen dieser Studien wurden verschiedene Methoden etabliert, darunter qRT-PCR Protokolle und Reporter-Assays für mehrere relevante Gene, sowie Methoden für die *in vitro*-Untersuchung von Fäzeswässern & Fermentationsprodukten.

Zu Ergebnissen der Netzwerkpartner, die für die Weiterführung von besonderer Bedeutung waren, zählten:

- (1) Die Etablierung von Fraktionierungsmethoden für Apfelinhaltsstoffe und die Identifizierung der Komponenten von derartigen Fraktionen.
- (2) Der Nachweis protektiver Wirkungen von Apfelsaft in einem Ratten-Modell der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese.
- (3) Die Etablierung der Gewinnung von Ileostoma-Proben Apfelsaft-trinkender freiwilliger Probanden.

In der internationalen Fachliteratur wurden im Zeitraum der ersten Förderperiode (01.07.2002-30.06.2005) äußerst wenige Berichte zur Untersuchung von Apfelinhaltsstoffen publiziert.

Diese, aber auch einschlägige Arbeiten zur Chemoprotektion durch polyphenolische Inhaltsstoffe anderer Pflanzenprodukte wurden selbstverständlich in die Konzipierung der eigenen Arbeiten einbezogen.

Die Analyse der einschlägigen Fachliteratur ist jeweils in den Publikationen im Detail dargestellt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Unter den Projektpartnern innerhalb des BMBF-Netzwerkes fand ein ständiger, reger Austausch von Informationen und Probenmaterial statt.

Anfangs war dem TP 1.4 die Arbeitsgruppe um Stefan Wöfl (TP 1.4 c) angegliedert, wobei die direkte Kommunikation in regelmäßigen Treffen erfolgte. Aufgrund des Rufes nach Heidelberg wurde der Arbeitsbereich um Stefan Wöfl als separates Teilprojekt vom übrigen abgetrennt, wobei der regelmäßige Austausch, nicht nur wegen der themenbedingten erforderlichen gegenseitigen Zuarbeit, bestehen blieb. In der Zusammenarbeit mit TP1.4c und TP1.8 wurden Untersuchungen zum Einfluss von Apfelsaft auf die Genexpression *in vivo* in Ratten durchgeführt. Das TP 1.2 bildete mit der Herstellung der Probenmaterialien aus Äpfeln sowie der chemischen Analyse der Testsubstanzen die Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen aller weiteren Teilprojekte. Außerdem standen für analytische Fragestellungen TP 1.1 und TP 1.3 (Richling/Marko) zur Verfügung. Mit dem TP 1.3 wurde auch zum Mechanismus der anti-proliferativen Wirkungen von Apfelextrakten zusammen gearbeitet. Ein Austausch von Probenmaterial und Erfahrungen bezüglich methodischer Probleme erfolgte regelmäßig auch mit TP 1.6 (Eisenbrand/Janzowski). Eine erfolgreiche Kooperation zur Aktivierung Nrf2-abhängiger protektiver Mechanismen bestand mit dem TP1.7 (Gerhäuser). Kooperationen im Bereich der Probenaufbereitung der humanen Interventionsstudien bestanden zwischen uns und den TP 1.8 sowie 1.9 (Briviba/Bub/Rechkemmer). Frau Dr. Anja Weise aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie des Universitätsklinikums in Jena war für die regelmäßige Karyotypisierung unserer *in vitro*-Zellmodelle verantwortlich, um die genetische Stabilität der Zellen nachzuweisen und damit die Aussagekraft der Ergebnisse zu untersetzen. Unterstützung zur statistischen Auswertung der Ergebnisse, insbesondere der Array-Analysen, erhielten wir durch Prof. Herbert Thijs (Universität Hasselt, Interuniversitäres Institut für Biostatistik und statistische Bioinformatik).

II. Zusammenfassung aller Erkenntnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Charakterisierung der verwendeten Zellmodelle

Der Einfluss der Testsubstanzen wurde vorwiegend an den **humanen Kolonzelllinien HT29 und LT97** untersucht.

Bei den verwendeten HT29 Zellen handelt es sich um eine adhärenente Adenokarzinomzelllinie des rektosigmoidalen Kolons, welche sich in ihrer Entwicklung im letzten Krebsstadium vor der Metastasierung befindet. Der Ursprungstumor wurde 1964 aus einer an Kolonkrebs erkrankten Kaukasierin isoliert und als stabile Zelllinie etabliert [1]. Die Zelllinie dient als Modell für die undifferenzierten Zellen der Kryptenregion des menschlichen Dickdarmes und weist neben Mutationen im *APC*- und *K-ras*-Gen einen Verlust der beiden Allele des *p53*-Gens auf. Die Zellen weisen in Kultur einen stabilen Transformationsgrad auf und eignen sich daher für Untersuchungen chemopräventiver Mechanismen.

Demgegenüber wurden die LT97 Zellen aus einem humanen Kolon-Mikroadenom isoliert und ebenfalls als adhärenente Zelllinie etabliert [2]. Der Spender war an einer „familiären adenomatösen Polyposis“ erkrankt. Die Adenomzelllinie repräsentiert ein sehr frühes Stadium der Kolonkarzinogenese. Sie zeigt einen Verlust der beiden *APC*-Genallele sowie eine Mutation des *K-ras*-Onkogens. Im *p53*-Gen liegt keine Mutation vor, so dass die Zellen insgesamt genetische Veränderungen aufweisen, die charakteristisch für prä-maligne Kolonepithelzellen sind. Diese Zellen eignen sich als Modell zur Untersuchung wesentlicher Aspekte der Primärprävention daher besser, als die stärker transformierten HT29 Zellen. Für ausgewählte Fragestellungen, insbesondere die Untersuchung der Rolle des Tumorsuppressors DEP-1, wurden noch weitere Kolonepithelzellen in die Untersuchungen einbezogen, darunter die Linien SW480, und HCT116.

Neben den adhärenenten Zellkulturmodellen wurden teilweise für vergleichende Untersuchungen auch Lymphozyten, isoliert aus Buffy Coats, herangezogen. Das Arbeiten mit primären Kolonozyten aus Biopsieproben wurde vorwiegend durch die Arbeitsgruppe um Stefan Wölfel übernommen. Durch die Schaffung seines eigenen Teilprojektes sind diese Ergebnisse nicht Gegenstand des vorliegenden Berichtes der AG Böhmer/ AG Gleib, Pool-Zobel.

Meilenstein I: Kenntnis der "bioaktiven" Konzentrationsbereiche der apfelrelevanten Komponenten bzw. Fermentationsprodukte

Im Rahmen von Voruntersuchungen (Einfluss auf das Zellwachstum, pro-oxidative Kapazität, Apoptose) sollten für die Apfelpolyphenolextrakte, synthetische Polyphenolmischung, Einzelsubstanzen, Polyphenolmetabolite und Trubstoffe zunächst effektive Konzentrationsbereiche und weitere Behandlungsparameter definiert werden. Für die Untersuchungen zu chemopräventiven Effekten, insbesondere in Bezug auf die Induzierbarkeit von Biotransformationsgenen sowie die Hemmung der Tumorprogression, mussten Konzentrationen ermittelt werden, die keine zytotoxischen und genotoxischen Konsequenzen hervorrufen.

Apfelpolyphenolextrakte

Apfelpolyphenole beeinflussen die Zellzahl zeit- und dosisabhängig.

Zunächst wurde für jede neue Testsubstanz bzw. jeden neuen Komplex der Einfluss auf die Zellzahl und damit auch die Zytotoxizität unter Verwendung der Kolonzellmodelle HT29 und/oder LT97 mittels DAPI-Assay bestimmt.

Die Behandlung der Zellen mit den Apfelpolyphenolextrakten (AE) unterschiedlicher Erntejahrgänge beeinflussten das Zellwachstum zeit- und dosisabhängig (Abb. 1), wobei AE03 die stärksten Effekte zeigte. Dieser Effekt korreliert mit den Gehalten an Polyphenolen in den Extrakten, da AE03 insgesamt höhere Konzentrationen an Phloridzin- und Quercetinderivaten enthält. Die LT97 Zellen reagierten generell sensitiver als die HT29 Zellen (ohne Abbildung).

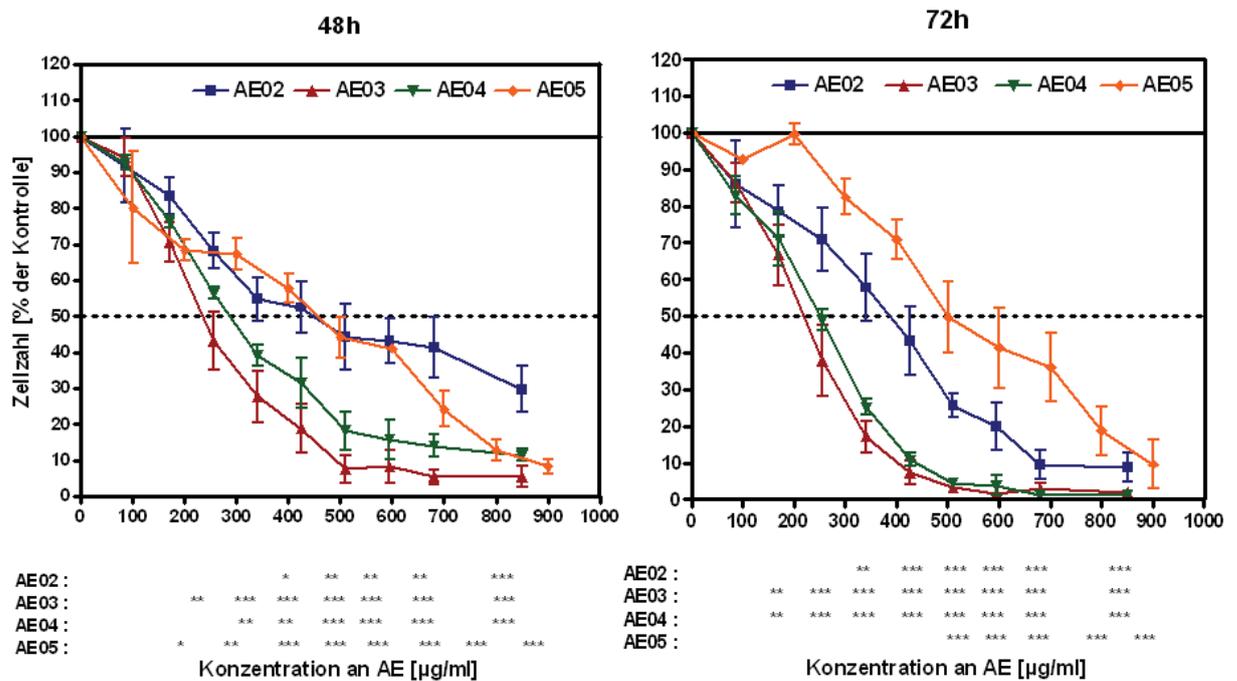


Abb. 1: *Inhibierung des Zellwachstums in LT97 Zellen nach Inkubation mit Apfelpolyphenolextrakten verschiedener Jahrgänge (48 h und 72 h); n=3; MW \pm SD, one-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*

Fermentierte Apfelpolyphenolextrakte haben im Vergleich zu unmetabolisierten Extrakten geringere antiproliferierende Eigenschaften.

Die *in vitro*-Fermentation (24 h Simulation der Dickdarmpassage) des Apfelextraktes AE02 (10 g fermentierbare Substanz/Liter) resultierte in der Bildung von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA). Dabei wurde hauptsächlich Acetat (Mittelwert (MW): 24,45 mmol/L) gefolgt von Butyrat (MW: 4,6 mmol/L) und Propionat (MW: 4,11 mmol/L) gebildet. Nach der Fermentation wurden lediglich 0,1 – 1 % der Gesamtpolyphenole wieder gefunden. Insgesamt zeigten die fermentierten AE ebenfalls eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der Beeinflussung der Zellzahl, wobei die Effekte schwächer ausfielen als die der unfermentierten AE (ohne Abbildung).

Die Lagerung bei Raumtemperatur hat Einfluss auf die antiproliferativen Eigenschaften der Apfelpolyphenolextrakte.

Bedingt durch den Verbrauch des ursprünglich zur Verfügung gestellten AE02 und der Planung weiterführender Untersuchungen wurde eine neue Charge des Extraktes desselben Erntejahrganges aus gleicher Produktionslinie nachgefordert. Dieser wurde allerdings über mehrere Jahre bei Raumtemperatur gelagert. Es zeigte sich, dass sich die neue Charge in ihrer Polyphenolzusammensetzung stark von der des Ausgangsextraktes AE02 unterschied (Tab. 1). Insgesamt wurde weniger als die Hälfte der Gesamtpolyphenolkonzentration wieder gefunden. Außerdem waren zusätzlich Aglykone (z.B. Quercetin, Phloretin) nachweisbar, was deutlich auf

Degradationsprozesse, möglicherweise bedingt durch exogene Faktoren wie UV-Licht und Temperaturunterschiede, hinweist.

Tab. 1: **Polyphenolzusammensetzung des Originalextraktes im Vergleich zum AE02 neue Charge**

Polyphenol	mg/g	
	Originalextrakt	neue Charge
Chlorogensäure	181,5	149,5
Kaffeesäure	4,8	2,7
p-Cumarsäure	-	1,7
4-Cumaryl-Chinasäure	77,3	19,3
Procyanidin B1	7,0	1,7
Procyanidin B2	15,1	6,1
(-)-Epicatechin	19,2	0,6
(+)-Catechin	-	0,6
Phloridzin	27,9	20,0
Phloretin	-	0,5
Phloretin-Xyloglucoside	138,9	34,6
Quercetin-3-O-glucosid	1,4	-
Quercetin-3-O-galactosid	0,8	0,5
Quercetin-3-O-rutinosid	2,6	0,2
Quercetin-3-O-rhamnosid	4,1	0,6
Quercetin	-	1,1
Summe	480,4	215,9

Vergleicht man die Wirkung des Originalextraktes und der neuen Charge auf das Wachstum der LT97 Zellen, so zeigt sich ein wesentlich stärkerer, konzentrationsabhängiger Effekt durch die neue Charge (Abb. 2). Dies muss der abweichenden Polyphenolzusammensetzung und damit auch den enthaltenen Abbau- und Oxidationsprodukten der Polyphenole zugeschrieben werden.

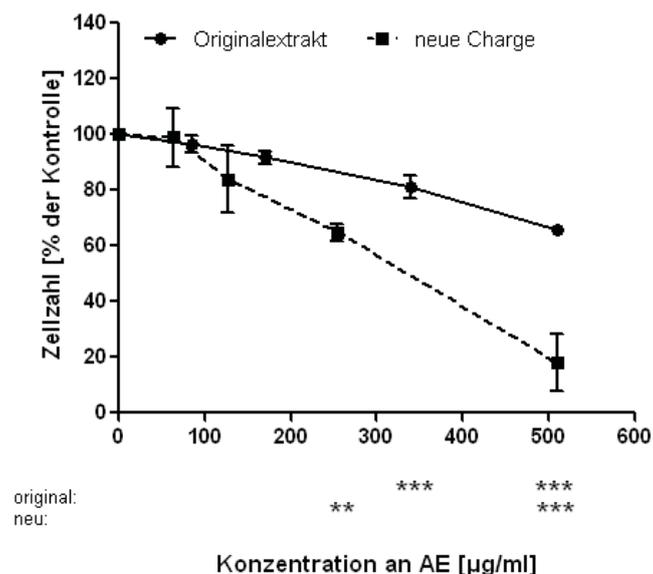


Abb. 2: **Inhibierung des Zellwachstums in LT97 Zellen nach Inkubation mit dem Originalextrakt AE02 sowie der neuen Charge (24 h); n=3; MW±SD, one-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, **p<0,01; ***p<0,001.**

Die Apfelpolyphenole weisen in DMEM-Medium ein pro-oxidatives Potential auf.

Neben antioxidativen Eigenschaften werden den Polyphenolen auch pro-oxidative Effekte zugesprochen. So weisen die AE das Potential zur Generierung von H₂O₂ zeit- und dosisabhängig auf (Beispiel AE05, DMEM-Medium + 10% FKS, ermittelt mit dem FOX2-Assay, Abb. 3). Allerdings ließen sich im Zellkulturmedium für LT97 Zellen (MCDB + 2% FKS) keine reaktiven Sauerstoffspezies nachweisen, so dass dieser Effekt in Abhängigkeit vom Medium und damit verbunden auch vom Puffersystem (DMEM: Bicarbonat; MCDB: HEPES) detektiert werden kann. Um deshalb jegliche Einflüsse von H₂O₂ auszuschließen und damit eine unverfälschte Interpretation der *in vitro* Ergebnisse zu ermöglichen, wurde jedem weiteren Versuchsansatz mit HT29 Zellen im DMEM-Medium und Apfelinhaltsstoffen Katalase (100 U/mL) zugesetzt.

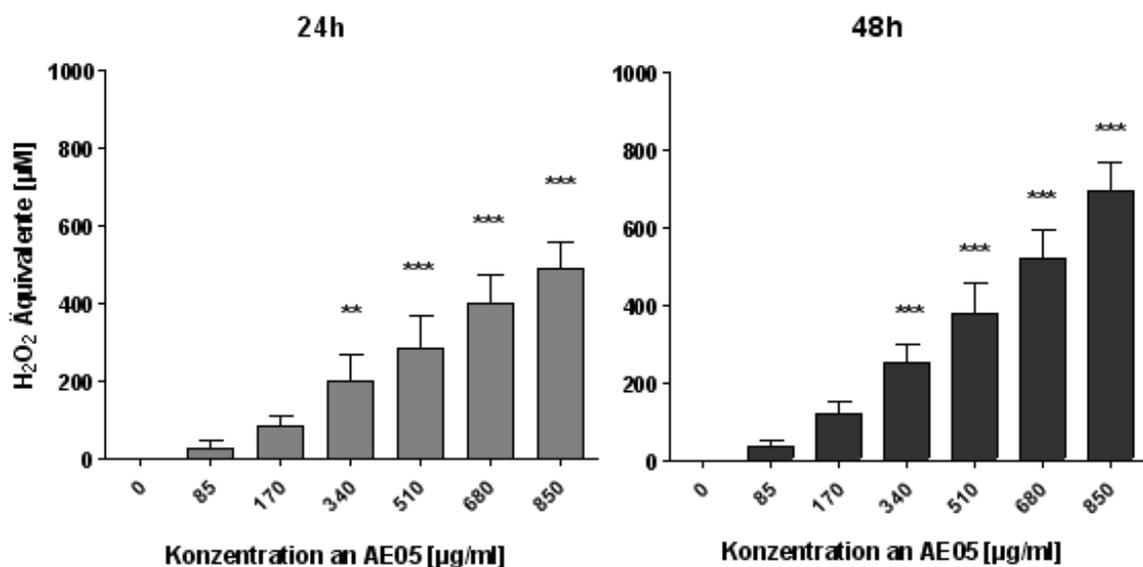


Abb. 3: **Einfluss von Apfelpolyphenolextrakten auf die Bildung von H₂O₂ im Zellkulturmedium für HT29 Zellen (DMEM + 10% FCS) am Beispiel des AE05 (24 h, 48 h);** n=3; MW+SD, one-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, **p<0,01; ***p<0,001.

Synthetische Polyphenolmischung

Das antiproliferative Potential des Apfelpolyphenolextraktes 02 ist mit dem der äquivalenten synthetischen Polyphenolmischung vergleichbar.

Eine synthetische Polyphenolmischung (SPM), analog der Zusammensetzung des AE02 (Originalextrakt) aus allen kommerziell erhältlichen Polyphenolen (Chlorogen-, Kaffeesäure, Procyanidin B1 und B2, Epicatechin, Phloridzin, Quercetinglycoside), wies vergleichbare wachstumsinhibierende Eigenschaften wie der AE02 in LT97 Zellen auf (Abb. 4). Demnach lassen sich die antiproliferativen Effekte v.a auf die Kombination der genannten Polyphenole zurückführen.

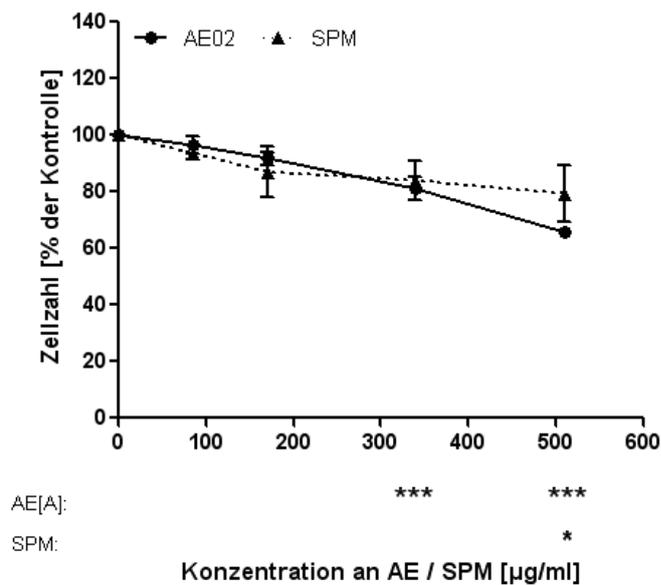


Abb. 4: **Inhibition des Zellwachstums in LT97 Zellen nach Inkubation mit dem Originalextrakt AE02 sowie der synthetischen Polyphenolmischung (24 h)**; n=3; MW±SD, one-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, *p<0,05; ***p<0,001.

Polyphenole als Einzelsubstanzen

Die einzelnen Polyphenole zeigen nur eine schwache Wachstumsbeeinflussung.

Weiterhin erfolgte die Untersuchung isolierter Apfelinhaltsstoffe (Kaffeensäure, Chlorogensäure, Epicatechin, Phloridzin, Phloretin, Quercetin sowie dessen Glycoside; 0 – 300 µM) im Vergleich zum komplexen AE02 (0 – 200 µM Phloridzin-Äquivalente) an HT29 Zellen, um die antiproliferativen Effekte des AE02 möglicherweise auf spezifische Einzelsubstanzen zurückführen zu können. Tabelle 2 zeigt die effektiven Konzentrationen der Testsubstanzen, die zu einem Verlust von 50 % der Zellen (EC₅₀) nach Inkubation führten.

Tab. 2: **Wachstumshemmende Effekte von isolierten Polyphenolen** (HT29 Zellen, n=3, MW)

Substanzen	EC ₅₀		
	24 h	48 h	72 h
AE02 [µM Ph. Ä.]	-	31	21
Kaffeensäure [µM]	-	235	189
Chlorogensäure [µM]	-	-	289
Epicatechin [µM]	-	-	-
Phloridzin [µM]	-	-	-
Phloretin [µM]	-	169	149
Quercetin [µM]	-	148	102
Quercetin-3-galactosid [µM]	-	-	-
Quercetin-3-glucosid [µM]	-	-	-
Quercetin-3-rhamnosid [µM]	-	-	-
Quercetin-3-rutinosid [µM]	-	-	-

Polyphenolmetabolite

Wesentliche Polyphenolmetabolite haben keinen Einfluss auf die Zellzahl.

Da Polyphenole nach der Magen-Darmpassage und Fermentation durch die humane Mikroflora im Dickdarm überwiegend in metabolisierter Form vorliegen, wurde eine Versuchsreihe mit Polyphenolmetaboliten geplant, um sich auch *in vitro* an die physiologischen Gegebenheiten des menschlichen Körpers besser anzupassen. Für die Untersuchungen wurden die 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (ES), ein Metabolit des Quercetins, und die 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (PS), ein Metabolit der Chlorogen- sowie der Kaffesäure, gewählt. Für beide Metabolite wurden in der Literatur bereits physiologische Konzentrationen im Fäzeswasser beschrieben und auch im Rahmen der humanen Apfelsaftinterventionsstudie mit gesunden Probanden Daten generiert (TP 1.9 AG Rechkemmer). Für die PS konnten dabei im Vergleich zur ES nach Apfelsaftaufnahme wesentlich höhere Konzentrationen im Fäzeswasser detektiert werden, was die innerhalb der Versuche verwendeten, voneinander abweichenden Konzentrationen begründet (ES: 0 - 18 μM , PS: 0 - 90 μM). In den gewählten Konzentrationen zeigte keiner der beiden Metabolite über einen Inkubationszeitraum von 24 h bis 72 h einen Einfluss auf das Zellwachstum (ohne Abbildung).

Apfelsafttrub

Fermentierter Apfelsafttrub beeinflusst das Zellwachstum und die Apoptoserate nicht.

Des Weiteren wurde die Trubfraktion eines Apfelsaftes (Jahrgang 2007) für die Zellkultur und damit für Untersuchungen im Hinblick auf ihr vielversprechendes, chemopräventives Potential zugänglich gemacht. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Zellkulturmedium oder alkoholischen Lösungen wurde hierfür die Methode der *in vitro* Fermentation gewählt. Dabei wurde die gesamte gastrointestinale Passage (von Mund zu Dickdarm) unter Einstellung der für den jeweiligen Abschnitt typischen physiologischen Bedingungen (Inkubationszeit, pH-Wert, Temperatur, Gasatmosphäre) simuliert (Abb. 5). Durch Zugabe des Fäzes-Inokulums (Fäzesmischprobe von ≥ 3 gesunden Fäzesspendern) zum „Dünndarminhalt“ nach erfolgter Dialyse wurden die für die Fermentation notwendigen intestinalen Mikroorganismen zugeführt. Ein

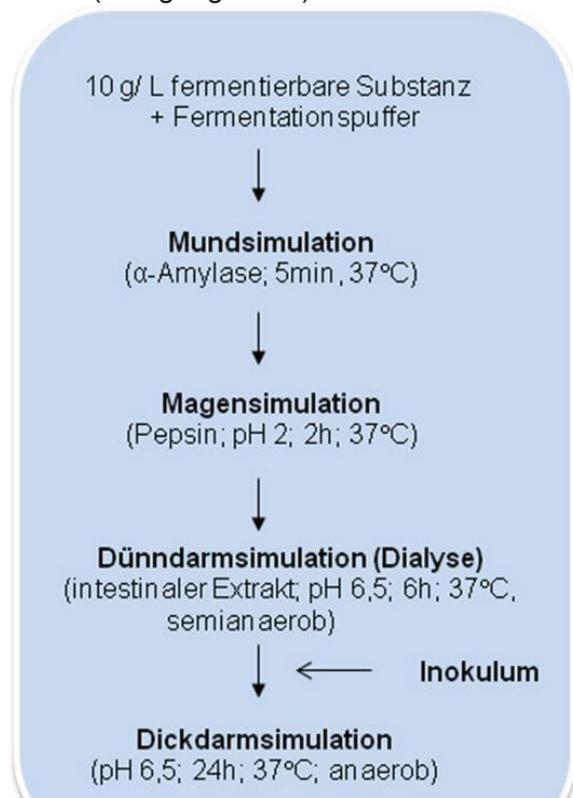


Abb. 5: **Ablauf der *in vitro* Fermentation**

im Vorfeld durchgeführter Versuchsansatz bis ausschließlich Dickdarmsimulation mit der Trubfraktion des AS02 bestätigte die Eignung dieser Methode für die Trubfraktion. Der Nachweis von Polyphenolen/-metaboliten im Retentat nach Dünndarmsimulation durch die AG Richling ließ auf die Möglichkeit einer Metabolisierung der detektierten Polyphenole durch die Mikroflora während der Dickdarmsimulation schließen.

Die Fermentation des Ultrafiltrationstrubes von AS07 (300 kDa) mit bekannter Zusammensetzung (Tab. 3) wurde in vier Ansätzen durchgeführt und gepoolt, um ausreichend Material zu generieren. Neben der Fermentation der Trubfraktion wurde parallel eine Kontrolle (Blank) ohne Testsubstanz mitgeführt, um eventuelle Effekte des Fermentationsansatzes (Puffer, Enzyme, Fäzes) in den Untersuchungen auszuschließen.

Tab. 3: **Zusammensetzung der verwendeten Trubfraktion [Bezug:Trockensubstanz]** (Quelle: TP 1.2)

	Ultrafiltrationstrub 300 kDa [%]
Zuckerbausteine	31,5
Aminosäuren	17,7
Fett	15,4
Asche	1,7
Procyanidine	5,3
nicht definiert	28,4

Nach erfolgter *in vitro* Fermentation wurden die Fermentationsüberstände Blank und Trub (FÜ Blank/FÜ Trub) bezüglich ihrer SCFA- (Abb. 6, links) und Polyphenol/-Metaboliten-Zusammensetzung analysiert. Die Fermentation des Ultrafiltrationstrubes resultierte gegenüber des Fermentationsblanks in einer signifikanten Senkung des pH-Wertes, was auf bakterielle Tätigkeiten hinweist und die Bildung von SCFA bestätigt (Abb. 7, rechts).

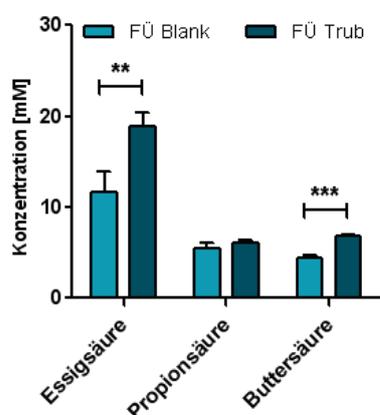


Abb. 6: **SCFA-Zusammensetzung der FÜs**

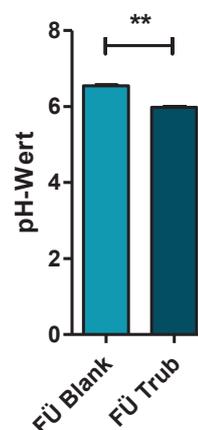


Abb. 7: **pH-Werte der FÜs**

MW+SD, t-Test, **p<0,01; ***p<0,001

Die Entstehung von Metaboliten aus Polyphenolen durch Fermentation der Trubfraktion konnte gegenüber der Blankkontrolle allerdings nicht nachgewiesen werden (TP 1.1).

Die Inkubation von LT97 Zellen mit FÜ Trub zeigte im Vergleich zum FÜ Blank keinen zusätzlichen Einfluss auf die Zellzahl (Ergebnisse generiert mittels DAPI-Assay, EC₅₀, Tab. 4)

Tab. 4: **Wachstumshemmende Effekte (EC₅₀) von FÜ Blank und FÜ Trub** (LT97 Zellen, n=3, MW)

EC ₅₀	Fü Blank	Fü Trub
24 h	-	-
48 h	8,9%	8,2%
72 h	11,1%	9,6%

Die Apoptoseinduktion durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe, als ein weiterer Mechanismus der Chemoprävention (Sekundärprävention) von Kolonkrebs, wurde mittels Durchflusszytometrie nach Zellfärbung mit Annexin V und 7-AAD bestimmt. Dabei zeigte der FÜ Trub im Vergleich zum FÜ Blank ebenfalls keinen zusätzlichen Effekt auf die Apoptoserate von LT97 Zellen (ohne Abbildung). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass fermentierter Trub in den verwendeten Konzentrationen keine chemopräventiven Eigenschaften *in vitro* aufweist. Allerdings muss auf den durch seine *in vitro* Toxizität stark begrenzten Konzentrationsbereich der FÜ (2,5 % - 10 %) in den Versuchen hingewiesen werden, was eine unphysiologisch niedrige Konzentration an effektiven Komponenten, wie den SCFA nach sich zieht.

Zusammenfassung

Insgesamt inhibierten, mit Ausnahme der Metabolite, alle Testsubstanzen das Wachstum der Adenom (LT97)- bzw. Adenokarzinomzellen (HT29) des Kolons. Sie könnten möglicherweise damit sekundärpräventiv Einfluss auf die Kolonkarzinogenese nehmen, indem sie die fortschreitende Entartung bzw. die Proliferation bereits stark entarteter Zellen hemmen. Für alle weiteren Untersuchungen wurden subtoxische Konzentrationen gewählt, um Fragen der Primärprävention, wie z. B. den Einfluss auf enzymmodulierende Eigenschaften, zu klären.

Meilenstein II: Kenntnisse zur modulierenden Wirkung von Apfelinhaltstoffen und Fermentationsprodukten auf die Expression von ausgewählten Genen der Chemoprotektion, Identifizierung möglicher Zielgene/Enzyme, deren Modulierung zur Erhöhung der Protektion führt

Durch die Untersuchung der Genexpression mittels Array-Technik sollten zunächst komplexe Muster der Genexpression unter Einwirkung von AE und damit Signaturgene bestimmt werden, die zu einer Chemoprotektion (d.h. Entgiftung von Risikofaktoren, Hemmung der Tumorprogression) beitragen könnten. Dafür wurden die Methoden (Superarray, Custom Array) etabliert und optimiert. Die weitere Charakterisierung der exprimierten Zielgene erfolgte durch die gezielte Erfassung der Expressionskinetiken mittels quantitativer Real-time PCR. Darüber hinaus wurde die modulierte Expression auf der Ebene einzelner Proteine untersucht bzw. über die biochemische Enzymaktivitätsbestimmung ermittelt. Des Weiteren sollte die Regulation der erfassten Zielgene durch weitere Testkomponenten wie Polyphenolmetabolite und die fermentierte Apfelsafttrubfraktion überprüft werden.

Apfelpolyphenolextrakte

Apfelpolyphenole modulieren die Expression ausgewählter Gene der Phase II der Biotransformation.

Zur Analyse von Veränderungen der Genexpression von 96 Genen des Fremdstoffwechsels (Phase I, Phase II und Phase III) durch AE02 in LT97-Zellen wurde zunächst der kommerziell erhältliche cDNA macroarray Superarray[®] (HS-011-N, SuperArray[®] Inc., Frederick, MD, USA) verwendet. Die Expressionshöhen von 30 (Kriterien: fold change >1,5 oder < 0,7) der untersuchten 96 Gene wurden durch AE02 reguliert, wobei keines der Gene herabreguliert wurde. Die meisten der hochregulierten Gene gehören zur Gruppe der Phase II-Gene (Glutathion S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen, Acetyltransferasen, Sulfotransferasen, Methyltransferasen), die für die Entgiftung bzw. Ausscheidung von Karzinogenen von großer Bedeutung sind.

Die Etablierung des Custom-Arrays hatte zum Ziel, die spezifischen Untersuchungen auf in Voruntersuchungen etablierte, stark regulierte oder als besonders bedeutsam eingestufte Gene zu fokussieren und ein relativ wirtschaftliches System für Biomarker-Analysen zu erschließen.

Nach Etablierung des Custom Arrays waren Analysen zu Expressionsänderungen von mehr als 300 Genen (einschließlich ausgewählter Gene der Superarray[®]-Analysen) der Karzinogenese und der Chemoprävention möglich. Die auf dem Array gespotteten Sonden lassen sich neun funktionellen Gengruppen zuordnen: 1) Phase I-Metabolismus, 2) Phase II-Metabolismus, 3)

Phase III-Metabolismus, 4) Phase II-Genregulationswege, 5) Stress- und Signaltransduktionswege, 6) Apoptosesignalwege, 7) Tumorsuppressorgene, 8) Zellzyklusarrest / Regulation des Zellzyklus, 9) Metallspeicherung und -verwertung.

Die Inkubation der LT97 Zellen erfolgte wiederum mit AE02 und unter den gleichen Bedingungen wie für den Superarray®. Das Expressionslevel von 46 Genen (Kriterien: fold change >1,5 oder < 0,7) konnte durch AE02 (24 h) verändert werden. Dazu gehörten insbesondere Gene deren Produkte für den Karzinogenmetabolismus (*GSTT2*, *GSTA4*, *CHST3*, *CHST7*, *UGT1A6*, *UGT2B7*, *UGT2B10*), die Tumorsuppression (*BRCA2*, *PTPRJ*, *PTPN6*, *PTPRN*, *PTPRT*), die Zellzykluskontrolle (*CDKN1A*, *NFKB2*, *NFKBIB*, *CGRRF1*) sowie die Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose (*CASP10*, *WNT3*) wichtig sind.

Von den 96 Genen auf dem Superarray® waren 87 Gene auch auf dem Custom Array vertreten. Von diesen 87 Genen wurden 30 im Superarray® hochreguliert. Für 4 dieser Gene (*CYP3A7*, *CYP4F3*, *GSTT2*, *CHST7*) konnte auch im Custom Array eine Hochregulierung durch die Behandlung mit AE02 in LT97 Zellen verzeichnet werden (Abb. 8). Die meisten im Superarray® induzierten Gene wurden mit dem Custom Array nicht detektiert. Auch waren viele der im Custom Array modulierten Gene auf den Superarray®-Membranen nicht gespottet, wodurch ein Vergleich der beiden Screening-Methoden nicht möglich ist. Die Auswertung der mRNA-Expressionslevel war im Superarray wesentlich sensitiver, allerdings sind die Ergebnisse des Custom Arrays im Gegensatz zum Superarray® besser reproduzierbar. Diese Diskrepanz weist auf die Notwendigkeit hin, die cDNA-Arrayergebnisse mit zusätzlichen spezifischeren Methoden (wie die Real-time PCR) zu validieren.

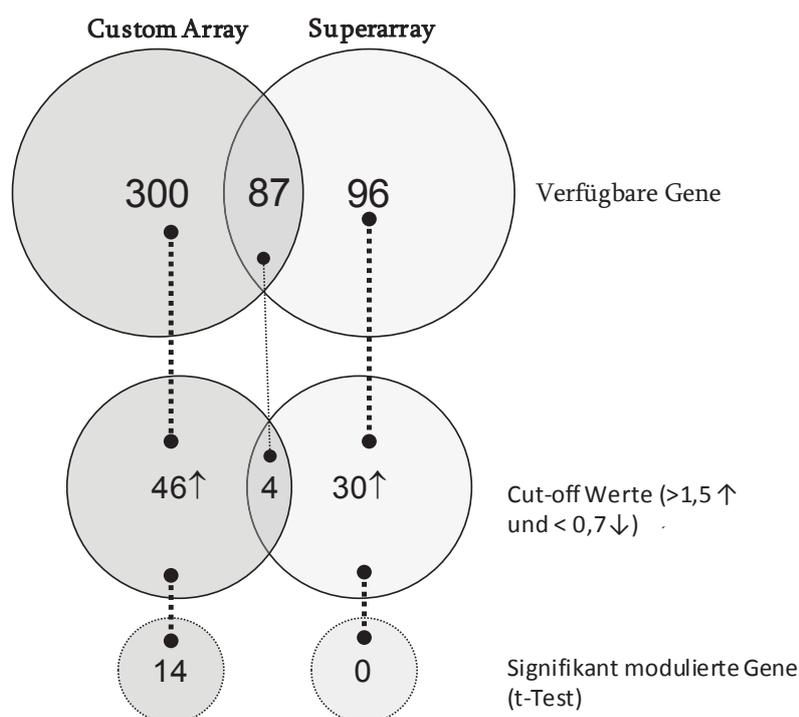


Abb. 8: **Vergleich Superarray und Custom Array; Einfluss von 128 µg/ml AE02 auf die Expression von Genen der Karzinogenese und Chemoprävention in LT97 Zellen (24 h); n=4.**

Beide Arrays weisen auf die Induzierbarkeit von Glutathion S-Transferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTT2*, *GSTA4*, *UGT1A1*, *UGT2B7*, *UGT2B10*, *UGT2B11*) durch Apfelpolyphenole hin. Die Produkte der genannten Gene sind bekanntermaßen in Prozesse der Detoxifizierung von Karzinogenen involviert.

Die Array-Ergebnisse konnten mittels Real-time PCR sowohl in LT97 (Abb. 9) als auch in HT29 Zellen (ohne Abbildung) verifiziert werden.

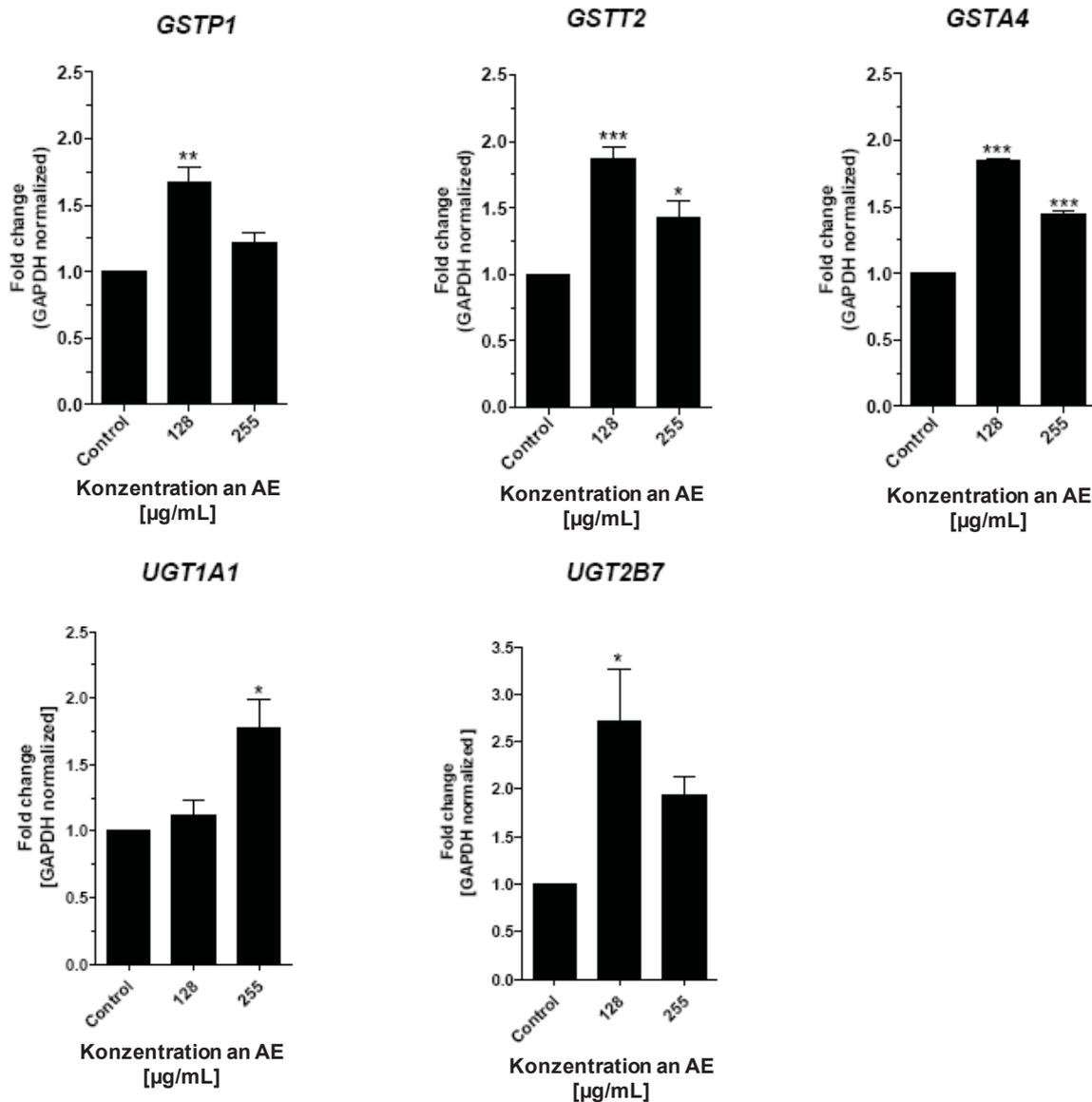


Abb. 9: **Verifizierung beider cDNA-Microarrays mit Real-time PCR; Einfluss von AE02 (128 µg/ml und 255 µg/ml) auf die Modulation der mRNA-Expression ausgewählter Phase II-Gene (24 h);** n=3; MW+SD, one-way ANOVA, Dunnett's Posttest, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Apfelpolyphenole induzieren die Aktivität von Phase II-Enzymen

Der AE02 steigerte auch die GST- und die UGT-Gesamtaktivität konzentrationsabhängig in LT97 Zellen (Abb. 10). Als Folge der gesteigerten Enzymaktivitäten kann ein erhöhter Zellschutz gegenüber Kanzerogenen erwartet werden.

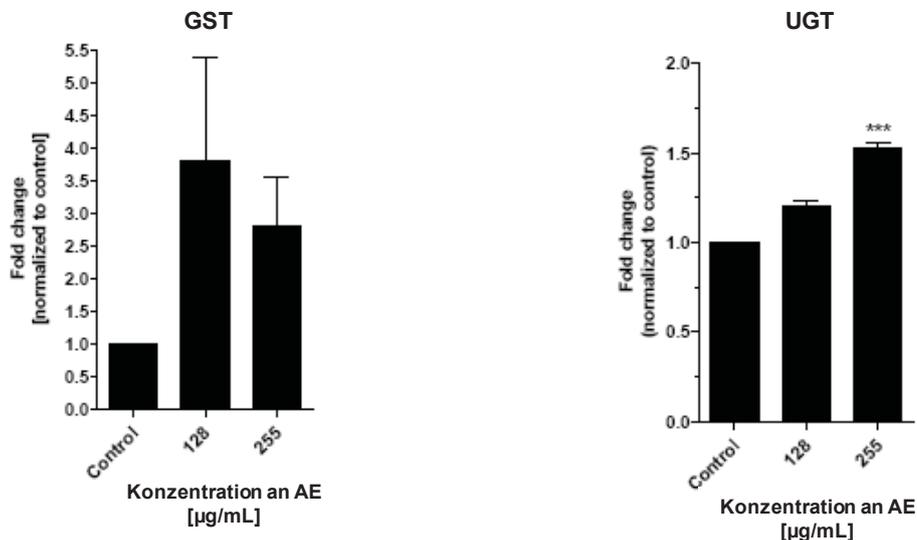


Abb. 10: **Einfluss von AE02 (128 µg/ml und 255 µg/ml) auf die Gesamtaktivität der GST- und UGT-Enzyme (24 h)**; n=3; MW+SD, one-way ANOVA, Dunnett's Posttest, ***p<0,001.

Die bei Raumtemperatur gelagerte Charge des Apfelpolyphenolextraktes hat keinen Einfluss auf die Expression von *GSTT2*.

Demgegenüber war die neue, bei Raumtemperatur gelagerte Charge des AE02 nicht in der Lage die *GSTT2*, das für alle Arbeiten mit apfelrelevanten Komponenten bevorzugte Phase II-Gen, in den Zellen zu induzieren (ohne Abbildung). Ursache hierfür können die abweichende Polyphenolzusammensetzung sowie die reduzierte Polyphenolmenge sein.

Synthetische Polyphenolmischung

Eine synthetische, den AE reflektierende Polyphenolmischung hat keinen Einfluss auf die Expression von *GSTT2*.

Um die veränderte Wirksamkeit näher zu untersuchen, sollte eine SPM bereits nachgewiesene chemopräventive Eigenschaften des AE02 verifizieren. Allerdings induzierte auch die SPM die Expression von *GSTT2* in LT97 Zellen nicht. Demnach kann der ursprüngliche Effekt mit dem Originalextrakt wahrscheinlich nicht auf die in der synthetischen Mischung vorhandenen Polyphenole zurückgeführt werden. Eher scheint es wahrscheinlich, dass oligomere und polymere Procyanidine eine wichtige Rolle spielen. Diese waren in der SPM nicht vertreten.

Außerdem gelten sie als besonders instabil gegenüber exogenen Einflüssen und fehlen daher wahrscheinlich auch in der neuen, gelagerten und ineffektiven Charge des AE02.

Polyphenole als Einzelsubstanzen

Chlorogensäure hat keinen Einfluss auf die Expression von *GSTT2*.

Der Nachweis von für die *GSTT2*-induzierende Wirkung des AE02 verantwortlichen Polyphenole im Apfelextrakt kann neben der Testung einer synthetischen Mischung (SPM) auch über die Prüfung von Einzelkomponenten erfolgen. Dafür wurde die Chlorogensäure gewählt, da sie mengenmäßig am stärksten im AE02 vertreten ist (38 % aller Polyphenole im Extrakt) und im Reporter-Aktivitätsassay eine tendenziell dosisabhängige Induktion des *GSTT2*-Promotors in stabil mit dem Promotor transfizierten HT29 Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe unten, ohne Abbildung). Die durchgeführte Konzentrationskinetik von 100 µM bis 500 µM Chlorogensäure hatte allerdings keinen Einfluss auf die *GSTT2* mRNA-Expression (ohne Abbildung). Damit lässt sich die Chlorogensäure als effektive Einzelkomponente diesbezüglich ausschließen.

Polyphenolmetabolite

Die Polyphenolmetabolite ES und PS induzieren die *GSTT2*- und inhibieren die *COX-2*-Expression in LT97 Zellen.

Die Inkubation der LT97 Zellen mit ES und PS führte wie schon die Behandlung mit AE zur Modulation der *GSTT2*-Expression. Dabei induzierten die Metabolite in physiologisch relevanten Konzentrationen (Auswahl anhand der Analysedaten nach Apfelsaftintervention der gesunden Probandengruppe; TP 1.8) signifikant die Expression dieses Genes im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 11). Im Gegensatz dazu reduzierten die Metabolite die *COX-2*-Expression auf Gen- (bis zu 2-fach gegenüber der Mediumkontrolle, Abb. 11) und Proteinebene (bis zu 3-fach gegenüber der Mediumkontrolle, Abb. 12). *COX-2* katalysiert die Oxidation von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ und ist ausschließlich während Entzündungsprozessen aktiv. Im Dickdarm sind erhöhte Expressionslevel an *COX-2* mit einem erhöhten Dickdarmkrebsrisiko assoziiert. Damit belegen die Untersuchungen erstmalig potentielle chemopräventive Effekte von Polyphenolmetaboliten in humanen Kolonzellen *in vitro*. So korreliert die Induktion der *GSTT2* gegebenenfalls mit einer gesteigerten zellulären Abwehr und die Herabregulierung der *COX-2* könnte mit reduzierten *COX*-abhängigen Entzündungsprozessen einhergehen. Beide Effekte können zur Verminderung des Dickdarmkrebsrisikos beitragen und bieten einen möglichen Erklärungsansatz für die von Barth *et al.* [3,4] gezeigten potentiell präventiven Wirkungen einer Apfelsaftaufnahme im DMH-Rattenmodell (TP 1.9).

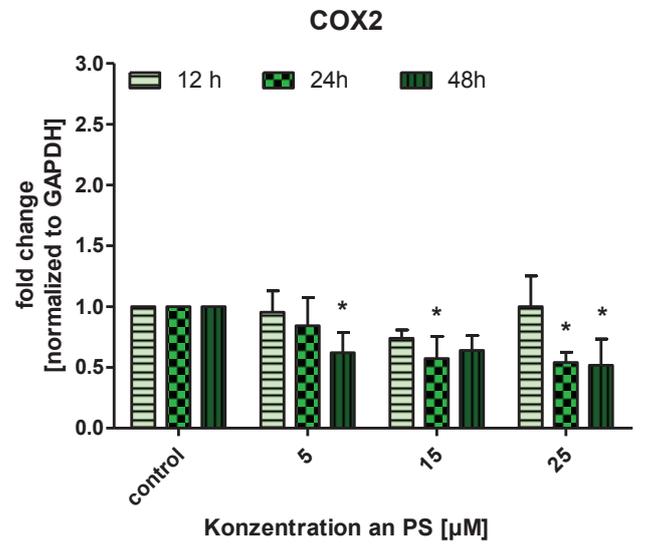
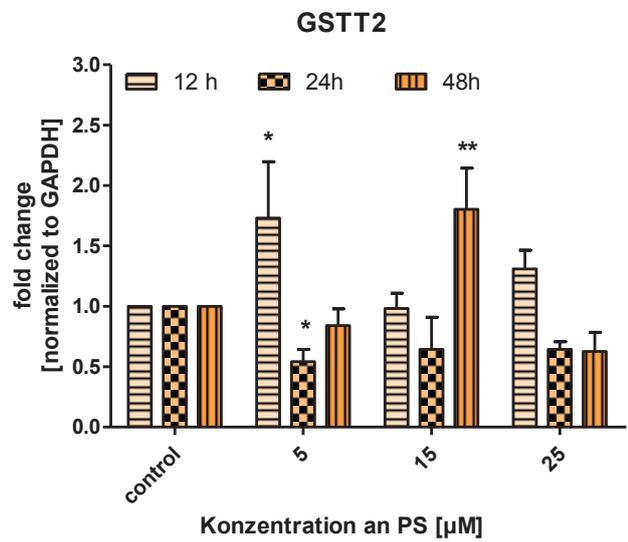
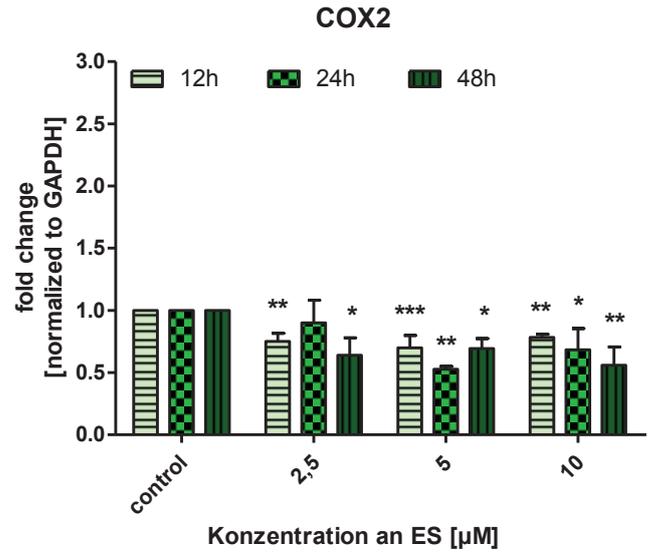
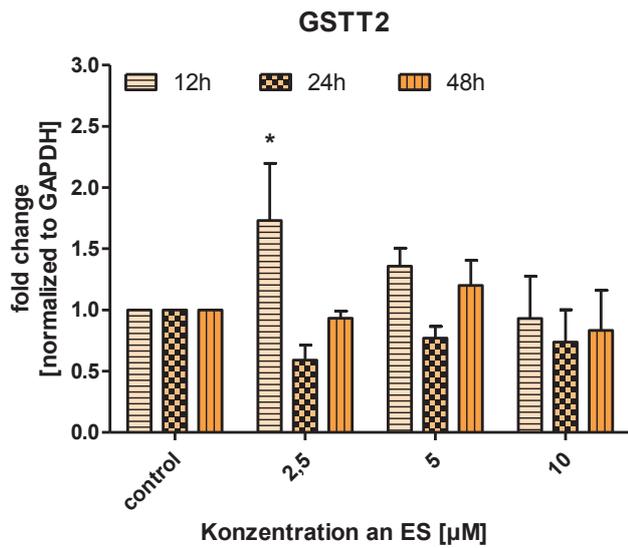


Abb. 11: **Einfluss von ES und PS (2,5 – 25 μM) auf die GSTT2- (linke Spalte) und COX-2- (rechte Spalte) mRNA-Expression in LT97 Zellen (12 h, 24 h und 48 h);** n=3; MW+SD, one-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

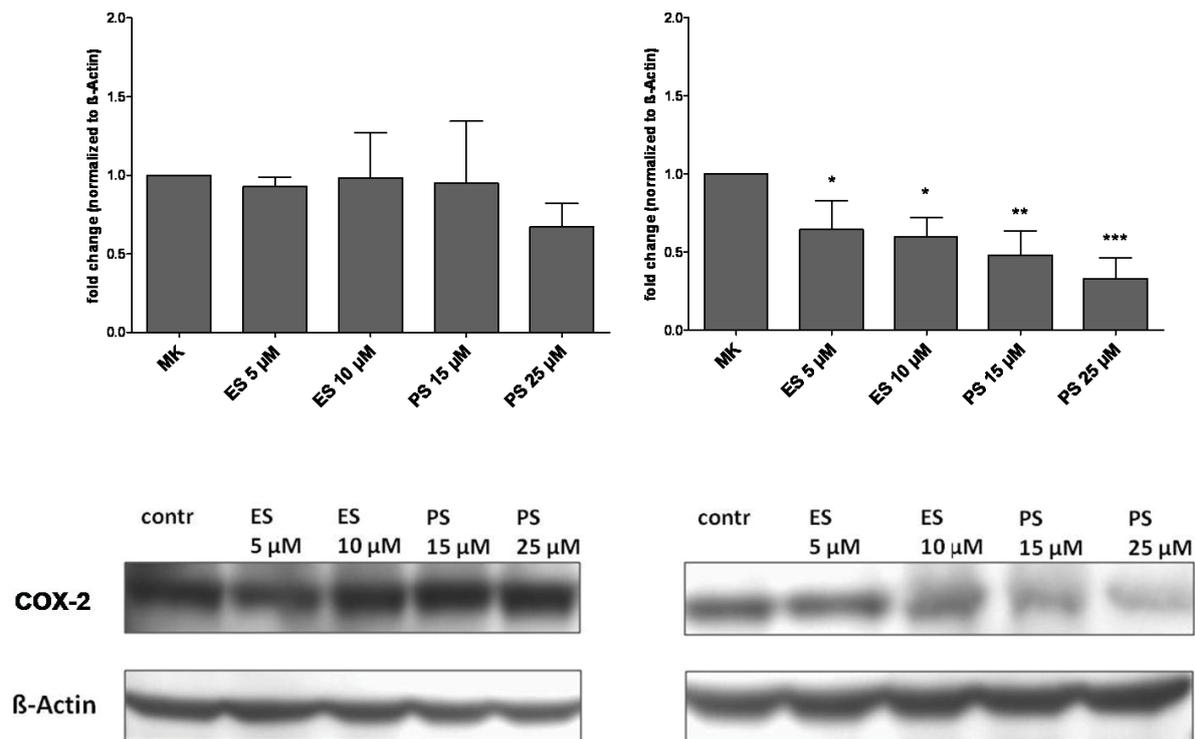


Abb. 12: **Einfluss von ES und PS (2,5 – 25 μM) auf die COX-2-Proteinexpression in LT97 Zellen (24 h linke Spalte, 48 h rechte Spalte)**; n=3; MW+SD, one-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Apfelsafttrub

Fermentierter Apfelsafttrub hat keinen Einfluss auf die Expression apfelrelevanter Gene.

Es konnte gezeigt werden, dass AE, aber auch ausgewählte Metabolite (ES und PS) in der Lage sind, den Phase I- und II-Metabolismus in LT97 Zellen zu modulieren. Daher wurden Überlegungen angestellt, ob auch fermentierte Bestandteile des Apfelsafttrubes (Pektin, Procyanidine) vergleichbare chemopräventive Effekte aufweisen. Deshalb wurde der Einfluss von FÜ Trub im Vergleich zur Kontrolle (FÜ Blank) auf die Expression apfel- bzw. apfelmetabolitregulierter Gene (*GSTT2*, *COX2*, *GPX2*, *UGT1A*, *GSTP1*) untersucht. Allerdings konnte für keines der genannten Gene eine signifikante Modulierung durch die Inhaltsstoffe im FÜ Trub verzeichnet werden. Für die Inkubationen wurden 10 – 20-fache FÜ-Verdünnungen verwendet. Damit liegen die tatsächlich eingesetzten Konzentrationen an aktiven Komponenten, wie beispielsweise Butyrat, mit < 1 mM weit unter den tatsächlich effektiven *in vivo* Konzentrationen. Der Einsatz höherer Konzentrationen an Fermentationsüberständen hätte allerdings eine zytotoxische Wirkung zur Folge, die die Interpretation der Genexpressionsergebnisse verfälschen würde.

***In vivo* regulierte Gene in Apfelsaft-behandelten Ratten**

In Zusammenarbeit mit TP1.4c und TP1.8 wurde versucht, im durch Array-Untersuchung ermittelten Genexpressionsmuster in der Mukosa Apfelsaft-behandelter Ratten (Details siehe Bericht von 1.4c) potentiell interessante protektive Gene zu identifizieren. In den Daten fiel die positive Regulation einer weiteren potentiellen Tumorsuppressor-Proteintyrosinphosphatase auf, PTPRK. Diese Regulation ließ sich jedoch in qRT-PCR-Untersuchungen nicht verifizieren (ohne Abbildungen).

Zusammenfassung

Unter Verwendung verschiedener Array-Plattformen ließen sich apfelpolyphenolmodulierte Vertreter der Supergenfamilien Glutathion S-Transferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen nachweisen und mittels Real-time PCR und Enzymaktivitätsassays verifizieren. Hauptaugenmerk der weiteren Untersuchungen wurde auf die Induktion der *GSTT2* gelegt, welche die zelluläre Abwehr von toxikologisch relevanten Peroxiden des Lipid- und Arachidonsäuremetabolismus steuert. Die Expression dieses Phase II-Gens konnte sowohl durch AE, als auch durch die Polyphenolmetabolite ES und PS *in vitro* induziert werden. Demgegenüber verminderten ES und PS die Expression von COX-2, einem Initiator zur Bildung von Entzündungsmediatoren. Eine Herabregulierung des Expressionslevels in den Zellen könnte mit reduzierten COX-abhängigen Entzündungsprozessen einhergehen und damit ebenfalls das Dickdarmkrebsrisiko vermindern.

Meilenstein III: Charakterisierung protektiver Wirkungen durch apfelrelevante Substanzen gegenüber genotoxischen Risikosubstanzen, basierend auf den Kenntnissen der modulierten Genexpression

Als mögliche funktionelle Konsequenz einer Induktion von Entgiftungsenzymen sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der Genotoxizität von Kolonkrebsrisikofaktoren, wie z.B. Hydroperoxide, durch eine Vorbehandlung mit apfelrelevanten Verbindungen bzw. deren Fermentationsprodukte beeinflussbar ist. Da diese Risikofaktoren durch die induzierbaren Enzyme entgiftet oder abgefangen werden, sollte bei Vorliegen einer effektiven Chemoprotektion die Genotoxizität reduziert werden. Als Marker der Chemoresistenz wurden dabei Genschäden (DNA-Strangbrüche) mit Einzelzellgelelektrophorese ermittelt.

Apfelpolyphenolextrakte

Apfelpolyphenole reduzieren Cumenhydroperoxid-induzierte DNA-Schäden in LT97 und HT29 Zellen.

Zur Charakterisierung funktioneller Konsequenzen einer Genexpressionssteigerung bezüglich *GSTT2* wurden LT97 Zellen nach Inkubation mit Apfelpolyphenolextrakt (hier Bsp. AE02) mit dem *GSTT2*-spezifischen, genotoxischen Substrat Cumenhydroperoxid (CumOOH) geschädigt. Die Zellbehandlung mit AE verminderte die Höhe der CumOOH-induzierten DNA-Schäden teilweise signifikant um 16 % bis 26 % (Abb. 13). Dieser Effekt bestätigte sich auch in HT29 Zellen (ohne Abbildung). Er spiegelt die erhöhte Genexpression der *GSTT2* wider und beweist die funktionelle Steigerung der GST-Aktivität durch die Apfelpolyphenole (siehe Meilenstein II).

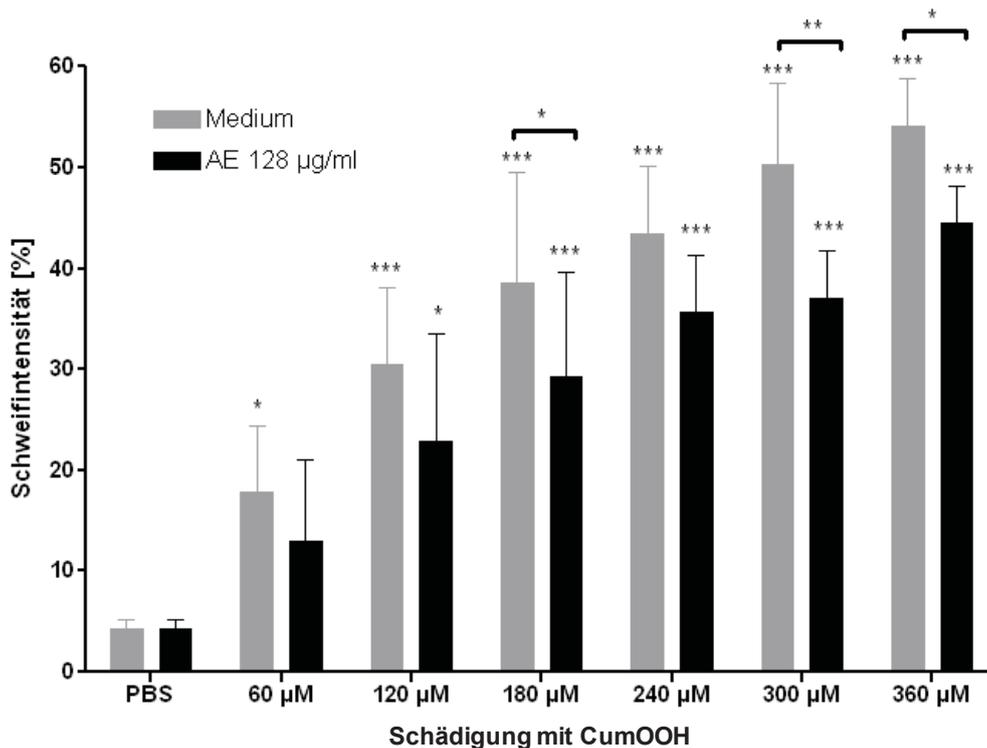


Abb. 13: **Einfluss von AE02 auf die Genotoxizität von CumOOH in LT97 Zellen (24 h)**; n=3; MW+SD, one-way ANOVA bzw. two-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Die bei Raumtemperatur gelagerte Charge des Apfelpolyphenolextraktes hat keinen Einfluss auf die Expression von GSTT2.

Die bei Raumtemperatur gelagerte, neue Charge des AE02 wies kein antigenotoxisches Potential gegenüber der genotoxischen Modells substanz auf (ohne Abbildung), was auf die bereits fehlende Modulierung der Expression auf Genebene zurückzuführen sein kann.

Synthetische Polyphenolmischung

Die SPM ist nicht in der Lage CumOOH-induzierte DNA-Schäden in LT97 Zellen zu modulieren.

Die dem AE02 nachempfundene SPM beeinflusste das genotoxische Potential von CumOOH in den Testzellen nicht (ohne Abbildung). Demnach fehlen, wie möglicherweise in der neuen Charge des AE02 auch, relevante Komponenten in effektiven Konzentrationen, um die GSTT2 zu induzieren.

Polyphenolmetabolite

Die Metabolite ES und PS reduzieren CumOOH-induzierte DNA-Schäden in LT97 Zellen.

Ausgehend von den Genexpressionsergebnissen wurden LT97 Zellen auch mit ES bzw. PS inkubiert und folgend mit CumOOH geschädigt, um das antigenotoxische Potential beider Testsubstanzen nach Auswertung der Comet Assay-Analysen zu bewerten. Abb. 14 zeigt, dass beide Metabolite die Genotoxizität des CumOOH um 8 % bis 27 % im Vergleich zur Kontrolle (PBS) teilweise signifikant reduzierten.

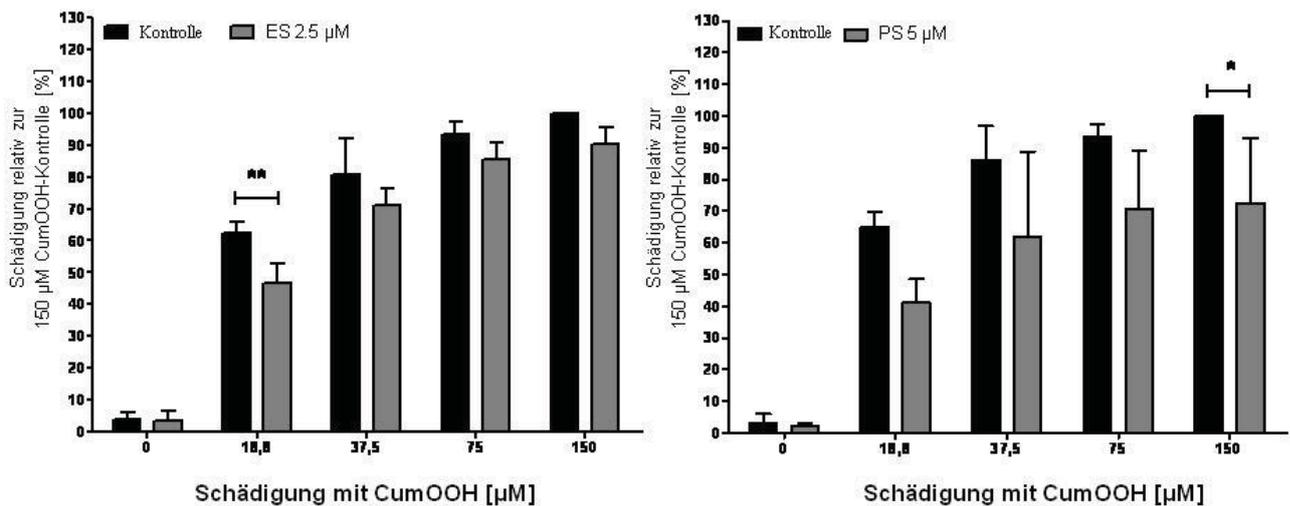


Abb. 14: **Einfluss von ES (2,5 μM) und PS (5 μM) auf die Genotoxizität von CumOOH in LT97 Zellen (12 h);** n=5; MW \pm SD, two-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, *p<0,05;**p<0,01.

Die Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen *GSTT2* Induktion auf Genebene und gleichzeitiger Gesamtaktivitätssteigerung des Enzyms hin.

Zusammenfassung

Sowohl nicht-metabolisierte Apfelpolyphenole als auch die Polyphenolmetabolite ES und PS sind in der Lage, die Genotoxizität und damit das Risikopotential von Prokanzerogenen zu reduzieren. Dabei spielt vor allem die Induktion des Zielenzym *GSTT2* eine entscheidende Rolle. Insgesamt sind die Effekte generiert mit Apfelextrakt (AE02) und den repräsentativen Metaboliten der im Extrakt enthaltenen Polyphenole vergleichbar. Dabei ist wichtig zu vermerken, dass die Metabolite im Gegensatz zu den reinen, unveränderten Polyphenolen im Extrakt im Dickdarm vorkommen und damit die physiologischen Verhältnisse wesentlich besser reflektieren. Die Effektivität der Metabolite kann die Ursache für mögliche chemopräventive Wirkungen von Polyphenolen *in vivo* sein.

Meilenstein IV: Kenntnis über die Mechanismen durch welche relevante Zielgene durch Apfelverbindungen moduliert werden: a) Charakterisierung der Effekte auf die DEP-1 Expression, b) Analyse der *GSTT2*- und *Nrf2*-Promotorregulation, c) Eingrenzung der relevanten Verbindungen durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung

DEP-1 mRNA wird *in vitro* durch Apfelinhaltsstoffe induziert, eine Regulation *in vivo* war jedoch nicht nachweisbar.

In den Untersuchungen in der ersten Förderphase war gezeigt worden, dass DEP-1 Protein in LT97 Adenomzellen durch Apfelextrakte induziert wird, Ebenso konnte beobachtet werden, dass ein Reporter, der einen Teil des *DEP-1/PTPRJ* Promotors enthält, durch Apfelextrakte aktiviert wird. Daher war eine nahe liegende Frage, ob die Expression endogener DEP-1 mRNA ebenfalls durch Apfelextrakte stimulierbar ist. In der Tat konnte in LT97-Zellen gezeigt werden, dass DEP-1 mRNA durch Apfelinhaltsstoffe induziert wird (Abb.15). Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen unter Verwendung des Custom-Arrays (s.o.). Um zu prüfen, ob diese Regulation auch *in vivo* stattfindet, wurden Proben der Apfelsaft-Intervention in dem Rattenmodell der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese [4] bezüglich einer Regulation von DEP-1 mRNA analysiert. Während Proben der ersten Interventionsserie einen Trend der Induktion zeigten, konnten diese Unterschiede in der Analyse der Proben eines zweiten Interventionsversuches nicht verifiziert werden (Abb. 16).

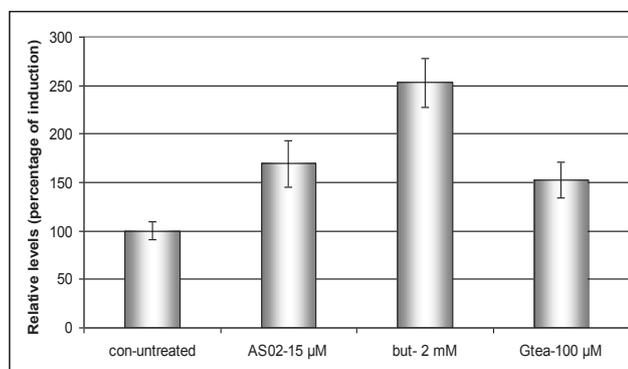


Abb. 15: **Induktion von DEP-1 mRNA in LT97 Adenomzellen durch Apfelextrakt, Butyrat und Grünteeextrakt.** HT97 Zellen wurden für 72 Stunden mit den jeweiligen Substanzen inkubiert, die RNA isoliert und die Expression von DEP-1 durch real-time RT-PCR analysiert (AS02=AE02, but=Butyrat, Gtea= Extrakt von Grünem Tee).

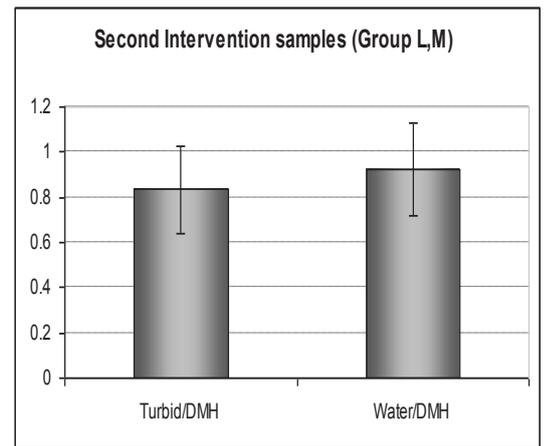
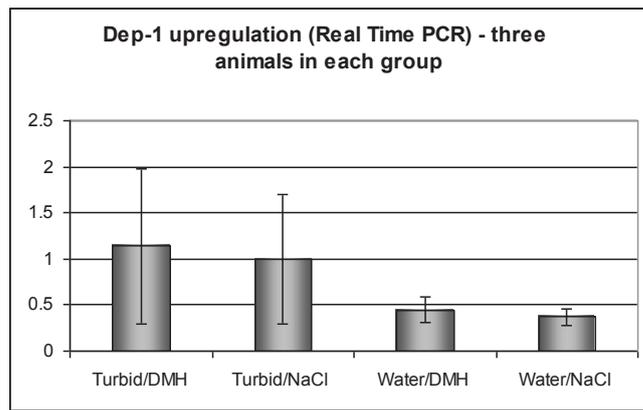


Abb. 16: **Effekt von trübem Apfelsaft auf die Expression von DEP-1 mRNA Darmepithel von Ratten.** RNA aus der Mukosa des Darmes von Apfelsaft trinkenden Ratten (Turbid) oder Wasser-trinkenden Ratten wurde von Dr. S. Barth, TP1.8 bereitgestellt. Die Expression von DEP-1 mRNA wurde durch real-time RT-PCR analysiert.

Wir gehen davon aus, dass die schwankenden Ergebnisse im Nachweis der Expressionsänderung *in vivo* technische Gründe haben. Möglicherweise ist der Anteil der Zellen mit DEP-1 Expressionsregulation in dem für die RNA-Isolation verwendeten Mukosamaterial zu klein. Aus diesen Gründen kann auch keinesfalls ausgeschlossen werden, dass DEP-1 auch *in vivo* reguliert wird, zumal außer den Apfelpolyphenolen auch Butyrat ein sehr potenter Induktor des Gens war.

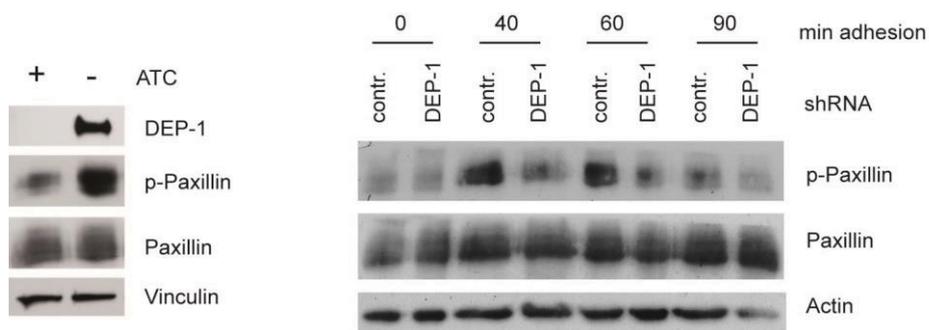


Abb. 17: **DEP-1 ist ein positiver Regulator der Paxillin-Phosphorylierung in Kolonepithelzellen.** SW480 Zellen wurden stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das die induzierbare Expression von DEP-1 in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin (ATC, tet-minus System) gestattet. Lysate von Zellen ohne und mit DEP-1 Induktion wurden auf hinsichtlich der Phosphorylierung von Paxillin mit einem p-Paxillin-spezifischen Antikörper untersucht (linkes Panel). HCT116 Zellen wurden stabil mit einem shRNA Konstrukt, welches einen DEP-1 knockdown bewirkt, oder einem entsprechenden Kontrollkonstrukt (contr.) transfiziert. Die Paxillin-Phosphorylierung wurde durch Aussäen von nach Trypsinierung suspendierten, in Serum-freiem Medium gehungerten Zellen auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen induziert. Lysate der Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und auf die Phosphorylierung von Paxillin untersucht.

Ein Teil der weiteren Arbeiten konzentrierte sich auf die funktionelle Rolle von DEP-1 in Kolonepithelzellen, um die potentiellen Effekte einer Induktion der Expression besser zu verstehen. Nachdem eine induzierte Expression des Proteins in DEP-1 negativen SW480-Zellen, eine Anzahl von möglichen Targets dieser Protein-Tyrosinphosphatase identifiziert hatte ([5], nicht gezeigt), wurde in so genannten „substrate-trapping“ Ansätzen und in mittels shRNA DEP-1 depletierten Kolonepithelzellen versucht, diese Targets zu verifizieren. Dabei zeigte sich eine Rolle von DEP-1 für die Signaltransduktion in fokalen Adhäsionskomplexen (FA). DEP-1

wirkt fördernd auf die Phosphorylierung des FA Proteins Paxillin (Abb. 17) und ist erforderlich für eine effektive Adhäsion von Zellen an verschiedene Matrices (Daten nicht gezeigt).

Apfelpolyphenole induzieren den *GSTT2* Promotor.

Auf Grundlage der beobachteten deutlichen Regulationen von *GSTT2* durch Apfelextrakt-Behandlung sollte geprüft werden, ob eine direkte Aktivierung des *GSTT2*-Promotors nachgewiesen werden kann. Auf dieser Grundlage sollten dann Untersuchungen zum Mechanismus der Expressionsregulation und zu den dafür verantwortlichen Apfelinhaltsstoffen durchgeführt werden. Ein von Dr. Paul R. Buckland zur Verfügung gestelltes Reporter-Konstrukt, das den Promoter des *GSTT2* Gens enthält (589 bp im Vektor pGL3; [6]), wurde für Induktionsuntersuchungen eingesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle getesteten Apfelextrakte (AS02, 03, 04, 05) den Promoter aktivierten. Dies ist beispielhaft für AE02 und AE05 in Abb. 18 gezeigt. Die Induktion des *GSTT2*-Promotors war von der Bildung von H₂O₂ unter den Testbedingungen (s.o.) unabhängig, da identische Induktionen in An- und Abwesenheit von Katalase erhalten wurden (ohne Abbildung).

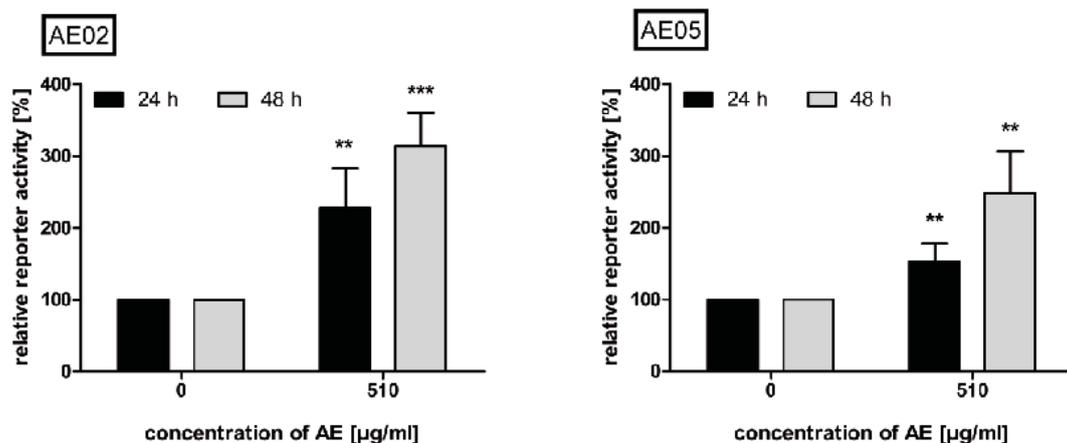


Abb.18: **Einfluss von den Apfelextrakten AE02 und AE05 auf die Aktivität des *GSTT2*-Promotors.** HT29 Zellen wurden mit einem Reporter-Konstrukt transfiziert, welches die Expression von firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines 5'- 589 bp Fragmentes des *GSTT2*-Promotors gestattet. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit AE behandelt, und dann die Luciferase-Aktivität, normalisiert auf die Transfektionseffizienz, bestimmt.

Es wurde im Weiteren untersucht, ob bekannte Hauptkomponenten der Apfelpolyphenole für diese Induktion verantwortlich sind (Tab. 5). Von den untersuchten Verbindungen hatte nur Chlorogensäure einen, allerdings relativ schwachen Stimulationseffekt (ohne Abbildung).

Tab. 5: **Effekt von Komponenten des Apfelpolyphenol-Extrakts auf die GSTT2 Promotor-Aktivität.**

Getestete Komponenten	Konzentration (μM)	Anzahl der Experimente	Induktion von GST T2
Phloridzin	0; 10; 30; 50	2	Nein
Epicatechin	0; 10; 30; 50	3	Nein
Kaffeensäure	0; 5; 10; 20	3	Nein
Quercetin-3-Rutenosid	0; 2; 5; 10	3	Nein
Quercetin-3-Galaktosid	0; 2; 5; 10	3	Nein
Quercetin-3-Rhamnosid	0; 2; 5; 10	3	Nein
Quercetin-3-Glycosid	0; 2; 5; 10	3	Nein
Phloretin (Aglycon)	0; 10; 30; 50	3	Nein
Quercetin (Aglycon)	0; 2; 5; 10	3	Nein
Chlorogensäure	0; 100; 250; 500	6	Ja (dosis-abhängig)
Butyrat*)	0; 1000; 2000; 4000	3	Ja (dosis-abhängig)

Die Testungen erfolgten für 48 h. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass jeweils die mittlere Konzentration etwa derjenigen entsprach, die in einem 30 μM (bezogen auf Phloridzin-Äquivalente) Apfelextrakt vorlag. *) Butyrat wurde in einer HT29 Zelllinie getestet, die stabil mit dem GST-T2-A Reporter transfiziert worden war, da Butyrat auch einen starken Effekt auf die Aktivität des in transienten Transfektionen verwendeten Referenz-Reporters pRL-TK hat. Die Konzentrationen von Butyrat orientierten sich nicht am Apfelextrakt sondern an im Kolon häufig erreichten Spiegeln.

Jedoch konnte keine Induktion der endogenen *GSTT2* mRNA durch Chlorogensäure nachgewiesen werden (s.o.), so dass dieser Effekt nicht weiter verfolgt wurde. Das Fermentationsprodukt Butyrat zeigt eine robuste Induktion des *GSTT2* Promotors (Abb. 19).

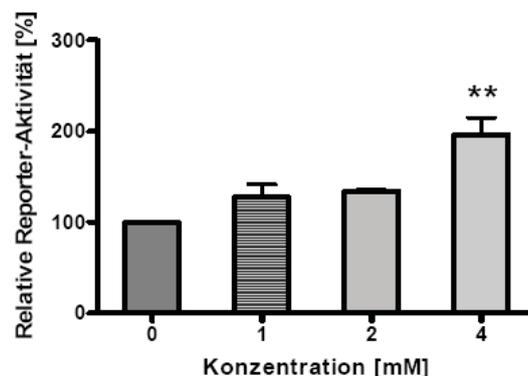


Abb. 19: **Induktion des GSTT2- Promotors durch Butyrat.**

Für die Tests wurden stabil mit *GSTT2*-Reporter transfizierte HT29 Zellen eingesetzt. Behandlungsdauer 48 h (MW+SD; n=3 unabhängige Experimente** p<0,01).

Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der häufig an der Transkriptionsregulation durch protektive Substanzen beteiligt ist. Nrf2 bindet an so genannte ARE („antioxidant response elements“) Motive in den Promotoren von Target-Genen. Es ist denkbar, dass sich im Promotor von *GSTT2* ARE Elemente befinden, die durch Sequenzvergleich nicht unbedingt ohne weiteres erkennbar sind. Ebenso könnte die Induktion anderer Gene (s.o.) über ARE-abhängige Mechanismen vermittelt werden. Daher sollte geprüft werden, ob Apfelpolyphenole einen Nrf2-induzierbaren Reporter aktivieren können. Wir benutzten das Konstrukt pNQO1-ARE, ein Luciferase-Reporter für Nrf2 Aktivität (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Kobayashi, Nagoya). In

der Tat hatten die Apfelextrakte AE06 und AE07 einen deutlich stimulierenden Effekt auf diesen Reporter (Abb. 20). Dabei war ein Teil dieser Induktion offenbar über H_2O_2 vermittelt, da das Ausmaß der Stimulation durch Zugabe von Katalase vermindert wurde. Eine signifikante Stimulation wurde jedoch auch in Anwesenheit von Katalase beobachtet, so dass in dieser Situation andere Komponenten der Apfelextrakte diese Wirkung ausüben müssen.

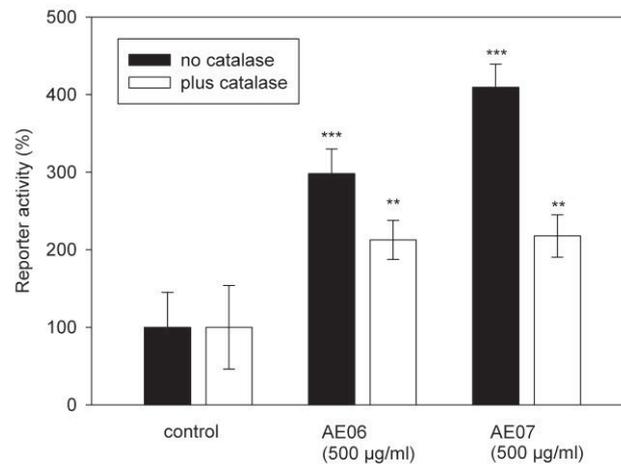


Abb. 20: **Aktivität des Nrf2-Reporters pNQO1-ARE unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen des Apfelpolyphenol-Extraktes AE02.**

Die Testung erfolgte in HT29-Zellen, analog zu den vorher beschriebenen Experimenten mit GSTT2-Reportern ($MW \pm SD$; $n=4$). Gezeigt ist ein Vergleich der Induktion in An- oder Abwesenheit von Katalase (100U/ml).

Im Folgenden wurde der Versuch unternommen, die Reporter-Assays für den GSTT2-Promotor und für die Nrf2-Induktion zu benutzen, um in den Fraktionen aus Apfelextrakten (TP1.1, bereitgestellt von Herrn Wolfgang Hümmer) aktive Komponenten zu identifizieren.

Bei den Untersuchungen mittels des GSTT2-Reporters zeigte sich eine geringe Aktivität in Fraktionen, die reich an Procyanidinen, darunter hochmolekulare Spezies sind (Beispiel in Abb. 21).

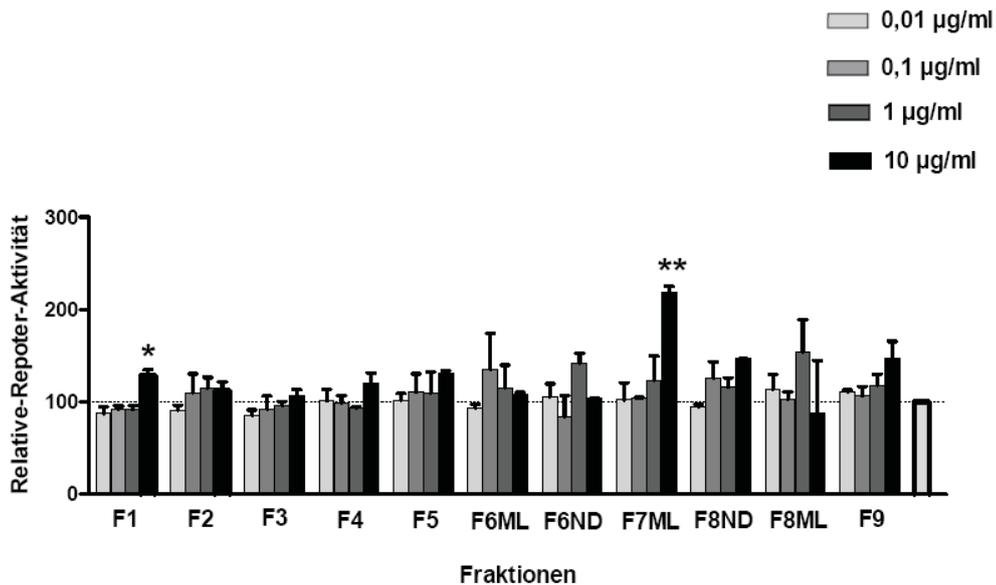


Abb. 21: **Induktion des GSTT2 Promotors durch Fraktionen des Apfelpolyphenol-Extraktes AE02.** Die Testbedingungen waren wie in der Legende zu Abb. 18 beschrieben. (MW+SD; n=3 unabhängige Experimente; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Dieses Ergebnis wurde mit unabhängig gewonnenen Fraktionen aus AE06 reproduziert. Daher wurden im Folgenden gezielt Procyanidine bzw. Procyanidin-reiche Präparationen auf ihre Stimulationswirkung gegenüber dem GSTT2 Promotor analysiert. Niedermolekulare Procyanidine (B1, B2) und Procyanidinfractionen aus Apfelextrakt (NP.4 (DPM=4,7) und NP.5 (DPM=7,9); Wolfgang Hümmer, TP1.1) waren jedoch inaktiv in diesen Tests. Ein weitere hochgradig Procyanidin-haltige Fraktion (DPM=53,7 \pm 0,1) stammte aus Tamarinde (ebenfalls von Wolfgang Hümmer, TP1.1). Der Tamarinden-Extrakt zeigte zunächst eine viel versprechende Wirkung hinsichtlich einer dosisabhängigen starken GSTT2-Reporter Induktion (ohne Abbildung). Allerdings waren in den behandelten Zellkulturen Präzipitationen und Zellschädigungen sichtbar. Eine sorgfältige Filtration des Extraktes führte zur Entfernung der Präzipitate, aber auch zum Wirkungsverlust. In weiteren Untersuchungen wurde die Wirkung des Tamarinden-Extraktes auf die Expression endogener GSTT2 mRNA in behandelten HT29-Zellen mittels qRT-PCR untersucht. In diesen Versuchen ließ sich keine GSTT2-Induktion nachweisen (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Wirkung von Tamarinden-Extrakt auf den GSTT2-Reporter keinen physiologisch relevanten Effekt widerspiegelt.

Fraktionen aus den Apfelextrakten wurden auch hinsichtlich der Induktion des Nrf2-Reporters untersucht. Hier wurden klare Induktionen, die über Nrf2 vermittelt waren, in früh eluierenden Fraktionen beobachtet (Abb. 22).

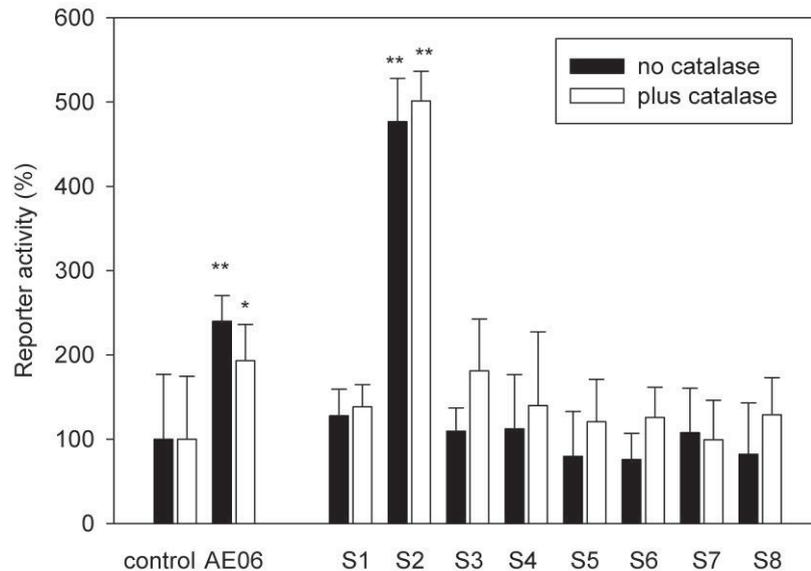


Abb. 22: **Induktion des Nrf2-Reporters durch Fraktionen des Apfelpolyphenol-Extraktes AE06.** Die Testbedingungen waren wie in der Legende zu Abb. 20 beschrieben. (MW+SD; n=8; * p< 0,05; ** p< 0,01).

Durch die chemischen Analysen in TP1.1 war bereits festgestellt worden, dass in Fraktion S2 ein aus Apfel isolierbarer Aromastoff, die Verbindung 3-OH- β -Damascon enthalten ist. Diese Verbindung war bereits in TP1.7 (C. Gerhäuser) als Induktor von Ubichinon-Reduktase charakterisiert worden. Nachfolgend wurde 3-OH- β -Damascon deshalb als Reinsubstanz (wiederum erhalten von Wolfgang Hümmer, TP1.1) bezüglich der Induktion des Reporters für die Nrf2-aktivität untersucht (Abb. 23). Es konnte klar eine dosisabhängige Induktion nachgewiesen werden.

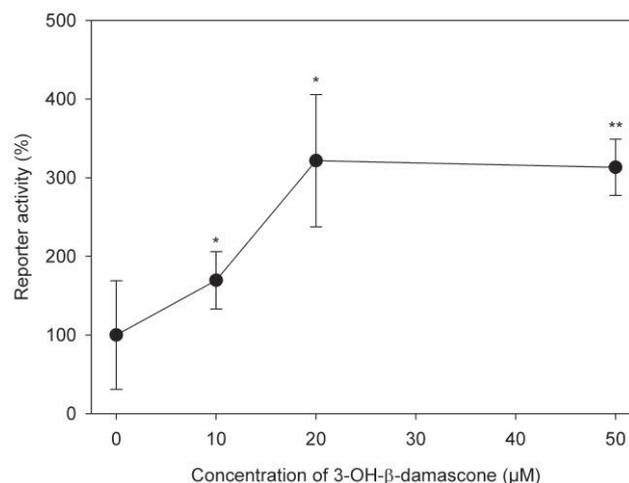


Abb. 23: **Induktion des Nrf2-Reporters durch 3-OH- β -Damascon.** HT29 Zellen wurden mit den Nrf2-Reporterkonstrukt transient transfiziert und anschließend für 48h mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz behandelt. Die Reporter-Aktivität wurde durch Luciferase-Assays bestimmt (n=8, MW \pm SD, *p<0,05; **p<0,01).

Weder die Nrf2-induzierenden Fraktionen, noch 3-OH- β -Damascon konnten den *GSTT2*-Promotor induzieren. Dieser Befund spricht dafür, dass der *GSTT2*-Promotor kein funktionelles ARE-Element enthält.

Zusammenfassung

Die Induktion des Tumorsuppressor-Proteins DEP-1 in Kolonepithelzellen durch Behandlung mit Apfelextrakt konnte *in vitro* auf mRNA-Ebene validiert werden. Ein vermutlicher Wirkungsmechanismus von DEP-1 konnte mit der Regulation der Signaltransduktion in Fokalen Adhäsionskomplexen identifiziert werden. Ob DEP-1-Induktion *in vivo* nach Aufnahme von Apfelsaft erfolgt, konnte bisher nicht zweifelsfrei ermittelt werden.

Reporter-Assays für die Induktion des Gens für das Phase-II Enzym *GSTT2* wurden etabliert und zeigten, dass Apfelextrakte verschiedener Chargen diesen Reporter induzieren können. Dieser Effekt ist unabhängig von H₂O₂ und erfolgt wahrscheinlich nicht über einen Nrf2-abhängigen Mechanismus. Reporter-Assays für die Nrf2-abhängige Transkription zeigten starke Aktivität des Apfelextrakts sowie einer Aromastoffe enthaltenden Fraktion aus diesen Extrakten. Mit der Verbindung 3-OH- β -Damascon konnte gezeigt werden, dass eine Reinsubstanz, die in Apfelextrakten enthalten ist, Nrf2-abhängige Signalwege potent induzieren kann. Dieser Mechanismus könnte eine Basis für protektive Effekte von Apfelsaft darstellen.

**Meilenstein V: Ist die Modulation von GSTT2 kausal mit der Chemoprotektion verknüpft?
Untersuchungen an Zelllinien mit manipulierter GSTT2-Expression**

Da Apfelextrakte einerseits die *GSTT2*-Expression in Kolonepithelzellen induzierten, andererseits in LT97 Zellen ein protektiver Effekt gegenüber den genotoxischen Wirkungen von Cumenhydroperoxid (CumOOH) nachweisbar war (s.o.), wurde geprüft, ob zwischen beiden Effekten ein kausaler Zusammenhang besteht. Für diese Untersuchungen wurden HT29 Zellen ausgewählt, da diese (im Unterschied zu LT97 Zellen) relativ leicht gentechnisch modifizierbar sind. Es wurde zunächst geprüft, ob Apfelextrakte auch in diesen Zellen eine Protektion gegenüber CumOOH bewirken können. Nach Inkubation mit AE05 zeigte sich in der Tat eine signifikante Reduktion der Genotoxizität von 150 μM CumOOH um 30 bis 50 % (Abb. 24).

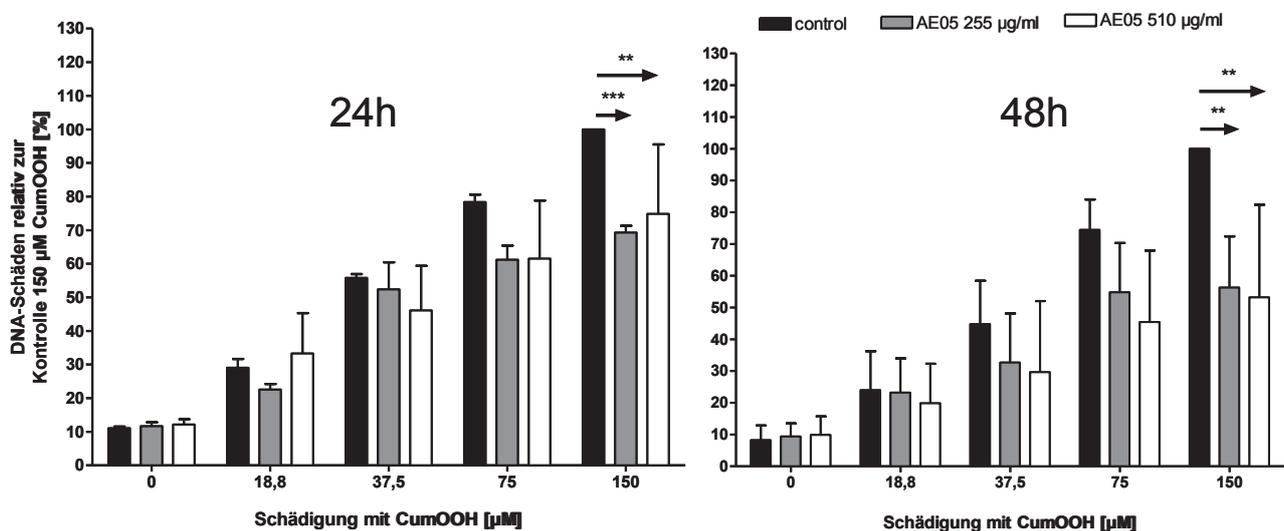


Abb. 24: **Einfluss von AE05 (255 und 510 $\mu\text{g/ml}$) auf die Genotoxizität von CumOOH in HT29 Zellen (24 h; 48 h);** n=3; MW+SD, two-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wenn GSTT2 diesen Effekt vermittelt, sollten Zellen mit erhöhter *GSTT2*-Expression eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber CumOOH aufweisen, Zellen mit reduzierter *GSTT2*-Expression eine erhöhte Empfindlichkeit.

Für die Überexpression von GSTT2 wurde ein geeignetes Expressionskonstrukt konstruiert (cDNA zur Verfügung gestellt von Dr. P.G. Board, Canberra, Australien), und dessen Funktionalität in HEK293-Zellen geprüft (ohne Abbildung). Mit diesem Konstrukt wurden dann stabile Zellklone generiert und die Überexpression von GSTT2 mRNA nachgewiesen (Abb. 25). Zur Depletion der Zellen von GSTT2 wurde ein shRNA-Ansatz verfolgt. HT29-Zellen wurden mit retroviralen Partikeln, die verschiedene *GSTT2*-gerichtete shRNA Spezies kodierten, transduziert und die Effektivität des GSTT2-Knockdowns wurde durch qRT-PCR geprüft. Es

gelang Zellen herzustellen, die nur noch etwa 30% der in Kontrollzellen exprimierten *GSTT2*-mRNA aufwiesen (Abb. 25).

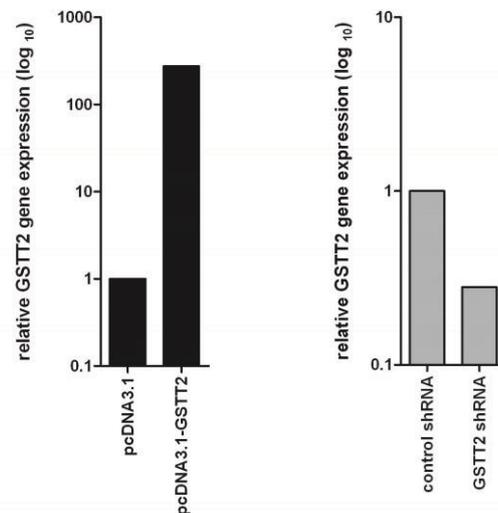


Abb. 25: **GSTT2 Überexpression und Depletion in HT29 Zellen.**

HT29 Zellen wurden stabil mit einem eukaryotischen Expressionskonstrukt für GSTT2 transfiziert, und Klone mit effizienter Überexpression wurden durch Standardtechniken isoliert. Die Expression von *GSTT2*-mRNA im Vergleich mit Vektor-transfizierten Kontrollzellen in einem solchen Zellklon ist gezeigt (linkes Panel). Die Depletion von *GSTT2* gelang durch Transduktion mit shRNA-kodierenden retroviralen Partikeln. Der Knockdown ist durch Analyse der *GSTT2*-mRNA Expression im Vergleich mit Kontroll-transduzierten Zellen (non-targeting shRNA) gezeigt (rechtes Panel).

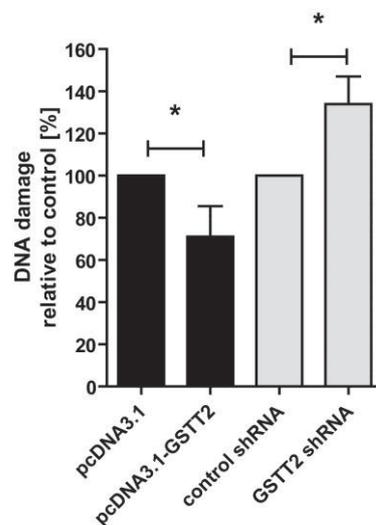


Abb. 26: **GSTT2 schützt vor der CumOOH-induzierten Genotoxizität.**

HT29 Zellen mit Überexpression von GSTT2 oder mit einer shRNA-vermittelten Depletion der endogenen GSTT2 wurden bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber CumOOH getestet. Dafür wurden die verschiedenen Zelllinien mit 75 µM CumOOH für 15 min behandelt und anschließend im Comet Assay analysiert. Die Schweifintensitäten wurden jeweils auf die Werte der zugehörigen Kontrollen normalisiert. Die Daten wurden aus 4 unabhängigen Experimenten kumuliert (* $p < 0.05$; $n = 4$).

Die so erhaltenen Zellen wurden dann auf ihre Empfindlichkeit bezüglich der CumOOH-induzierten Genotoxizität analysiert (Abb. 26). Im Ergebnis zeigte sich, dass erhöhte GSTT2-Expression eine verringerte Empfindlichkeit, Depletion von GSTT2 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber CumOOH bedingten. Damit konnte ein kausaler Zusammenhang von *GSTT2*-Expression und Empfindlichkeit gegenüber CumOOH-induzierter Genotoxizität überzeugend

belegt werden. Es kann geschlussfolgert werden, dass GSTT2 protektive Wirkungen der Apfelinhaltsstoffe vermitteln kann.

Zusammenfassung

Mit diesen und den vorangegangenen Untersuchungen konnte ein Mechanismus der Chemoprotektion durch Apfelinhaltsstoffe *in vitro* in allen Teilschritten aufgezeigt werden. Apfelinhaltsstoffe induzieren die Expression von GSTT2. Erhöhte GSTT2-Spiegel bewirken einen Schutz vor genotoxischen Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften wie die Modellsubstanz CumOOH.

Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus auch *in vivo* eine Rolle spielt, da die Fermentationsprodukte der Apfelpolyphenole, Dihydroxyphenylelessigsäure (ES), und 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (PS) GSTT2 induzieren können und auch protektiv bezüglich der Wirkung von CumOOH sind.

Meilenstein VI: Charakterisierung der protektiven Wirkungen von Ileostomieproben nach Apfelsaftaufnahme (*ex vivo* Biomarkeranalysen)

Unter Verwendung von Ileostomieproben nach Aufnahme von trübem Apfelsaft sollte geklärt werden, inwiefern Polyphenole als bioaktive Komponenten zur Modulation chemoprotektiver Parameter im Kolonlumen zur Verfügung stehen. Anhand der gezielten Durchführung von Genexpressions- und Chemoresistenzanalysen mit Proben aus den randomisierten, 4wöchigen Apfelsaftinterventionsstudien (TP 1.8, 1.9) sollte *ex vivo* erstmals gezeigt werden, ob Apfelprodukte auch unter üblichen Verzehrsbedingungen einen Beitrag zur Chemoprävention leisten können.

Die Genotoxizität von Ileostomieproben kann teilweise durch Apfelsaftaufnahme reduziert werden.

Zum Nachweis protektiver, durch die Aufnahme von trübem Apfelsaft bedingter Effekte *ex vivo* wurden zunächst Ileostomie-Proben (Beutelinhalt) von humanen Probanden, vor und 2 h nach Aufnahme von Apfelsaft bezüglich ihrer genotoxischen Wirkung auf die Testzellen (HT29) untersucht. Die Ileostoma-Beutelinhalte stellen dabei eine bezüglich der Bioverfügbarkeit äußerst relevante Probenklasse dar. Sie enthielten nachweisbare, aber gegenüber dem Apfelsaft reduzierte Mengen definierter Polyphenole, darunter Chlorogensäure. Dabei zeigten sie 2 h nach Apfelsaftverzehr ein Maximum an Polyphenolen, was durch die chemische Analyse durch TP 1.1 nachgewiesen wurde. Bei einigen Probanden (1, 8, 11) war ein deutlicher Trend bezüglich der Reduktion der Genotoxizität zu verzeichnen (Abb. 27).

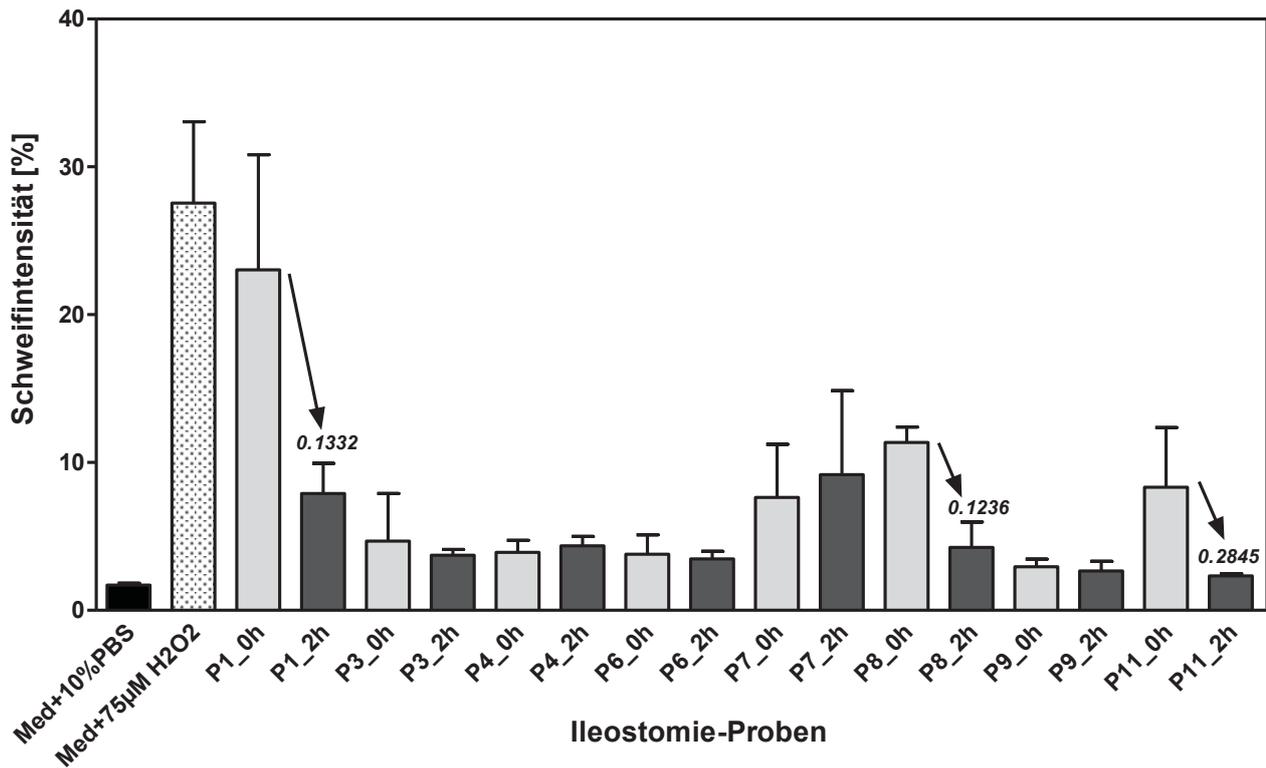


Abb. 27: **Genotoxische Wirkung des Beutelinhalts von Ileostomie-Patienten (1:10 in Medium) vor und 2 h nach Aufnahme von Apfelsaft in HT29 Zellen (8 Probanden, 30 min);** n=3, MW+SD; t-Test.

Ileostomieproben nach Apfelsaftaufnahme haben teilweise das Potential H₂O₂-induzierte DNA-Schäden reduzieren.

Ileostomie-Proben mit reduzierter Genotoxizität 2 h nach der Apfelsaftaufnahme verminderten die Höhe H₂O₂-induzierter DNA Schäden in HT29 Zellen (Challenge-Assay, Abb. 28).

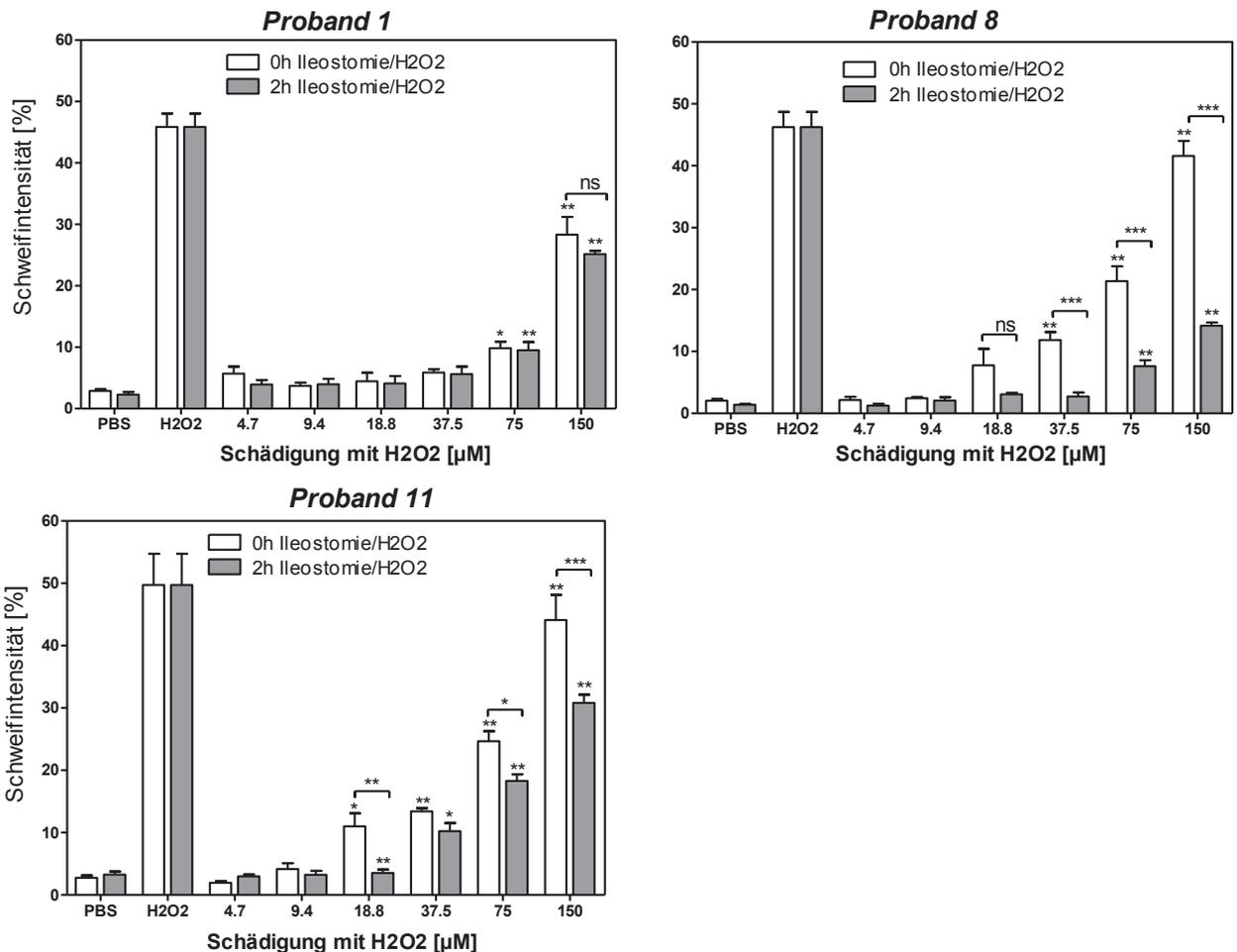


Abb. 28: **Einfluss von Ileostomieproben (Probanden 1, 8, 11; 1:10 in Medium, 24 h) vor und 2 h nach Apfelsaftaufnahme auf die Genotoxizität von H₂O₂ in HT29 Zellen**; n=3; MW+SD, t-Test bzw. one-way ANOVA, **p*<0,05; ***p*<0,01, ****p*<0,001.

Demgegenüber wiesen Ileostomieproben der Probanden 4, 7 und 9, die nach der Aufnahme von Apfelsaft keine reduzierten, genotoxischen Wirkungen im Comet Assay aufgezeigt hatten (Abb. 27), auch keine antigenotoxischen Effekte gegenüber H₂O₂ auf (ohne Abbildung).

Ileostomieproben nach Apfelsaftaufnahme können teilweise GSTT2 induzieren.

Um die Ursachen der beobachteten Unterschiede näher zu beleuchten, wurde die Expression des Phase II-Gens *GSTT2* in Abhängigkeit von der Behandlung mit den Ileostomieproben verschiedener Probanden in HT29-Zellen mittels Real-time PCR ermittelt.

Mit Ausnahme der Probe 1 reflektierten die *GSTT2*-Genexpressionsanalysen (Abb. 29) die Ergebnisse der Challenge-Assays. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit dem Reporter-Assay für den *GSTT2*-Promotor erzielt werden (s.o.; ohne Abbildung). Demnach könnten die antigenotoxischen Effekte der Ileostomieproben 8 und 11 unter anderem durch die gesteigerten GST-Expressionslevel begründet sein.

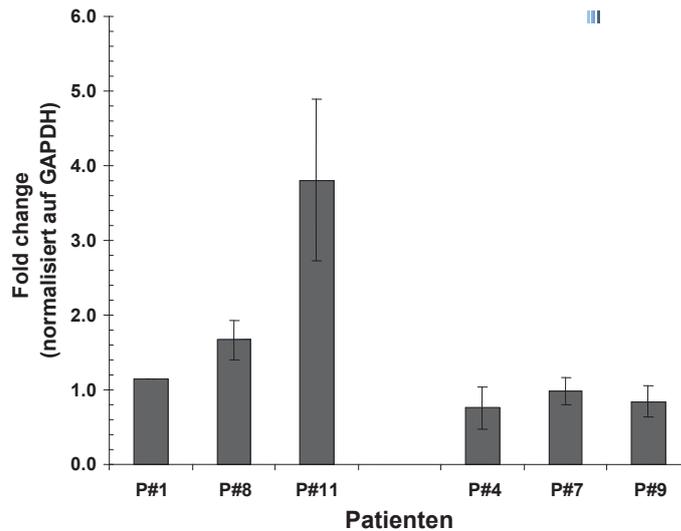


Abb. 29: *Einfluss von Ileostomieproben (1:10 in Medium) auf die mRNA-Expression von GSTT2 in HT29 Zellen (24 h); n=3, MW+SD.*

Zusammenfassung

Die Untersuchungen mit Ileostomieproben zeigen, dass nach Intervention mit trübem Apfelsaft physiologisch relevante Konzentrationen an Polyphenolen im Dickdarm zur Verfügung stehen. Diese sind möglicherweise für eine Reihe chemopräventiver Effekte (antigenotoxische Kapazitäten, Induktion der *GSTT2*-Expression) verantwortlich, die schon durch Apfelpolyphenolextrakte und Polyphenolmetabolite (Meilenstein II und III) *in vitro* beschrieben werden konnten. Aufgrund des sehr kleinen Probandenkollektivs konnten die Ergebnisse allerdings teilweise nicht statistisch gesichert werden.

Meilenstein VII: Vergleichende Analysen der Expressionshöhen an Lymphozyten und Kolonozyten, um Aussagen zu treffen inwiefern beide mögliche Biomarker übereinstimmend sind

Ein weiteres Ziel der Arbeiten war es zu erkennen, inwiefern Lymphozyten als „Surrogatgewebe“ die Ereignisse im Kolon widerspiegeln oder ob sie sich v.a. zum Nachweis von spezifischen systemischen Effekten der Chemoprotektion nutzen lassen. Dafür sollten die Expressionsprofile der in Mechanismen der Chemoprävention involvierten Gene in Lymphozyten und Kolonbiopsien (teilweise von gleichen Spendern) untersucht werden.

Gene der Phase I und II des Fremdstoffmetabolismus weisen ein ähnliches Expressionsniveau in Lymphozyten und Kolonozyten auf.

Mittels Superarray wurden die relativen Expressionslevels von Genen, welche hinsichtlich ihrer Funktionalität gruppiert waren (Zellwachstum, Entzündungsreaktionen, Stressantworten, Apoptose und Gene des Phase I-, II- und III- Metabolismus) bestimmt (Abb. 30). Insgesamt konnten Unterschiede zwischen den primären Kolonozyten und den peripheren Lymphozyten festgestellt werden. So waren zum Beispiel Glycoproteine und Metallothioneine in Kolonozyten stärker exprimiert. Hingegen scheinen Lymphozyten besser mit Genen des Apoptose-Signalweges ausgestattet zu sein. Gene der Phase I und II zeigten ein ähnliches Expressionslevel in beiden Zelltypen. Aufgrund des Gleichgewichtes zwischen Phase I und Phase II könnten beide Zelltypen in der Lage sein, physiologische Konzentrationen bestimmter Substanzen auf einem ähnlichen Weg und in einem vergleichbaren Ausmaß zu metabolisieren.

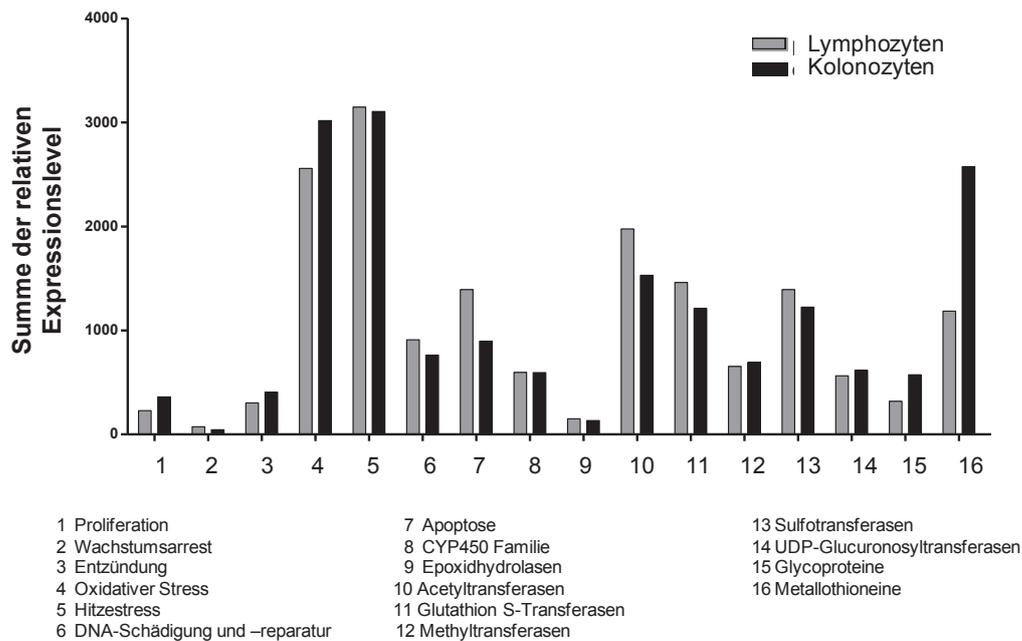


Abb. 30: **Vergleich der Expressionslevel von Genen der Karzinogenese und Chemoprävention in Leukozyten und primären Kolonozyten mittels Superarray; n=1.**

Das Expressionsniveau der Glutathion S-Transferasen variierte zwischen den Spendern.

Abbildung 31a zeigt die Expressionsanalyse der Supergenfamilie Glutathion-S-Transferasen in Kolonozyten und Lymphozyten verschiedener Spender. Die interindividuelle Variabilität war insgesamt sehr hoch. In Abbildung 31b ist die entsprechende Expressionsanalyse von 3 Probanden, die sowohl Kolonozyten als auch Lymphozyten spendeten, dargestellt. Trotz homogenerem Expressionsmuster kann man nicht eindeutig schlussfolgern, dass die Variation zwischen Kolonozyten und Lymphozyten geringer ist als bei heterogenen Spendern.

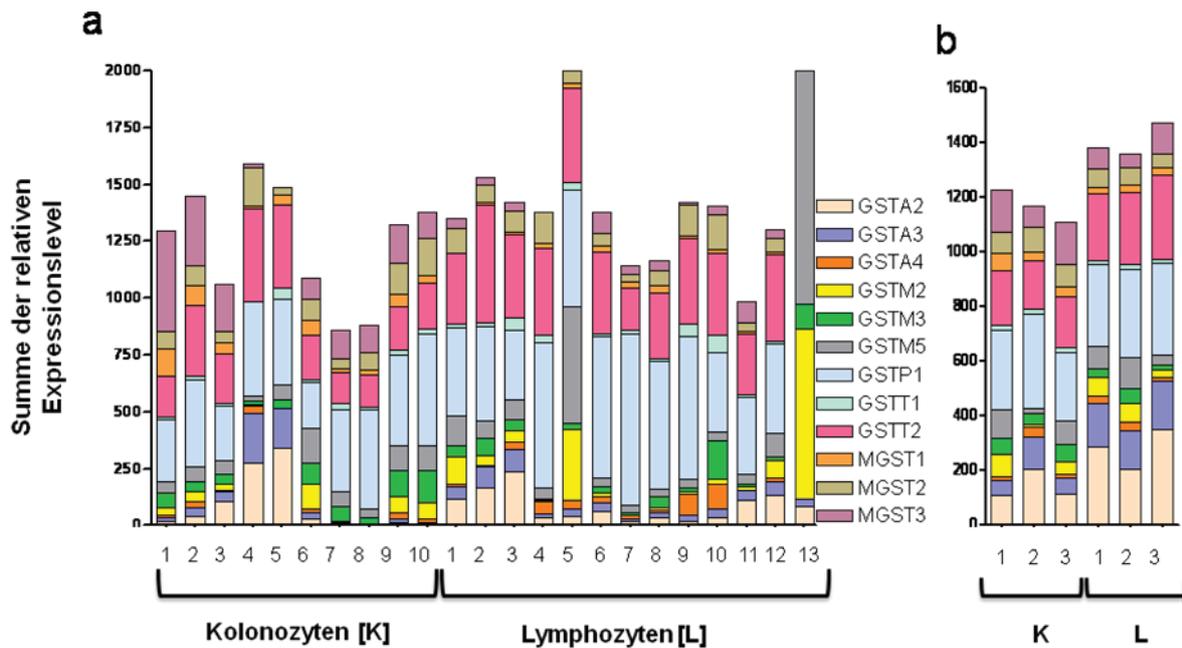


Abb. 31: *Vergleich der Expressionslevel von Isoformen der GST-Superfamilie in Lymphozyten und Kolonozyten a) 10 verschiedene Spender für Kolonozyten, 13 verschiedene Spender für Lymphozyten b) 3 Spender für Kolonozyten und Lymphozyten mittels Superarray; n=1.*

Zusammenfassung

Ein Vergleich der basalen Expressionslevel von Genen der Karzinogenese und der Chemoprotektion in humanen Lymphozyten und primären Kolonozyten aus Kolonbiopsien verschiedener Spender macht deutlich, dass die Lymphozyten das Expressionsmuster der Kolonozyten nicht widerspiegeln. Selbst in Untersuchungen beider Zelltypen von gleichen Spendern konnten keine homogenen Ergebnisse detektiert werden. Deshalb ist zu schlussfolgern, dass die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Lymphozyten als „Surrogatgewebe“ nur sehr eingeschränkt zulässig ist und daher kolonspezifische Analysen bevorzugt in humanen Kolonozyten durchgeführt werden sollten.

Meilenstein VIII: Biomarkeranalysen an Stuhlproben und Lymphozyten (ex vivo Biomarkeranalysen)

Nach Aufarbeitung der aus der Apfelsaftinterventionsstudie mit gesunden Probanden (TP 1.9) gewonnenen Stuhlproben (Kontroll (KG)- und Apfelsaftgruppe (AG); vor (D) und nach (I) Intervention) sollte erfasst werden, ob im Kolonlumen nach Apfelsaftaufnahme eine Anreicherung von Stoffen (Polyphenolmetabolite, kurzkettige Fettsäuren) zu erwarten ist, die das Potential besitzen, in den Kolonozyten die verschiedenen Systeme der Chemoprotektion zu modulieren. Damit sollte bewertet werden, ob der Verzehr von Apfel bzw. -produkten mit einer Erhöhung der toxikologischen Abwehr einhergeht, d.h. ob durch die Intervention eine Primärprävention von Krebs möglich erscheint.

Die Fäzeswässer vor und nach Apfelsaftintervention wurden zunächst für Untersuchungen zur Konzentrationsfindung genutzt, um im Weiteren Veränderungen hinsichtlich des genotoxischen bzw. antigenotoxischen Potentials durch eine Apfelsaftintervention zu bestimmen. Es schlossen sich probandenspezifische Untersuchungen im Hinblick auf die Modulation der *GSTT2* sowie zum Einfluss auf die Apoptoserate an. Außerdem wurden Lymphozyten derselben Probanden zur Analyse des Einflusses einer Apfelsaftintervention auf Basalschäden und oxidierte Basen herangezogen. Der vorgesehene Vergleich der Expressionslevel von relevanten Genen in Lymphozyten der Probanden und den Fäzeswasser-inkubierten Kolonozyten konnte aufgrund der überwiegend sehr schlechten Vitalität der isolierten Lymphozyten nicht abschließend realisiert werden. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung des genotoxischen Potentials der Fäzeswässer aus der Humanstudie mit Adipösen.

Fäzeswasserpools von Probanden aus Kontroll- bzw. Apfelsaftgruppe modulieren die LT97 Zellzahl in vergleichbarer Weise.

Zur orientierenden Bestimmung des antiproliferativen Potentials und damit der Konzentrationsfindung für alle weiteren geplanten Versuche (Genexpression, funktionelle Konsequenzen, Apoptose) wurden Fäzeswasser-Mischpools (je Gruppe 8 willkürlich ausgewählte Probanden) hergestellt. Dies erschien aus Gründen der Materialersparnis sinnvoll und wurde dem Screening der einzelnen Probanden vorgezogen.

Die Behandlung der LT97 Zellen mit den Fäzeswasserpools der Apfelsaft- und Kontrollgruppe reduzierte die Zellzahl signifikant zeit- und dosisabhängig (ohne Abbildung). Dabei waren keine Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen sowie vor und nach Intervention zu verzeichnen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Polyphenole / Metabolite in den Fäzes der Apfelsaftgruppe nach Intervention keinen zusätzlichen Effekt auf die Zellzahl haben.

Eine Apfelsaftintervention hat keinen Einfluss auf das genotoxische und antigenotoxische Potential von humanem Fäzeswasser in LT97 Zellen (nach Kurzzeitinkubation).

Die Fäzeswässer der einzelnen Probanden aus Kontroll- und Apfelsaftgruppe (n=22) wurden sowohl hinsichtlich ihres Potentials DNA-Schäden zu generieren, als auch antigenotoxisch zu wirken, an LT97 Zellen getestet. Dafür wurden die Zellen mit Fäzeswasser bzw. parallel Fäzeswasser + CumOOH für 30 min inkubiert. Die Fäzeswässer der einzelnen Interventionsgruppen zeigten im Mittel im Vergleich zur Positivkontrolle (PK = 75 µM CumOOH) deutlich geringere genotoxische Eigenschaften (Abb. 32 oben). Allerdings induzierten die Fäzeswässer nach Intervention mit dem Kontrollgetränk (KG-I, dem Apfelsaft analog Vitamin C-adjustiertes, isokalorisches Getränk) signifikant weniger DNA-Schäden als vor dieser Intervention (KG-D). Zwischen den beiden Phasen innerhalb der Apfelsaftgruppe (AG-D und AG-I) konnten hingegen keine Veränderungen nachgewiesen werden.

Ein antigenotoxisches Potential gegen CumOOH-induzierte DNA-Schäden konnte für keine der beiden Interventionsgruppen während der parallel angesetzten Kurzzeitinkubation nachgewiesen werden (Abb. 32 unten). Das bedeutet, dass direkte Abfangreaktionen durch Polyphenole und Polyphenolmetabolite im Fäzeswasser nach Apfelsaftintervention wahrscheinlich keine besondere Rolle spielen.

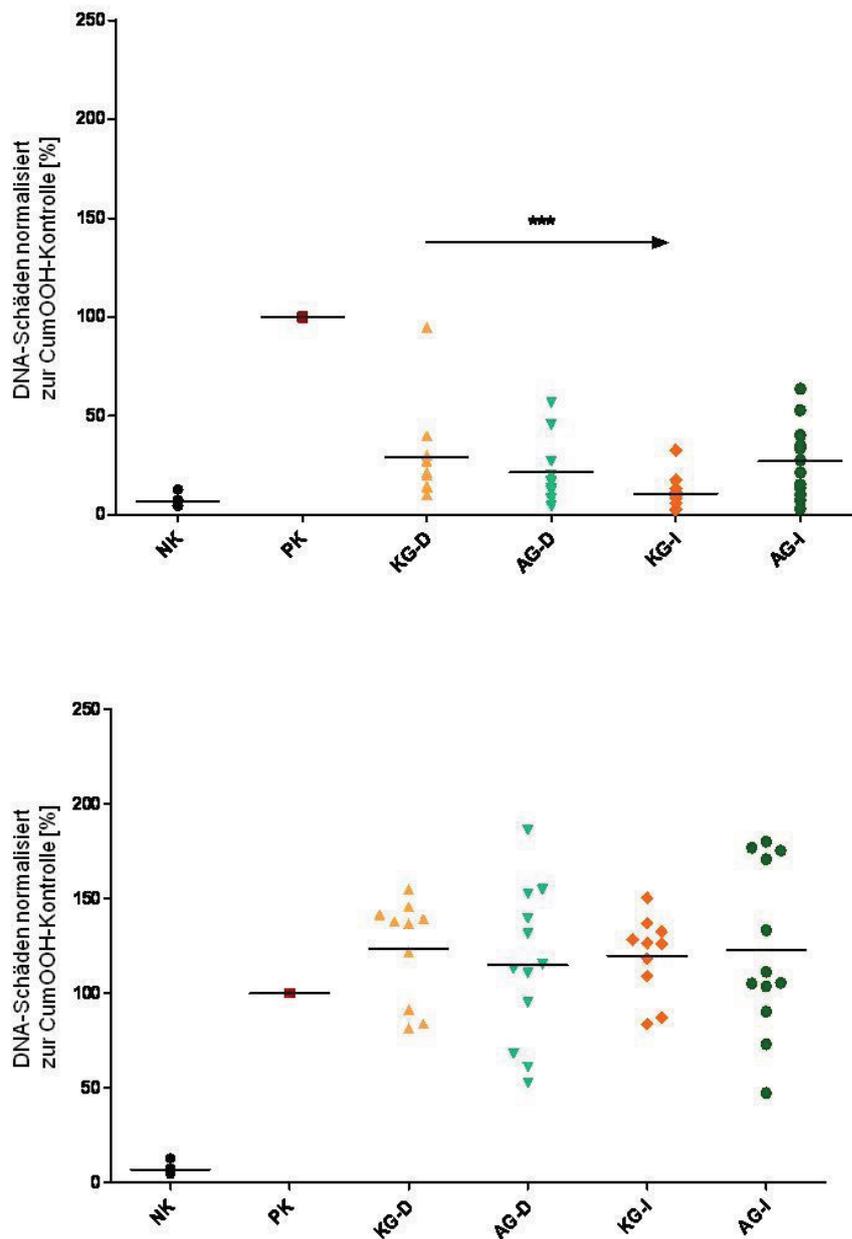


Abb. 32: **Genotoxisches (oben) und antigenotoxisches (unten) Potential von AG-D/AG-I bzw. KG-D/KG-I in LT97 Zellen (30 min, Fäzeswasser 50 %)**, n=22 gesunde Probanden; MW±SD, gepaarter t-Test, ***p<0,001.

Eine Apfelsaftintervention hat keinen Einfluss auf die Modulation von *GSTT2* und das genotoxische sowie antigenotoxische Potential von humanem Fäzeswasser in LT97 Zellen (nach Langzeitinkubation).

Neben den Kurzzeitversuchen wurden zusätzlich chemopräventive Langzeiteffekte untersucht. Dazu wurden die Fäzeswässer der gesunden Probanden vor und nach Intervention mit Apfelsaft- oder Kontrollgetränk auf ihr Potential die *GSTT2* mRNA Expression zu modulieren und nachfolgend antigenotoxisch zu wirken, an LT97 Zellen getestet. Hierfür wurden die Zellen

für 24 h mit den jeweiligen Fäzeswässern inkubiert und für Genexpressionsanalysen mittels Real-time PCR und für die Untersuchungen zu funktionellen Konsequenzen mittels Comet Assay herangezogen. Die *GSTT2*-Genexpression konnte im Mittel durch eine Apfelsaftintervention nicht gesteigert werden (Abb. 33). Die Expressionslevel sind dabei mit denen der Fäzeswässer der Kontrollgetränkgruppe vergleichbar.

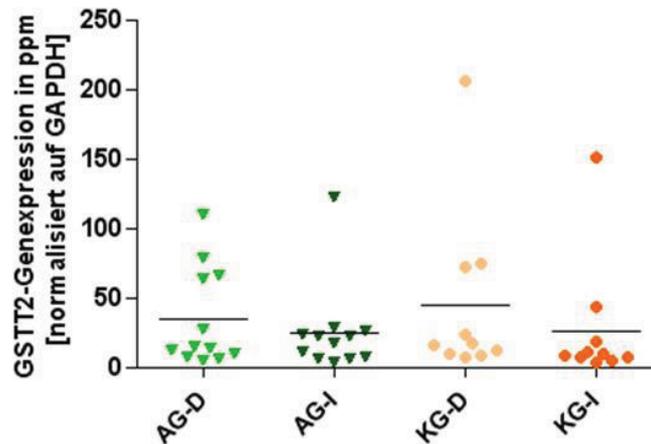


Abb. 33: **Einfluss der Fäzeswässer AG-D/AG-I bzw. K-D/KG-I auf die *GSTT2*-Genexpression in LT97 Zellen nach 24 h (Fäzeswasser 2,5 %); n=22 gesunde Probanden; MW±SD.**

Im Vergleich zur Negativkontrolle (NK = PBS) zeigte eine 24stündige Inkubation mit den Fäzeswässern beider Getränkegruppen (AG und KG) weder vor noch nach Intervention ein genotoxisches Potential (Abb. 34, links Apfelsaftgruppe, rechts Kontrollgetränkgruppe).

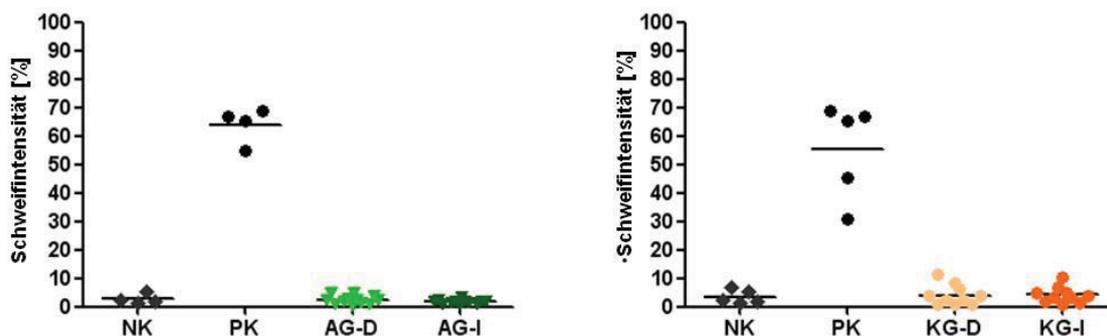


Abb. 34: **Genotoxisches Potential von AG-D/AG-I (links) bzw. KG-D/KG-I (rechts) in LT97 Zellen nach 24 h (Fäzeswasser 2,5%); n=22 gesunde Probanden; MW±SD.**

Darüber hinaus wurde deutlich, dass CumOOH-induzierte DNA Schäden innerhalb beider Interventionsgruppen gegenüber den jeweiligen Depletionsphasen im Mittel nicht reduziert werden konnten (Abb. 35). Da es sich bei CumOOH u.a. um ein *GSTT2*-spezifisches Substrat handelt, bestätigen diese Beobachtungen die Ergebnisse zur Genexpression.

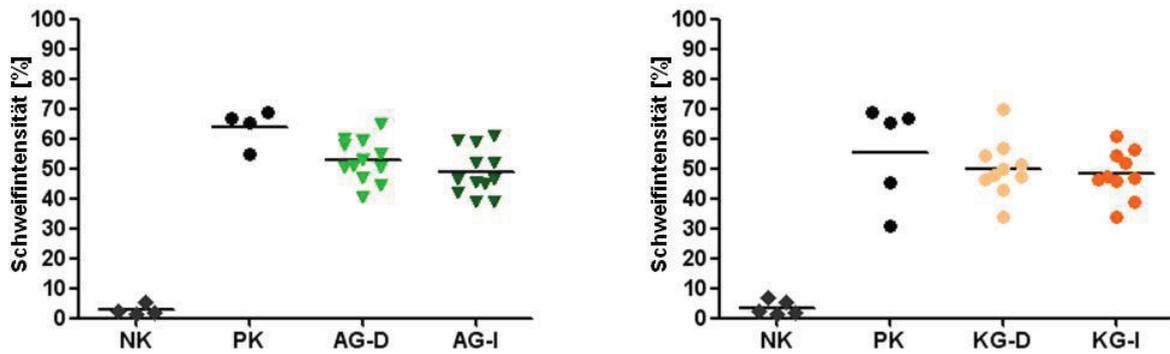


Abb. 35: **Antigenotoxisches Potential von AG-D/AG-I (links) bzw. KG-D/KG-I (rechts) in LT97 Zellen nach 24 h (Fäzeswasser 2,5 %); n=22 gesunde Probanden; MW±SD.**

Eine Intervention mit trübem Apfelsaft hat keinen Einfluss auf die Apoptoserate von LT97 Zellen.

Nach Inkubation der LT97 Zellen mit den Probandenfäzeswässern vor (Depletion) und nach Intervention (Intervention) für 24 h und 48 h konnten sowohl morphologische Veränderungen als auch eine Zunahme der Zellen im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen waren in Kontroll- und Apfelsaftgruppe gleichermaßen ersichtlich. Nach Analyse im Durchflusszytometer (analog zu den Untersuchungen mit FÜ Blank/FÜ Trub) konnte allerdings keine Steigerung der Apoptoserate nach Apfelsaftaufnahme detektiert werden. Auch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Apfelsaftgruppe nachweisbar (Abb. 36A und 36B).

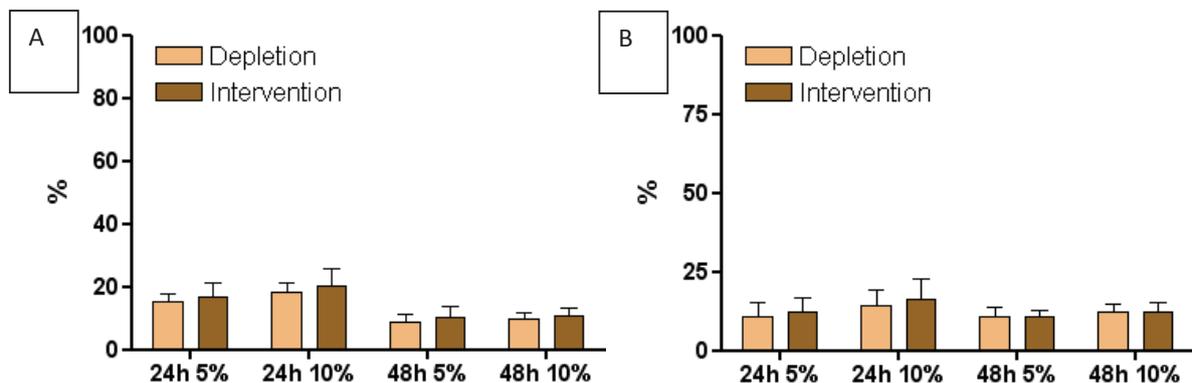


Abb. 36: **Einfluss von 5 % und 10 % Fäzeswasser auf die Apoptoserate in LT97 Zellen nach 24 h und 48 h im Vergleich Kontrollgruppe (A) zur Apfelsaftgruppe (B); n=22 gesund Probanden; MW+SD.**

Eine Intervention mit trübem Apfelsaft hat keinen Einfluss auf DNA-Schäden in den Lymphozyten der Probanden.

Nach dem Auftauen wiesen die eingefrorenen Lymphozyten aus der Studie mit den gesunden Probanden stark reduzierte Wiederfindungsrate auf, so dass die Untersuchungen zur Ermittlung von Basalschäden mit Lymphozyten eingeschränkter Vitalität erfolgten. Allerdings wurden Proben mit einer Vitalität $\geq 25\%$ von den Analysen ausgeschlossen.

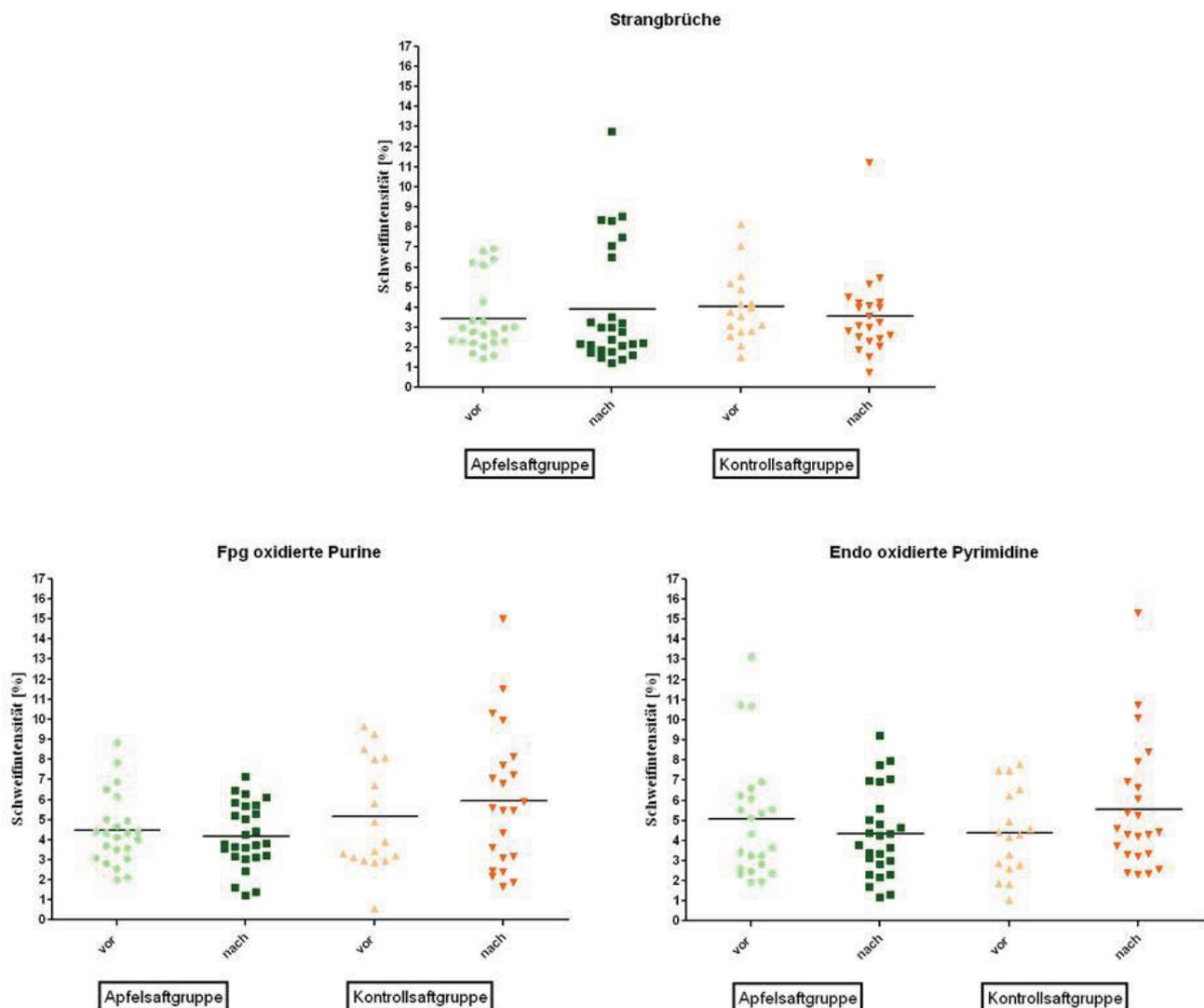


Abb. 37: **Nachweis von Strangbrüchen und oxidierten DNA-Basen in den Lymphozyten der gesunden Probanden aus der Apfelsaftinterventionsstudie**; je Interventionsgruppe 18-26 Probanden; MW \pm SD.

Insgesamt konnten keine Unterschiede der Basalraten an Strangbrüchen und oxidierten Purin- und Pyrimidinbasen in Abhängigkeit der Interventionsgruppe und -phase (Kontroll- und Apfelsaftgruppe) im alkalischen Comet Assay mit/ohne Enzyme (FPG/ EndoIII) nachgewiesen werden (Abb. 37).

Eine Apfelsaftintervention hat keinen Einfluss auf das genotoxische Potential von humanem Fäzeswasser adipöser Probanden in LT97 Zellen.

Da Adipositas und die oftmals damit verbundene ungesunde Ernährungsweise als Risikofaktoren für die Entwicklung von Dickdarmkrebs gelten [7], wurde auch eine Apfelsaftinterventionsstudie mit adipösen Probanden durchgeführt (TP 1.9). Die Fäzeswässer der einzelnen Probanden aus Kontroll- und Apfelsaftgruppe (n=20) wurden hinsichtlich ihres Potentials DNA-Schäden zu generieren an LT97 Zellen getestet. Die Versuchsbedingungen wurden analog zum Screening der Fäzeswässer aus der Studie mit gesunden Probanden gewählt. Die Fäzeswässer der einzelnen Interventionsgruppen erwiesen sich im Vergleich zur Negativkontrolle (NK = PBS) als tendenziell genotoxisch, wobei keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen auftraten (Abb. 38). Allerdings ergab die Gegenüberstellung der Genotoxizität von Fäzeswässern Adipöser und Gesunder, dass die Fäzeswässer der Adipösen im Vergleich zu denen der Gesunden deutlich höhere DNA-Schäden induzierten (Vergleiche Abb. 39), was als Hinweis auf die Ernährungsweise und den Lebensstil der adipösen Probanden gewertet werden kann.

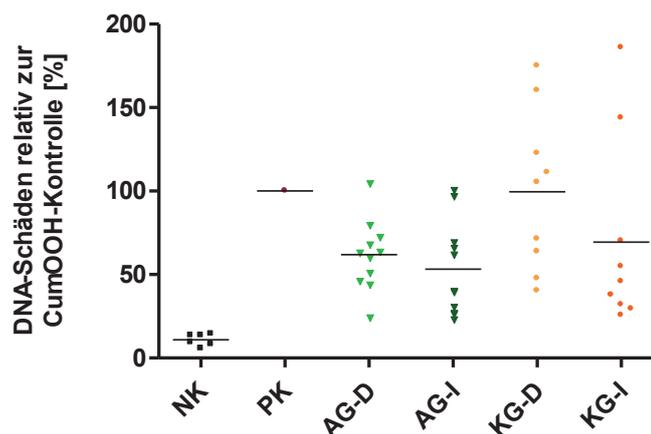


Abb. 38: **Genotoxisches Potential von AG-D/AG-I bzw. KG-D/KG-I in LT97 Zellen (30 min, Fäzeswasser 50 %)**; n=20 adipöse Probanden; MW±SD.

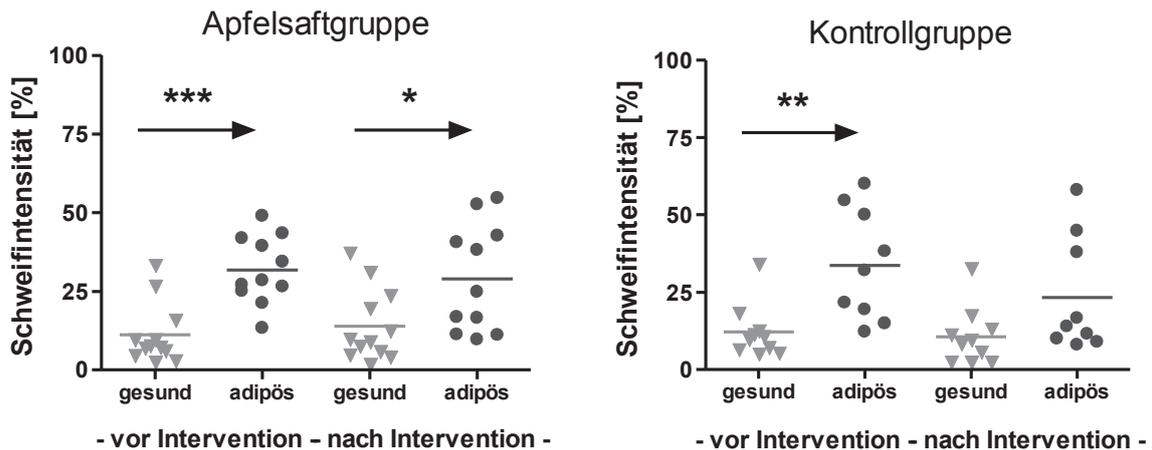


Abb. 39: *Vergleich der genotoxischen Kapazitäten der Fäzeswässer aus den humanen Interventionsstudien mit gesunden und adipösen Probanden der Apfelsaft- und Kontrollgruppe in LT97 Zellen (30 min, Fäzeswasser 50 %); n=22 gesunde bzw. 20 adipöse Probanden) MW±SD.*

Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum chemopräventiven Potential der physiologischen Fäzeswasserinhaltsstoffe nach Intervention konnten die Ergebnisse generiert mit den Ileostomieproben (Meilenstein VI) nicht verifizieren. Keiner der untersuchten Parameter (Genotoxizität, Antigenotoxizität, Genregulation oder Apoptose) wurde durch die Polyphenole/-metabolite im Fäzeswasser moduliert. Durch die Nutzung von Fäzeswasser in subtoxischen Konzentrationen ist allerdings der Konzentrationsbereich an aktiven Komponenten im Fäzeswasser nach Apfelsaftintervention stark begrenzt und könnte demnach außerhalb der jeweiligen effektiven Wirkbereiche liegen.

Der Vergleich der Genotoxizitäten der Fäzeswässer gesunder und adipöser Probanden ergab ein signifikant höheres genotoxisches Potential der letztgenannten, wobei durch die Apfelsaftintervention auch keine Verminderung nachweisbar war. Ursachen für eine gesteigerte Genotoxizität der Fäzeswässer von Adipösen können möglicherweise auf einen ungesünderen Lebensstil verbunden mit der in westlichen Industrieländern typischen „western style diet“ zurückzuführen sein [8]. Dabei begünstigt die Aufnahme einer vorwiegend fleisch- und fettreichen Kost beispielsweise die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [9], Lipidperoxidationsprodukten oder sekundären Gallensäuren [10], die wiederum als Tumorpromotoren einzustufen sind.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Verwendungsnachweis für alle Zuwendungen auf Ausgabenbasis, die Gerätebestandsliste inklusive der Bestätigung zur Geräteweiterverwendung für das Teilprojekt 1.4 (Arbeitsgruppe Gleis sowie Arbeitsgruppe Böhmer) wurden dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt bereits am 17.09.09 bzw. am 07.10.09 zugeleitet.

Die wesentlichen Positionen betrafen das Personal mit 222.040 €, die Verbrauchsmaterialien mit 141.128 €, die Auftragsvergabe und Reisekosten mit 7.000 € sowie die Investitionen/Großgeräte mit 94.010 €. Damit betrug der Kassenbestand zum 13.09.2009 0,00 €.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Planung des Versuchsvorhabens und die Teilaufgaben der Meilensteine, wie im Antrag ausgeführt, waren strikte Leitlinie aller Arbeiten. Zu allen geplanten Meilensteinen wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, aussagefähige Daten erhalten und diese in Berichten und Publikationen dokumentiert. Teilweise wurde zusätzlich interessanten Fragestellungen vertiefend nachgegangen, die in der ursprünglichen Planung des Gesamtvorhabens noch nicht berücksichtigt werden konnten. Dies betrifft beispielsweise die Charakterisierung von wirksamen Reinsubstanzen und die Analyse von Expressionsmustern für Proben aus den Interventionsversuchen in Ratten aus der ersten Förderphase. Die verfügbaren personellen und finanziellen Ressourcen wurden vollständig ausgeschöpft. Es wird eingeschätzt, dass die erbrachten Ergebnisse den Zielstellungen des Vorhabens entsprechen und die Angemessenheit der geleisteten Forschungen überzeugend belegen.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Ein klarer Wissenszugewinn ist durch die Identifizierung von Reinsubstanzen mit protektiven Wirkungen *in vitro* (Metaboliten ES, PS) sowie des Wirkungsmechanismus einer Reinsubstanz mit putativ protektiven Wirkungen (robuste Induktion eines Phase II Enzyms, β -OH-Damascon) zu verzeichnen. Für die Nutzung dieser Ergebnisse ist allerdings der Nachweis protektiver Wirkungen *in vivo* erforderlich.

Eine wirtschaftliche Verwertung kann vor allem über eine verbesserte Vermarktung von Apfelprodukten mit wissenschaftlichen Argumenten sowie anhand der Identifikation aktiver Komponenten erwartet werden. Die für den Fremdstoffmetabolismus als günstig eingestuftem Apfelinhaltsstoffe könnten durch Anreicherung in funktionellen Lebensmitteln Berücksichtigung finden.

5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Zeitraum 2006-2009 sind unter dem Stichwort „apple polyphenols“ in der Datenbank PubMed 55 relevante Publikationen auffindbar, die im engeren Sinne das bearbeitete Themengebiet betreffen. Davon stammen 24 Arbeiten aus den am geförderten Netzwerk beteiligten Arbeitsgruppen. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Tätigkeit der Gruppen des Netzwerks das Arbeitsgebiet eindeutig dominiert hat. Auf dieser Grundlage kann ausgesagt werden, dass die wesentlichen zu beachtenden „anderen Stellen“ in der Tat im Netzwerk selbst angesiedelt waren. Der jeweilige Fortschritt konnte somit durch die Interaktionen stets zeitnah für das hier zum Bericht stehende Projekt einbezogen werden.

Wenn die durch andere Gruppen publizierte Literatur betrachtet wird, kann festgestellt werden, dass keine zu den eigenen Daten widersprüchlichen Ergebnisse publiziert wurden. Es besteht im Fachgebiet weitgehend Konsens, dass Apfelpolyphenole eine wichtige, gesundheitsfördernde Rolle spielen und deshalb die Optimierung des Gehalts an diesen Stoffen im Rahmen des Vergleichs von Apfelsorten oder bezüglich technologischer Prozesse eine wichtige Frage ist. Die Untersuchung von Wirkmechanismen durch andere Arbeitsgruppen bleibt hinter den hier berichteten Arbeiten deutlich zurück. Insbesondere sind im Bearbeitungszeitraum von anderen keine Reinsubstanzen beschrieben worden, die protektive Effekte vermitteln können und es wurden keine molekularbiologischen Ansätze verfolgt, um Wirkungsmechanismen zu etablieren. Ein vielleicht beachtenswerter, sehr neuer Befund ist die Hemmwirkung von Apfelpolyphenolen *in vitro* auf *Helicobacter pylori* [11]. Die mögliche Beeinflussung Magen/Darm-pathogener Keime durch Apfelpolyphenole hat eventuell ein interessantes Anwendungspotential, war aber nicht Gegenstand des geförderten Projektes. In einer sehr neuen epidemiologischen Studie, die allerdings in einem Journal mit relativ geringem Impact publiziert wurde [12], korrelierten Apfelverzehr und geringere Inzidenz von kolorektalem Karzinom signifikant. Diese Beobachtungen unterstreichen nachdrücklich die Relevanz der im Netzwerk durchgeführten Untersuchungen.

Reference List

1. Fogh J, Trempe X: **Human tumor cells in vitro**. Plenum Press New York 1975, 115-159.
2. Richter M, Jurek D, Wrba F, Kaserer K, Wurzer G, Karner-Hanusch J *et al.*: **Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro**. *Eur J Cancer* 2002, **38**: 1937-1945.
3. Barth SW, Fahndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F *et al.*: **Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats**. *Carcinogenesis* 2005, **26**: 1414-1421.
4. Barth SW, Faehndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H *et al.*: **Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis**. *J Agric Food Chem* 2007, **55**: 1181-1187.
5. Balavenkatraman KK, Jandt E, Friedrich K, Kautenburger T, Pool-Zobel BL, Ostman A *et al.*: **DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients**. *Oncogene* 2006, **25**: 6319-6324.
6. Guy CA, Hoogendoorn B, Smith SK, Coleman S, O'Donovan MC, Buckland PR: **Promoter polymorphisms in glutathione-S-transferase genes affect transcription**. *Pharmacogenetics* 2004, **14**: 45-51.
7. Erdelyi I, Levenkova N, Lin EY, Pinto JT, Lipkin M, Quimby FW *et al.*: **Western-style diets induce oxidative stress and dysregulate immune responses in the colon in a mouse model of sporadic colon cancer**. *J Nutr* 2009, **139**: 2072-2078.
8. Rieger MA, Parlesak A, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G, Bode C: **A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'**. *Carcinogenesis* 1999, **20**: 2311-2316.
9. Erhardt JG, Lim SS, Bode JC, Bode C: **A diet rich in fat and poor in dietary fiber increases the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces**. *J Nutr* 1997, **127**: 706-709.
10. Pearson JR, Gill CI, Rowland IR: **Diet, fecal water, and colon cancer--development of a biomarker**. *Nutr Rev* 2009, **67**: 509-526.
11. Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, Alarcon J, Speisky H: **Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of Helicobacter pylori urease**. *J Agric Food Chem* 2009, **57**: 416-424.
12. Jedrychowski W, Maugeri U, Popiela T, Kulig J, Sochacka-Tatara E, Pac A *et al.*: **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* 2010, **19**: 42-47.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Veröffentlicht

- Balavenkatraman, K.K., Jandt, E., Friedrich, K., Kautenburger, T., Pool-Zobel, B.L., Ostman, A., Böhmer F.D. (2006) DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene*. 25(47), 6319-24.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., 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. *Mol Carcinog*. 45(3), 164-74.
- Veeriah, S., Hofmann, T., Gleib, M., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Knaup, B., 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). *J Agric Food Chem*. 55(8), 2892-900.
- Kern, M., Pahlke, G., Balavenkatraman, K.K., Böhmer, F.D., Marko, D. (2007) Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem*. 55(13), 4999-5006.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Veeriah, S., Will, F., Dietrich, H., Pool-Zobel, B.L., Schrenk, D. (2008) Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: Fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extracts. *Nutrition*. 24(4), 366-74.
- Veeriah, S., Miene, C., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Sauer, J., Böhmer, F., Wöfl, S., Pool-Zobel, B.L. (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer*. 122(12), 2647-55.
- Karagyozyov, L., Godfrey, R., Böhmer, S.A., Petermann, A., Hölter, S., Östman, A., Böhmer, F.D. (2008) The structure of the 5'-end of the protein-tyrosine phosphatase PTPRJ mRNA reveals a novel mechanism for translation attenuation. *Nucleic Acids Res*. 36, 4443-53.
- Veeriah, S., Balavenkatraman, K.K., Böhmer, F., Kahle, K., Gleib, M., Richling, E., Scheppach, W., Pool-Zobel, B.L. (2008) Intervention with cloudy apple juice results in altered biological activities of ileostomy samples collected from individual volunteers. *Eur. J. Nutr*. 47, 226-34.
- Miene, C., Gleib, M.: „Chemopräventive Effekte von Apfelpolyphenolen“, Zeitschrift: *Flüssiges Obst*, Fachzeitschrift für die Frucht- und Gemüsesaftindustrie sowie Hersteller von fruchtsafthaltigen Getränken, Fruchtwein-Industrie, Früchte- und Gemüseverwertung, Seiten 352-354, 07-2008.

- Miene, C., Klenow, S., Veeriah, S., Richling, E., Glei, M. (2009) Impact of apple polyphenols on *GSTT2* gene expression, subsequent protection of DNA and modulation of proliferation using LT97 human colon adenoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 53(10), 1254-62.
- Petermann, A., Miene, C., Schulz-Raffelt, G., Palige, K., Hölzer, J., Glei, M., Böhmer, F.D. (2009) *GSTT2*, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. *Mol Nutr Food Res.* 53(10), 1245-53.
- Gerhäuser, C., Klimo, K., Hümmer, W., Hölzer, J., Petermann, A., Garreta-Rufas, A., Böhmer, F.D., Schreier, P. (2009) Identification of 3-hydroxy- β -damascone and related carotenoid-derived aroma compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated phase 2 response with concomitant anti-inflammatory activity. *Mol Nutr Food Res.* 53(10), 1237-44.

Eingereicht:

- Miene, C., Weise, A., Glei, M. Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on modulation of gene expression and functional consequences in human colon cells. (eingereicht bei *Mol Cancer Food Res*, 2010)

Geplant:

- Petermann, A., Haase, D., Wetzel, A., Balavenkatraman, K.K., Tenev, T., Gührs, K.H., Mawrin, C., Böhmer, F.D. The protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is a negative regulator of cell motility. (geplant für Einreichung bei *Cancer Res.*)
- Miene, C., Petermann, A., Böhmer, F.D., A., Glei, M. Kolonprotektive Effekte von Apfelinhaltsstoffen und ausgewählten Metaboliten. (geplant für Einreichung *Flüssiges Obst*)