

**CHEMOPÄVENTIVE EFFEKTE VON APFELPOLYPHENOLEN UND
AUSGEWÄHLTEN METABOLITEN IN HUMANEN KOLONZELLEN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GSTT2**

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**



von Dipl. troph.

Claudia Miene

geboren am 30.06.1982

in Zwickau

Gutachter

1. Gutachter: PD Dr. Michael Gleis, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank-D. Böhmer, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Doris Marko, Wien

Tag der öffentlichen Disputation: 21.06.2010

*Meinen Eltern
und Eli*

In Erinnerung an meine Omi.

VERZEICHNISSE

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 BEDEUTUNG DES KOLONKARZINOMS	1
1.1.1 <i>Aufbau und Funktion des Dickdarms</i>	1
1.1.2 <i>Epidemiologische Grundlagen und Risikofaktoren für Kolonkrebs</i>	2
1.1.3 <i>Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese</i>	5
1.2 CHEMOPRÄVENTION VON KOLONKREBS	9
1.2.1 <i>Einführung in verschiedene Strategien und Ansatzpunkte</i>	9
1.2.2 <i>Modulation von Enzymen der Biotransformation</i>	10
1.2.2.1 Cyclooxygenasen.....	11
1.2.2.2 UDP-Glucuronosyltransferasen	13
1.2.2.3 Glutathion-S-Transferasen.....	14
1.2.3 <i>Induktion von apoptotischen Prozessen</i>	15
1.3 SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE – POLYPHENOLE.....	18
1.3.1 <i>Einteilung und Vorkommen</i>	18
1.3.2 <i>Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Polyphenolen</i>	20
1.3.3 <i>Mikrobielle Polyphenolmetabolite und Fäzeswasser als Biomarker</i>	22
1.3.4 <i>Polyphenole des Apfels</i>	24
1.3.5 <i>Apfelpolyphenole und mikrobielle Abbauprodukte als potentielle chemopräventive Agenzien</i>	24
2 ZIEL- UND PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT	26
3 PUBLIKATIONEN	28
3.1 PUBLIKATION I	28
3.2 PUBLIKATION II.....	38
3.3 PUBLIKATION III	48
3.4.PUBLIKATION IV	58
4 ZUSÄTZLICHE ERGEBNISSE	87
4.1 CHEMOPRÄVENTIVES POTENTIAL VON APFELSAFTTRUB.....	87
4.1.1 <i>In vitro-Fermentation (batch culture) der Trubfraktion eines Apfelsaftes</i>	87
4.1.2 <i>Genexpressionsänderungen nach Inkubation mit Fermentationsüberstand Trub</i>	88
4.1.3 <i>Einfluss des Fermentationsüberstandes Trub auf die Apoptoserate von LT97 Zellen</i>	88
4.2. HUMANE APFELSAFTINTERVENTIONSSTUDIEN MIT GESUNDEM UND ADIPÖSEM PROBANDENKOLLEKTIV	90
4.2.1 <i>Design der beiden Interventionsstudien</i>	90
4.2.2 <i>Einfluss der Apfelsaftintervention auf das genotoxische und antigenotoxische Potential von humanem Fäzeswasser gesunder Probanden</i>	91
4.2.3 <i>Einfluss der Fäzeswässer aus der Apfelsaftintervention bei Gesunden auf die Genexpression von GSTT2 und auf CumOOH-induzierte DNA-Schäden</i>	93
4.2.4 <i>Einfluss der Fäzeswässer aus der Apfelsaftintervention bei Gesunden auf die Apoptoserate von LT97 Zellen</i>	94
4.2.5 <i>Einfluss der Apfelsaftintervention auf das genotoxische Potential von humanem Fäzeswasser adipöser Probanden im Vergleich zu Gesunden</i>	95

5 DISKUSSION	97
5.1 LT97 KOLONADENOMZELLEN ALS MODELLSYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG CHEMOPRÄVENTIVER EFFEKTE IM KOLON	97
5.2 EINFLUSS VON APFELPOLYPHENOLEN AUF DIE MODULATION VON ENTGIFTUNGSENZYMEN	98
5.3 EINFLUSS VON APFELPOLYPHENOLEN AUF DIE MODULATION VON INDUZIERTEN DNA-SCHÄDEN	101
5.4 ABHÄNGIGKEIT DER CHEMOPRÄVENTIVEN EFFEKTE VON ALTER/ LAGERUNG UND DER ZUSAMMENSETZUNG DER KOMPLEXEN TESTSUBSTANZEN	104
5.5 CHEMOPRÄVENTIVE EFFEKTE AUSGEWÄHLTER POLYPHENOLMETABOLITE	106
5.6 CHEMOPRÄVENTIVE EFFEKTE DER FERMENTIERTEN TRUBFRAKTION EINES APFELSAFTES	109
5.7 EINFLUSS EINER APFELSAFTINTERVENTION AUF CHEMOPRÄVENTIVE EFFEKTE DES BIOMARKERS FÄZESWASSER	111
5.8 ZUSAMMENFASSENDEN SCHLUSSFOLGERUNGEN	118
5.9 AUSBLICK	120
6 ZUSAMMENFASSUNG	121
7 ABSTRACT	123
ANHANG	125
LITERATURVERZEICHNIS	VI

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Aufbau der Darmwand und Organisation der Kolonkrypten	2
Abb. 2:	Mehrstufenprozess der Kolonkarzinogenese	5
Abb. 3:	Mechanismen der Primär- und Sekundärprävention	10
Abb. 4:	Schema des „extrinsichen“ und „intrinsischen“ Apoptoseweges	17
Abb. 5:	Metabolisierungs- und Verteilungswege von Polyphenolen	21
Abb. 6:	Verlauf der <i>in vitro</i> -Simulation der humanen Magen-Darm-Passage	87
Abb. 7:	Einfluss der Fermentationsüberstände auf die Apoptoserate in LT97 Zellen	89
Abb. 8:	Übersichtsschema zum Studiendesign der Apfelsaftinterventionsstudien	91
Abb. 9:	Genotoxisches Potential der Fäzeswässer gesunder Probanden	92
Abb. 10:	Antigenotoxisches Potential der Fäzeswässer gesunder Probanden (Kurzzeit)	93
Abb. 11:	Einfluss der Fäzeswässer gesunder Probanden auf die <i>GSTT2</i> -Genexpression	94
Abb. 12:	Antigenotoxisches Potential der Fäzeswässer gesunder Probanden (Langzeit)	94
Abb. 13:	Einfluss der Fäzeswässer gesunder Probanden auf die Apoptoserate	95
Abb. 14:	Vergleich der Genotoxizität der Fäzeswässer gesunder/adipöser Probanden	96
Abb. 15:	Schematische Darstellung der Induktion von Phase II-Genen über <i>Nrf2</i>	100
Abb. 16:	Schematische Darstellung der Induktion von <i>COX-2</i> über <i>NFκB</i>	108

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Einteilung der Polyphenole, repräsentative Verbindungen und Verteilung in der Nahrung	19
Tab. 2:	Zusammensetzung des Probandenkollektivs der Apfelsaftinterventionsstudien	90
Tab. 3:	Zusammensetzung des Apfelsaftes/Kontrollgetränkes der humanen Interventionsstudien mit gesunden und adipösen Probanden	125
Tab. 4:	Polyphenolzusammensetzung des Apfelsaftes der humanen Interventionsstudien mit gesunden und adipösen Probanden	126
Tab. 5:	Ernährungsleitfaden für die Apfelsaftinterventionsstudien	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACF	Abberant Crypt Foci
AE	Apfelpolyphenolextrakt
AE[A]	AE original/frisch
AE[B]	AE gelagert
Ah	Aryl hydrocarbon
AOM	Azoxymethan
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor-1
APC	Adenomatous polyposis coli
ARE	Antioxidant responsive element
Arnt	Ah-receptor nuclear translocator protein
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma/leukemia-2
Bid	Bcl-2 homolog 3 interacting domain death agonist
BMI	Body Mass Index
CBG	Zytosolische β -Glucosidase
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CumOOH	Cumenhydroperoxid
Cyt C	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCC	Deleted in colon cancer
DISC	Death inducing signaling complex
DMH	Dimethylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EpRE	Electrophile responsive element
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FÜ	Fermentationsüberstand
FW	Fäzeswasser
GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
I κ B	Inhibitor kappa B
IKK	Inhibitor kappa B kinase
IL	Interleukin
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1

K-ras	Kirsten-rat sarcoma
LPH	Laktase-Phloridzin-Hydrolase
LPS	Lipopolysaccharid
Maf	V maf-musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAP	Mitogen activated protein
mRNA	Messenger RNA
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK	Negativkontrolle
N-ras	Neuroblastoma-rat sarcoma
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor 2
NSAID	Nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente
p53	Tumorprotein 53
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG	Prostaglandin
PhIP	N-Acetoxy-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridin
PIQOR	Parallel Identification and Quantification of RNAs
PK	Positivkontrolle
PS	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure
<i>real-time qRT-PCR</i>	quantitative <i>real-time</i> -Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SCFA	Kurzkettige Fettsäure (<i>short chain fatty acid</i>)
SMAD	Small mothers against decapentaplegic homolog
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPM	Synthetische Polyphenolmischung
tBid	Truncated Bid
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor
UDPGA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UGT	Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferasen
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family
XRE	Xenobiotic responsive element

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung des Kolonkarzinoms

1.1.1 Aufbau und Funktion des Dickdarms

Der Dickdarm gliedert sich in Caecum, die vier Abschnitte des Kolons *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens* sowie *Colon sigmoideum* und das Rektum ^[1]. Die Darmwand ist unterteilt in *Mukosa*, *Submukosa*, *Muskularis Propria* und *Serosa*, wobei sich die funktionelle Einheit des Darmes, die Darmkrypten - eine fingerartig eingestülpte Epithelzellschicht -, in der *Lamina propria* der *Mukosa* befindet (Abb. 1). Die Basis dieser Krypten bilden undifferenzierte, proliferierende Stammzellen, welche sich durch Zellteilung und Migration zur Kryptenspitze über die Progenitorzellen (Vorläuferzellen mit Stammzeleigenschaften und reversibel vorgegebener zukünftiger Funktionalität) ausdifferenzieren ^[2]. Zu den differenzierten, epithelialen Zelltypen in den Krypten gehören absorbierende Zellen (v. a. verantwortlich für die Absorption von Wasser und Ionen), Goblet Zellen (verantwortlich für die Mukusbildung und -sekretion), endokrine Zellen (Peptidhormonsekretierend) und die Paneth Zellen (enthalten eosinophile Granula und sekretieren antibakterielle Proteine) ^[3,1]. Daraus lassen sich auch die Aufgaben des Dickdarmes ableiten, zu denen die Rückresorption des Wassers, die Resorption von Elektrolyten sowie die Abwehr von Pathogenen zählen. Hinzu kommt die Metabolisierung von bisher unverdauten Nahrungsbestandteilen durch die Darmflora.

Die *Mukosa* ist in ständigem Kontakt mit unterschiedlichsten Metaboliten. Diese können endogener (z. B. Gallensäuren), exogener (z. B. heterozyklische Amine, N-Nitrosoverbindungen, polyzyklische Kohlenwasserstoffe) oder mikrobieller (z. B. Faecapentaene) Natur sein und je nach Ernährungsweise und Metabolisierungsweg auch karzinogenes Potential aufweisen ^[4]. Eine natürliche Barriere, auch gegen pathogene Mikroorganismen, ist die schwer durchdringbare Mukusschicht der Darmschleimhaut. Darüber hinaus bieten das darmeigene Immunsystem (*gut-associated lymphoid tissue*) in der *Mukosa*, die zelleigenen Abwehr- und Reparaturmechanismen des Darmepithels und die Darmflora einen zusätzlichen Schutz vor toxischen und karzinogenen Substanzen ^[5]. Nichtsdestotrotz sind „Lücken“ in der Abwehr und damit verbundene maligne Veränderungen der Zellen nie ganz auszuschließen.

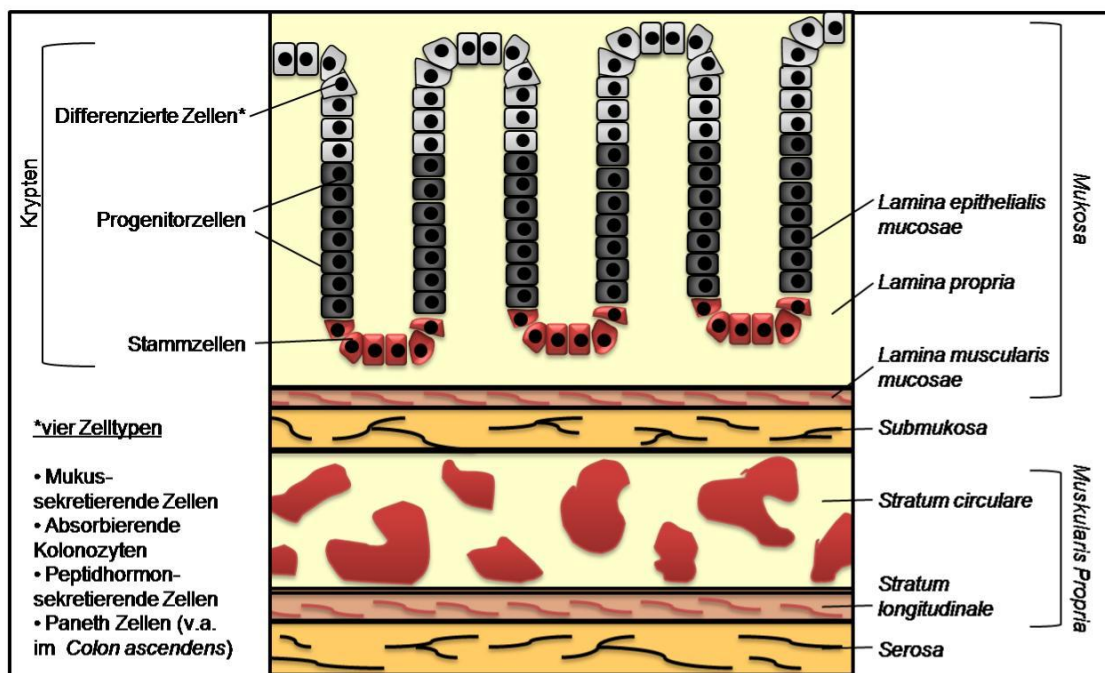


Abb. 1: Aufbau der Darmwand und Organisation der Kolonkrypten (modifiziert nach www.kim2.uniklinik-jena.de/Labor.html und ^[3])

1.1.2 Epidemiologische Grundlagen und Risikofaktoren für Kolonkrebs

Maligne Neubildungen von Geweben, gekennzeichnet durch unkontrolliertes Wachstum und Metastasierung, sind in Deutschland nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache ^[6]. Ursächlich dafür sind vor allem genetische aber auch epigenetische Veränderungen in den betroffenen Zellen. Normalerweise befinden sich Zellteilung und Zelltod im Gleichgewicht. Die Transformation kann allerdings einen Kontrollverlust über das Zellwachstum und die Replikationsprozesse zur Folge haben ^[7]. Mutationen, die für die Krebsentstehung verantwortlich sind, betreffen vor allem Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reparaturgene. Die Existenz dieser Gene wurde bereits 1914 durch Theodor Boveri postuliert ^[8,9]. Onkogene kodieren Proteine, die je nach Art als Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Proliferationssignale fungieren und in der Summe das Zellwachstum induzieren. Produkte der Tumorsuppressorgene zeigen gegensätzliche Effekte, wirken also der Zellteilung sowie dem Zellwachstum entgegen und leiten die Apoptose ein. Mutationen, einhergehend mit dem Aktivitätsverlust der Tumorsuppressorgene durch Repression und/oder einer gesteigerten Onkogenaktivität durch Überexpression, verursachen einen Wachstumsvorteil der betroffenen Zelle und fördern damit die Entstehung maligner Entartungen. Veränderungen in den Stabilitätsgenen, die in DNA-

Reparaturmechanismen wie die Basen-Exzisions-, die Nukleotid-Exzisions- und die Mismatch-Reparatur involviert sind, erhöhen die Mutationsrate in einer Zelle und begünstigen zusätzlich die Tumorgenese ^[10].

Nach Anand *et al.* werden 90 – 95 % aller Krebserkrankungen durch verschiedene Umweltfaktoren (z. B. Ernährungsfaktoren, Rauchen, hoher Alkoholkonsum, chronische Infektionen) verursacht ^[11]. Etwa 35 % aller Sterbefälle durch Krebs sind auf eine ungesunde Ernährungsweise zurückzuführen und wären damit auch vermeidbar ^[12]. In Deutschland ist nach Erkrankungen der Lunge bei Männern und der Brustdrüse bei Frauen Darmkrebs als zweithäufigste Krebserkrankung einzuordnen. So erkranken jährlich etwa 70.000 Menschen vor allem im fortgeschrittenen Alter an Kolon- und Rektalkrebs. Die häufigste Ursache für die Ausbildung von Kolontumoren stellen individuelle *Lifestyle*-Faktoren dar. Die typischen Ernährungsgewohnheiten einer so genannten *western style diet* repräsentieren mit etwa 70 % die größte Gruppe aller Faktoren, die mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko assoziiert sind ^[11]. Insbesondere der Verzehr von rotem sowie stark erhitztem Fleisch, die vermehrte Aufnahme von gesättigten Fettsäuren tierischen Ursprungs, aber auch ein erhöhtes Körpergewicht bei geringer physischer Aktivität werden als Risikofaktoren für Darmkrebs genannt. Daneben besteht möglicherweise auch eine Korrelation zwischen erhöhter Alkoholaufnahme und einem gesteigerten Kolonkrebsrisiko ^[13,14]. Eine, gegenüber der Normalbevölkerung, nahezu verdoppelte Erkrankungshäufigkeit weisen Verwandte 1. Grades (Eltern oder Geschwister) von Patienten mit Darmkrebs auf. Inwiefern Genveränderungen oder ein ähnlicher Lebensstil verantwortlich gemacht werden können, wurde allerdings bisher nicht abschließend geklärt ^[15].

Des Weiteren können genetische Prädispositionen zu Kolonkarzinomen führen. Dazu zählen unter anderem der APC I1307K Polymorphismus innerhalb bestimmter ethnischer Gruppen, die Juvenile Polyposis, das Peutz-Jeghers Syndrom, das Hyperplastische Polyposis Syndrom sowie die beiden am häufigsten auftretenden vererbaren Veränderungen - die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) ^[16]. FAP ist eine autosomal-dominant vererbare Erkrankung und betrifft ca. 1 % der Dickdarmkrebsfälle ^[17]. Verursacht wird FAP durch eine Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *Adenomatous polyposis coli* (*APC*). *APC* reguliert innerhalb des Wnt-Signalweges

(*Wingless-type MMTV integration site family*-Signalweg) die Phosphorylierung und damit Ubiquitylierung und Degradierung von β -Catenin im Proteasom. Ist *APC* mutiert, akkumuliert β -Catenin, transloziert in den Zellkern und aktiviert eine Reihe von Zielgenen (z. B. *c-jun*, *c-myc*, *Cyclin D1*). Dadurch wird die Proliferation, Differenzierung, Zellzykluskontrolle, Migration und das Apoptoseverhalten der Zellen beeinflusst und verändert^[18,19]. Bei betroffenen Patienten finden sich tausende Polypen im Dickdarm, die sich unbehandelt in nahezu 100 % aller Fälle zu malignen Tumoren entwickeln^[20].

Das durch Keimbahnmutationen in Mismatch-Reparaturgenen (wie das humane *MutS-Homologon 2* oder die humanen *MutL-Homologa 1* und *2*) verursachte HNPCC wird ebenfalls autosomal-dominant vererbt und lässt sich bei etwa 5 % aller Kolonkrebepatienten nachweisen^[16]. HNPCC, auch Lynch-Syndrom genannt, geht häufig mit Tumoren im Endometrium, Urogenitaltrakt, Magen, Dünndarm und den Eierstöcken einher^[21].

Für weniger als 1 % aller Kolonkrebsfälle können chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* oder *Morbus Crohn* verantwortlich gemacht werden^[22,23,24,13]. Allerdings ist die Datenlage hinsichtlich dieses Zusammenhangs eher kontrovers^[25]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass dauerhafte Entzündungserscheinungen in erhöhten Proliferationstätigkeiten der betroffenen Zellen resultieren. Außerdem generieren diese Zellen ebenso wie die an Entzündungsprozessen beteiligten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies^[26]. Die reaktiven Verbindungen können wiederum genetische Veränderungen bedingen, die denen in der Karzinogenese von sporadischem Kolonkrebs auftretenden ähneln, sich aber in ihrer Reihenfolge und Häufigkeit unterscheiden^[27]. Sporadische Formen der Kolonkarzinogenese sind häufig gekennzeichnet durch die zeitliche Abfolge von Veränderungen in den Genen *APC*, *K-ras* (*Kirsten-rat sarcoma*), *DCC* (*deleted in colon cancer*), *SMAD4* (*small mothers against decapentaplegic homolog 4*) und *p53* (*Tumorprotein 53*)^[28,29] (Abb. 2). Demgegenüber lassen sich Mutationen im *APC*-Gen in weniger als 33 % der *Colitis*-assoziierten Tumoren nachweisen^[30], wohingegen Veränderungen im Tumorsuppressorgen *p53* sehr häufig und vor allem zu Beginn der entzündungsbedingten Karzinogenese auftreten^[31,32,33].

1.1.3 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese

Tumorassoziierte Gene können direkt durch Mutationen in den entsprechenden Chromosomenabschnitten verändert werden. Der mehrstufige Entwicklungsprozess der Kolonkarzinogenese lässt sich vorwiegend über die Akkumulation somatischer Mutationen (Abb. 2) beschreiben und ist in Initiation, Promotion und Progression untergliedert ^[34,35].

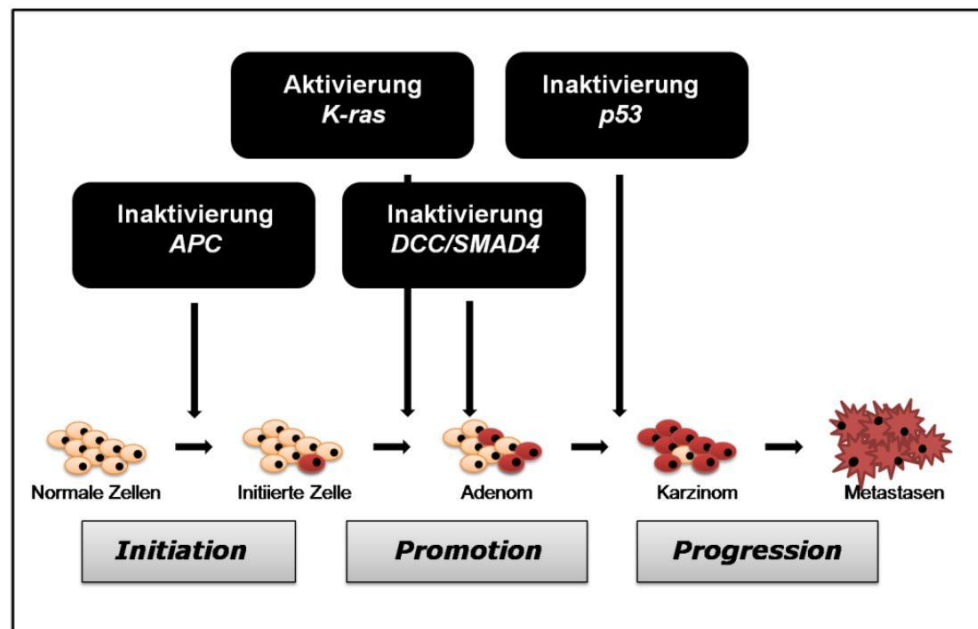


Abb. 2: Mehrstufenprozess der Kolonkarzinogenese unterteilt in die Entwicklungsstufen Initiation/Promotion/Progression und involvierte genetische Veränderungen im Verlauf der Transformation einer gesunden Zelle (modifiziert nach ^[36,37])

APC adenomatous polyposis coli; DCC deleted in colon cancer; K-ras Kirsten-rat sarcoma; p53 Tumorprotein 53; SMAD4 small mothers against decapentaplegic homolog 4

Die Initiation repräsentiert den ersten Schritt in der Tumorgenese und ist mit einer Mutation in der betreffenden Zelle verbunden. Wird diese Mutation nicht durch Reparatur oder Apoptose beseitigt, bedingt aber eine Induktion der Zellproliferation ^[38], so ist die Voraussetzung für die Weitergabe der genetischen Veränderung durch Teilung an die Tochterzellen gegeben. In der Promotionsphase, welche durch eine gesteigerte Proliferation gekennzeichnet ist, kommt es zur Ausprägung eines Adenoms ^[39]. Über die Anhäufung weiterer Mutationen in tumorrelevanten Genen kann das benigne Adenom in der folgenden Progressionsphase einen malignen Transformationsgrad erreichen. Die Zellproliferation ist nunmehr völlig unabhängig von externen Stimuli. Des Weiteren ist die Progression durch Veränderungen in den metabolischen und

morphologischen Eigenschaften der Tumorzellen sowie durch deren Invasions- und Metastasierungsverhalten gekennzeichnet ^[40].

Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC*, lokalisiert auf Chromosom 5q21 ^[41], spielen bei der Initiation der Kolonkarzinogenese sowohl sporadischer als auch vererbbarer Tumoren eine entscheidende Rolle ^[42]. Außerdem wird diskutiert, dass *APC* nicht universell als „Pfortner“ in der initiierten Phase verändert sein muss, sondern auch erst in der fortlaufenden Entwicklung zum Tragen kommen kann ^[43]. Ein Funktionsverlust von *APC* verhindert dessen Bindung an β -Catenin und führt über permanente Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer eingeschränkten Wachstumskontrolle der betroffenen Zelle. Mutationen im *APC*-Gen sind in etwa 85 % aller vererbaren und sporadischen Kolontumoren nachweisbar ^[44].

Mutationen und damit verbunden die Aktivierung des Proto-Onkogens *K-ras*, lokalisiert auf Chromosom 12q, treten gehäuft erst nach den Veränderungen im *APC* ^[28] und mit zunehmender Tumorgöße auf. Insgesamt lassen sich Mutationen in *Ras*-Genen in etwa 50 % aller Kolonadenome und -karzinome nachweisen ^[45]. Das *K-ras*-Gen kodiert ein membranständiges G-Protein, welches Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) binden kann. Im aktivierten, GTP-gebundenem Zustand interagiert Ras unter anderem mit der Proteinkinase Raf-1, die wiederum über Phosphorylierungsreaktionen weitere Signalwege wie die MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Kaskade und damit Transkriptionsfaktoren aktiviert. Aufgrund genetischer Veränderungen verliert Ras die GTP-Hydrolysefähigkeit. Dies ist mit einer dauerhaften Aktivierung des Signalweges verbunden und führt dadurch zur Stimulation der Zellproliferation und -transformation ^[46,47]. Zu einem weitaus geringeren Prozentsatz können in Kolontumoren auch weitere Mutationen in anderen Proto-Onkogenen wie *N-ras* (*Neuroblastoma-rat sarcoma*), *Myc* (Onkogen der Myelocytomatosis Virus-Familie) und *Myb* (Onkogen der Myeloblastosis Virus-Familie) detektiert werden ^[28].

Allelverluste im Chromosom 18q lassen sich in etwa 75 % der Kolontumoren nachweisen und betreffen vor allem die Tumorsuppressorgene *DCC* und *SMAD4* ^[48,49]. Es ist bekannt, dass *DCC* gebunden an Netrin-1, einem lamininartigen Protein, die MAP-Kinase Erk-1/2 aktiviert und damit das Zellwachstum kontrollieren kann. Zum anderen ist *DCC*, unabhängig von Netrin-1, in der Lage Apoptose via Caspase 9 zu induzieren (zusammengefasst durch ^[50]). Die aktuelle, unsichere Datenlage erschwert allerdings die Einschätzung, inwieweit eine *DCC*-Inaktivierung tatsächlich als kritischer

Faktor in der Karzinogenese angesehen werden kann. So konnten nicht alle Studien einen Zusammenhang zwischen verminderter Gen-^[51] und Proteinexpression^[52] von DCC und der Dickdarmkrebsprogression zeigen. Gotley *et al.* wiesen beispielsweise in malignen Proben quantitativ gleichwertige Expressionsspiegel an DCC wie in normalen, gesunden Geweben antikörperspezifisch nach^[53].

SMAD4 liegt in 30 % der Kolontumoren mutiert vor^[54]. Bei den SMAD-Proteinen handelt es sich um eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren und intrazellulären Signaltransmittern der TGF (*transforming growth factor*)- β -Zytokin-Superfamilie. Binden Liganden (z. B. TGF- β als wachstumshemmender Faktor) an einen TGF- β -Rezeptor Typ II dimerisiert dieser und phosphoryliert daraufhin den TGF- β -Rezeptor Typ I. Das Signal wird an die rezeptoraktivierten-SMADs (R-SMADs) weitergeleitet, indem diese am Serylrest phosphoryliert werden. Die so aktivierten R-SMADs bilden einen heterodimeren Komplex mit den zytoplasmatischen Co-SMADs (z. B. SMAD4), der in den Zellkern transloziert und mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression von wachstumshemmenden Genen induziert^[55,56]. Mutationen im *SMAD4*-Gen haben demnach eine gesteigerte Zellproliferation zur Folge.

Mutationen im kleinen Arm (p) des Chromosoms 17 sind in etwa 75 % aller Kolontumore zu finden. Der Verlust der Heterozygotie im *p53*-Tumorsuppressorgen, lokalisiert auf genanntem Chromosom, ist mit dem Übergang vom benignen Adenom zum malignen Karzinom verbunden^[48,57]. Das Proteinprodukt von *p53*, auch „Wächter des Genoms“ genannt, erkennt DNA-Schäden und arretiert den Zellzyklus in der G1-Phase. Dies geschieht über die Induktion des Cyclin-Kinase Inhibitors p21, welcher die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen kontrolliert^[58]. Die DNA wird damit der Reparatur zugänglich gemacht. Bei irreparablen Läsionen leitet *p53* die Apoptose indirekt über die Bax (*Bcl2-associated X protein*)-vermittelte Caspasenaktivierung ein^[59]. Eine Mutation in *p53* zeichnet sich durch einen Kontrollverlust über Zellzyklusprozesse und eine reduzierte Apoptoserate aus. Demzufolge wird die Zellproliferation beim Auftreten von DNA-Schäden nicht mehr blockiert und die Apoptose bei unzureichender Reparatur nicht eingeleitet. Durch die damit verbundene, zunehmende genomische Instabilität und Autonomie kann sich ein invasiver Tumor ausbilden^[60].

Neben der von Fearon und Vogelstein ^[36] postulierten linearen Adenom-Karzinom-Sequenz können zusätzlich ineinandergreifende Mechanismen zur Entstehung von Dickdarmkrebs beitragen.

Die genomische Instabilität, die zum einen die Chromosomen und zum anderen die Mikrosatelliten (repetitive, kodierende oder nicht-kodierende DNA-Sequenzen) betrifft, ist Voraussetzung für die Entwicklung eines Tumors ^[27]. Dabei ist die genomische Instabilität zu 85 % auf chromosomale Veränderungen wie die Aneuploidie (numerisch abweichender Chromosomensatz) zurückzuführen. Außerdem ist ein Verlust an chromosomalem Material (Verlust der Heterozygotie) häufig mit einer verminderten Funktionalität von Tumorsuppressorgenen verbunden ^[61].

Ursächlich für Mikrosatellitenveränderungen sind dagegen Mutationen in Mismatch-Reparatur-Genen. Dadurch können Basenfehlpaarungen während der Replikation nicht mehr eliminiert werden, wobei es nachfolgend zu einer zunehmenden Instabilität der Mikrosatelliten kommt. Dies betrifft vor allem Wachstumsfaktoren wie TGF- β ^[62,27], da diese innerhalb ihrer kodierenden Regionen kleine, instabile, sich wiederholende Nukleotidsequenzen aufweisen, welche anfällig für Replikationsfehler sind. Instabile Mikrosatelliten sind in 80 – 90 % der HNPCC-Krankheitsfälle nachzuweisen und fungieren somit als Marker des Lynch Syndroms ^[63]. Bei den sporadischen Formen treten diese Veränderungen erst in späteren Tumorstadien auf, wobei die Ursachen häufig in epigenetischen Vorgängen zu suchen sind, die letztlich zur Stilllegung der Gene führen können ^[64].

Zu den epigenetischen Veränderungen zählen DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen, welche die Genregulation beeinflussen ohne den Genotyp zu verändern. Der am häufigsten auftretende Mechanismus ist die Methylierung an CpG-Inseln in der Promotorregion oder im ersten Exon eines Gens. CpG-Inseln sind Anhäufungen von Cytosin-Guanin-Dinukleotiden. Erhöhte Methylierungsreaktionen (katalysiert durch DNA-Methyltransferasen) am Cytosin sind, aufgrund der resultierenden Stilllegung der Promotoraktivität, mit einer Hemmung der Genexpression verbunden ^[27]. Die Hypermethylierung von *MLH1*-Promotorbereichen (*MutL homolog 1*) scheint dabei für die Entstehung von Kolonkrebs eine besondere Bedeutung einzunehmen ^[65].

Acetylierungen, Phosphorylierungen oder Methylierungen an DNA-Histonen modifizieren den Kondensationsstatus der DNA und regulieren damit die

Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und Enzyme. Über diese epigenetischen Vorgänge werden neben der Expression von Proto-Onko- und Tumorsuppressorgenen auch die Expression von Genen der Zellzykluskontrolle, Zelladhäsion und DNA-Reparatur beeinflusst ^[66].

1.2 Chemoprävention von Kolonkrebs

1.2.1 Einführung in verschiedene Strategien und Ansatzpunkte

Die Epithelzellen des Kolons kommen ständig mit Karzinogenen aus der Nahrung und der Umwelt sowie mit exogenen Toxinen und pathogenen Keimen in Berührung ^[67]. Verglichen mit der Leber ist die Inaktivierungs- und Entgiftungskapazität des Kolons aber weitaus geringer ^[68]. Gemeinsam können diese Umstände zur Initiation der Krebsentstehung führen. Eine Steigerung der Abwehrmechanismen in den Zielzellen der Tumorgenese ist daher eine potentielle Möglichkeit zur Vermeidung von somatischen Mutationen und Bestandteil der Chemoprävention. Unter Chemoprävention versteht man die Inhibierung, Verzögerung oder Umkehrung karzinogener Prozesse unter Verwendung von pharmakologischen und natürlichen Verbindungen (einschließlich Nahrungsbestandteilen) ^[69]. Das bedeutet, dass neben der Vermeidung der Exposition mit potentiellen Kanzerogenen auch die Aufnahme protektiver Substanzen über die Ernährung der Entstehung von Krebserkrankungen entgegen wirken kann. Insbesondere für die Bestandteile pflanzlicher Nahrung wie Vitamine, Mineral- und Ballaststoffe sowie sekundäre Pflanzenstoffe werden chemopräventive Effekte postuliert ^[70]. Ihre Aufnahme soll zum einen die Initiation gesunder Zellen verhindern und zum anderen einer fortschreitenden Entartung der Zellen entgegenwirken. Nach Wattenberg können diese Verbindungen aufgrund ihrer divergenten Funktionalität hauptsächlich in zwei Kategorien, die *blocking agents* und die *suppressing agents*, eingeteilt werden. *Blocking agents* verhindern, im Rahmen der Primärprävention (Vermeidung der Krankheitsentstehung), die metabolische Aktivierung von Verbindungen und deren Interaktion mit Makromolekülen (z. B. DNA, RNA, Proteine) in der Zelle. Wird die Initiation nicht verhindert, besteht die Möglichkeit sekundärpräventiv über die *suppressing agents* einzugreifen. Diese inhibieren die Umwandlung und Weiterentwicklung einer bereits initiierten Zelle in maligne Formen. Dabei greifen sie vor allem in die Promotions- und Progressionsphase

der Tumorgenese ein ^[71,72]. Zugrundeliegende Mechanismen der Primär- und Sekundärprävention sind in Abb. 3 zusammengefasst dargestellt.

Über therapeutische Ansätze (Tertiärprävention) können schließlich charakteristische Eigenschaften stark transformierter Zellen wie das Invasions- und Metastasierungsverhalten blockiert werden ^[73].

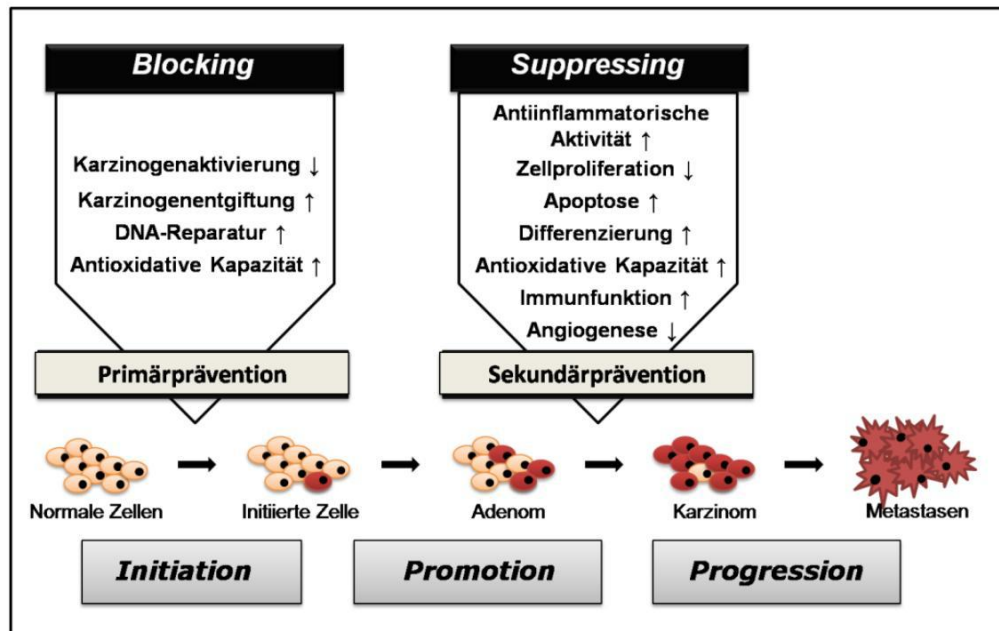


Abb. 3: Mechanismen der Primär- und Sekundärprävention im Verlauf der Karzinogenese ^[74,75]

(↑ Induktion; ↓ Reduktion)

1.2.2 Modulation von Enzymen der Biotransformation

Der menschliche Körper verfügt über ein komplexes Enzymsystem zur Entgiftung von Xenobiotika aus der Nahrung, aus Umweltgiften und Medikamenten sowie von endogen gebildeten, reaktiven Metaboliten. Die Endprodukte sind gegenüber dem Ausgangssubstrat meist hydrophiler und können letztendlich über die Niere oder Galle aus dem Körper eliminiert werden.

Die Biotransformation resultiert in der erleichterten Ausscheidung von lipophilen Komponenten aus der Zelle und findet hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Organen wie Darm, Niere und Lunge statt ^[76]. Sie vollzieht sich in der Regel stufenweise. Während der Phase I, der sogenannten Funktionalisierung, erfolgt die Anfügung oder Freilegung einer funktionellen Gruppe über Oxidations- und/oder Reduktionsreaktionen (z. B. Cytochrom-P₄₅₀-abhängige Monooxygenasen, Flavin-

abhängige Monooxygenasen, Cyclooxygenasen (COX), Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen) bzw. Hydrolysereaktionen (z. B. Esterasen, Amidasen, Glucuronidasen, Epoxidhydrolasen). Im Vergleich zu den Ausgangssubstraten entstehen dabei oft reaktivere Moleküle, die ohne weitere Metabolisierung mit den Makromolekülen der Zellen interagieren könnten^[77,78]. Deshalb wird in der folgenden Phase II die Konjugation der funktionellen Gruppe mit endogenen, hydrophilen Komponenten durch Transferasen katalysiert. Die wichtigsten Enzymsysteme der Phase II sind die Glutathion S- (GST), Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronosyl- (UGT) sowie Sulfo-, Acetyl- und Methyltransferasen^[79]. Der energieabhängige Transport der gebildeten Metabolite über ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*)^[80] wie z. B. *multidrug resistance*-Proteine^[81] aus der Zelle wird als Phase III bezeichnet.

Das Biotransformationssystem unterliegt intra- und interindividuellen Variationen und kann über die Aufnahme protektiver Substanzen, enthalten u. a. in Obst, Gemüse, Milch- und Vollkornprodukten, positiv beeinflusst werden^[78]. Innerhalb der Primärprävention und damit zur Vermeidung initialer Ereignisse ist die Modulierung der Expression von Enzymen der Biotransformation (Inhibierung der Phase I, Induktion der Phase II) durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe von großer Bedeutung.

1.2.2.1 Cyclooxygenasen

COX, auch Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen genannt, sind in die Phase I der Biotransformation involviert. Sie katalysieren hauptsächlich die ersten Schritte bei der Synthese von Prostaglandinen (PG) aus Arachidonsäure. Es werden zwei humane Isoformen unterschieden, die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1, COX-2)^[82], die membranintegriert im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und innerhalb der Kernhüllen lokalisiert sind^[83]. Das Ausgangssubstrat Arachidonsäure ist als Bestandteil der Membranphospholipide fest in die Zellmembran integriert, kann aber auch direkt mit tierischen Nahrungsmitteln zugeführt werden^[84]. Die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Plasmamembranen wird dabei durch die Phospholipase A2 katalysiert^[85]. Als bifunktionale Enzyme besitzen COX nicht nur Cyclooxygenase-, sondern auch Peroxidaseaktivität. Der initiale Schritt findet im hydrophoben Kanal im Inneren des Enzyms statt und umfasst die Bildung des instabilen PGG₂ durch die Oxidation von Arachidonsäure (Übertragung von zwei Molekülen Sauerstoff). Die folgende Reduktion zu PGH₂ (Übertragung von zwei Elektronen) erfolgt im

hämhaltigen, aktiven Zentrum (Fe^{3+} -Protoporphyrin IX) auf der Oberfläche des Enzyms^[82]. PGH_2 dient als Vorläufer für eine Reihe von strukturell ähnlichen Prostaglandinen, deren Bildung über gewebespezifische Prostaglandinsynthasen katalysiert wird^[86]. Neben der Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse (Modulation der Immunantwort, Schutz der gastrointestinalen Mukosa, Blutgerinnung) sind PGs auch in pathophysiologische Vorgänge (Entzündungen, Schwellungen, Schmerzen und Fieber) involviert. Die Vermittlung dieser Prozesse geschieht über G-Proteingekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche^[85].

COX-1 wird konstitutiv in gesunden Geweben exprimiert und kodiert für ein 68 kDa großes Protein. Es gilt als Haushaltsgen, da sich das Expressionsniveau durch exogene Stimuli kaum variieren lässt. Die wichtigsten Aufgaben der COX-1-Enzyme sind der Erhalt der basalen Gewebshomeostase, vor allem aber der Schutz der Magenmukosa^[87,88,89]. Demgegenüber ist mit Ausnahme des zentralen Nervensystems, der Niere und der Samenblase COX-2 in gesundem Gewebe kaum nachweisbar^[90].

Die *COX-2* ist ein *immediate early gene*, wird also innerhalb weniger Minuten nach der Stimulation kurzfristig transkribiert, und kodiert für ein 71 kDa großes Protein. Es weist eine 60 – 65 %ige Sequenzhomologie zu COX-1 auf, kann aber durch Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine und Tumorpromotoren induziert und durch Inhibitoren wie den klassischen nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAIDs) reprimiert werden^[91,92]. Eine Überexpression von COX-2 ist in etwa 40 % der Kolonadenome und in über 80 % der Kolonkarzinome nachweisbar. Deshalb ist zu vermuten, dass eine veränderte Expression von *COX-2* und damit die COX-2-abhängigen inflammatorischen Prozesse eine entscheidende Rolle in der Kolonkarzinogenese spielen^[91,92]. Insbesondere das während der Prostaglandinbiosynthese entstehende PGE_2 begünstigt durch seine Proliferations-, Migrations-, Invasions- und Angiogenese-fördernden Eigenschaften das Wachstum und Fortbestehen von transformierten Zellen^[93]. Die direkte Verminderung der COX-2-Aktivität durch die Aufnahme COX-2-selektiver Inhibitoren korreliert signifikant mit einer Risikoreduzierung an Kolonkrebs zu erkranken^[94]. Einen möglichen Ansatz zur Prävention der Krebsentstehung bzw. zur Verhinderung maligner Entartungen stellt daher die COX-2-Inhibierung durch natürliche Nahrungsmittelinhaltsstoffe dar.

1.2.2.2 UDP-Glucuronosyltransferasen

Die UGTs, eine Enzymfamilie der Phase II der Biotransformation ^[95], katalysieren hauptsächlich die kovalente Bindung aktivierter Glucuronsäure (UDPGA), aber auch anderer Glycosylgruppendonatoren (Glucose, Xylose, Galaktose) an lipophile Verbindungen ^[96]. Humane UGTs lassen sich in vier verschiedene Familien (UGT1, UGT2, UGT3 und UGT8) einteilen. Ein Großteil der Enzyme, vor allem die der Familien 1 und 2, sind an der Entgiftung von endogenen und exogenen Substanzen beteiligt ^[96]. Wichtige endogene Substrate sind Steroidhormone, Bilirubin und Gallensäuren, die vorzugsweise von Enzymen der Familie UGT2 metabolisiert werden. Zu den exogenen Verbindungen, die einer Glucuronidierung hauptsächlich durch Isoformen der UGT1-Familie unterliegen, zählen Steroide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, biogene Amine sowie eine Reihe von Arzneistoffen (Antidepressiva, NSAIDs) ^[97,98]. Die UGT-Enzyme werden in der Leber, aber auch in Darm, Niere, Lunge, Prostata, Haut und Gehirn exprimiert ^[99]. Sie sind C-terminal in der Membran des ER verankert, wobei sich der aktive N-Terminus im Inneren des ER befindet. Die Metabolisierung der membrangängigen Substrate findet dementsprechend im Inneren des ER statt. Das benötigte Kosubstrat UDPGA wird dafür im Antiport mit UDP-N-Acetylglucosamin ins ER-Lumen transportiert ^[100].

Innerhalb der Genfamilie 1 ist nur eine Subfamilie (UGT1A) bekannt, wohingegen die Genfamilie 2 die Subfamilien UGT2A und UGT2B umfasst. Die Isoformen von UGT1A entstehen durch differentielles Splicen aus einem einzigen Gen, welches auf dem Chromosom 2q37 lokalisiert ist ^[101,102]. Das Exon 1 kodiert dabei Isoenzym-spezifisch für das N-terminale Ende des Enzyms, welches sich im Lumen des ER befindet und die Substratspezifität festlegt. Die Exons 2 bis 5 sind für alle Enzyme der 1A Familie einheitlich ^[103]. Demgegenüber stehen Mitglieder der Genfamilie 2, die ausnahmslos von verschiedenen Genen auf Chromosom 4q13 kodiert werden ^[104]. Für beide Genfamilien wurden Pseudogene beschrieben. Ihre Funktionsuntüchtigkeit ist auf Deletionen, Nonsense-Mutationen oder fehlerhafte TATA-Boxen in den Promotorregionen zurückzuführen, aufgrund dessen die Proteinbiosynthese verhindert oder abgebrochen wird ^[101,103].

Untersuchungen verweisen auf einen inversen Zusammenhang zwischen der Expressionsrate von UGT-Enzymen und dem Kolonkrebsrisiko. Die Mehrheit der UGT1A-Isoenzyme wird, wenn auch nur in geringem Maße, im Kolon exprimiert. *UGT1A7*, *UGT1A8* und *UGT1A10* kommen ausschließlich in extrahepatischen

Gewebe vor und sind auch vermehrt im Kolon nachweisbar ^[68]. In einer Studie von Giuliani *et al.* konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur gesunden Dickdarmmukosa die UGT1A-Expression in transformiertem Gewebe reduziert war ^[105]. Außerdem scheinen UGT-Polymorphismen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zu haben. So konnte eine signifikant inverse Korrelation zwischen der Expression von *UGT1A6* sowie *UGT1A7* und Kolonkrebs nachgewiesen werden ^[106,98].

Eine transkriptionelle Induktion der UGTs und die damit verbundene gesteigerte Enzymaktivität könnten demnach die Suszeptibilität gegenüber Risikofaktoren vermindern.

1.2.2.3 Glutathion S-Transferasen

Die GSTs sind Enzyme einer Multi-Genfamilie, die über einen nukleophilen Angriff größtenteils an Entgiftungsreaktionen beteiligt sind, aber mitunter auch substanzabhängig eine Bioaktivierung verursachen. Sie katalysieren die Konjugation elektrophiler Substrate mit Glutathion (GSH), einem Tripeptid aus γ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin ^[107] und damit den initialen Schritt zur Bildung eines Mercaptursäurederivates. Dieses wird größtenteils auf renalem, aber auch auf biliärem Weg aus dem Körper geschleust ^[108]. In Abhängigkeit ihrer Struktur, ihren enzymatischen Eigenschaften und ihrer Lokalisation in der Zelle werden die GSTs in drei verschiedene Familien (zytosolisch, mitochondrial, mikrosomal) eingeteilt, die sich wiederum in entsprechende Klassen und deren Isoformen untergliedern. Für die dimeren, zytosolischen Enzyme werden sieben Klassen (Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega und Zeta) mit insgesamt 16 Isoformen beschrieben. Die mitochondriale Klasse Kappa umfasst lediglich ein einziges Isoenzym. Mikrosomale GSTs treten häufig als Trimere auf, kommen aber auch als Mono- oder Dimere vor. Sie werden den Unterklassen I, II und IV zugeordnet und sind vor allem an der Eicosanoidsynthese und in geringerem Maß an Entgiftungsreaktionen beteiligt ^[109,110]. Mit Ausnahme der mikrosomalen GSTs handelt es sich um lösliche Enzyme, die im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommen und etwa 4 % aller löslichen Proteine in der Leber ausmachen ^[111].

Die Theta-Klasse ist bezüglich ihres Einflusses auf das Krebsrisiko im Menschen eine sehr interessante GST-Klasse. Man differenziert zwei Isoformen, GSTT1 und GSTT2,

die auf demselben Abschnitt des Chromosoms 22q11.2 kodiert sind, aber nur 55 % Sequenzhomologie aufweisen und sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden ^[112,113]. GSTT1 katalysiert die Konjugation von GSH an epoxidhaltige Moleküle, Phospholipid- und t-Butylhydroperoxide ^[114,115,116]. Demgegenüber besitzt GSTT2 eine hohe Affinität gegenüber den meisten Lipidperoxidprodukten, einigen Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels, den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Cumenhydroperoxid (CumOOH) und weiteren synthetischen Hydroperoxiden ^[117,118,119,120]. Die Identifizierung der spezifischen Substrate erfolgte teilweise nur für die Theta-GSTs der Ratten, wobei sich aufgrund der Sequenzhomologien von bis zu 80 % ähnliche Substratspezifitäten für den Menschen vermuten lassen ^[121]. Sowohl GSTT1 als auch GSTT2 besitzen neben der Funktion als Glutathion-Transferase zusätzlich Peroxidase- und die GSTT2 außerdem noch Sulfataseaktivitäten ^[114,122].

Die Azetylsalizylsäure ist in der Lage beide Isoformen der Theta-Klasse im Dickdarm von Ratten zu induzieren. Deshalb wird vermutet, dass die Antitumorwirkung von NSAIDs nicht nur über die Hemmung der Prostaglandinbildung, sondern auch über die Aktivierung der Phase II der Biotransformation vermittelt wird ^[123].

Der Zusammenhang zwischen der Expression von *GSTT1* bzw. *GSTT2* und dem Kolonkrebsrisiko kann über die Auswirkungen von Polymorphismen verdeutlicht werden. So sind erwiesenermaßen der GSTT1-Null-Genotyp (gekennzeichnet durch eine fehlende Aktivität des Enzyms) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden ^[124]. Auch sind sogenannte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in der *GSTT2*-Promotorregion und des daraus resultierenden defizitären Expressionsspiegels an *GSTT2* mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko assoziiert ^[125]. Demnach kann der Induktion dieser Phase II-Enzyme im Rahmen der Chemoprävention von Kolonkrebs eine besondere Bedeutung zugeschrieben werden.

1.2.3 Induktion von apoptotischen Prozessen

Während seiner Untersuchungen an Ratten mit akuten Leberschäden beschrieb John F. R. Kerr schon in den 60er Jahren eine ihm unbekannt Form des Zelltodes und prägte den Begriff *shrinkage necrosis* (etwa: „schrumpfende Nekrose“), der später von ihm in *apoptosis* umbenannt wurde ^[126]. Die Apoptose ist ein evolutionär erhaltener Prozess des programmierten Zelltodes, der als Regulator des Zellwachstums und zur

Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Situationen ausgelöst werden kann ^[127].

Eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen, spielen als Effektormoleküle in apoptotischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie werden als inaktive Zymogene synthetisiert und können auf vielfältige Weise aktiviert werden: (a) über die proteolytische Spaltung von Peptidbindungen am Aspartatrest durch vorgelagerte, aktive Caspasen unter Zusammenlagerung von je zwei kleinen und großen Spaltprodukten (Caspase-Kaskade), (b) über Kreuzaktivierung durch Aggregation mehrerer Pro-Caspasen und (c) über die Bildung von Holoenzymen mit rekrutierten Kofaktoren ^[128,129]. Dabei erfolgt die Initiation apoptotischer Prozesse entweder über die Ligandenbindung an Todesrezeptoren der Plasmamembran („extrinsischer“ Weg) oder über den mitochondrialen, „intrinsischen“ Weg (Abb. 4).

Todesrezeptoren (z. B. CD95-Rezeptor, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Rezeptor) gehören zur *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptor-Familie und sind durch eine cysteinreiche, extrazelluläre Domäne und eine zytoplasmatisch lokalisierte Todesdomäne zur Signalübertragung charakterisiert. Die Bindung spezifischer Liganden (z. B. TNF α , TRAIL, CD95) resultiert in einer Trimerisierung des Rezeptors und ermöglicht die Rekrutierung von Adaptermolekülen (TNF-Rezeptor-assoziierte Proteine, TRADD); Fas-assoziierte Proteine, FADD) mit eigener Todesdomäne ^[130]. FADD veranlasst die Anlagerung der Pro-Caspase 8, die durch diese Oligomerisierung im DISC (*death inducing signaling complex*) autokatalytisch gespalten und damit aktiviert wird ^[131]. Die Weiterleitung des proapoptotischen Signals bis hin zu den Effektorcaspasen erfolgt über die Caspase-Kaskade.

Demgegenüber kann der „intrinsische“ Weg der Apoptose beispielsweise durch DNA-Schäden in der Zelle ausgelöst werden. DNA-Schäden führen über den Transkriptionsfaktor *p53* zur gesteigerten Expression von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (*B cell lymphoma/leukemia-2*) wie *Bcl-2-antagonist/killer* (Bak), Bax und *Bcl-2 homolog 3 interacting domain death agonist* (Bid) ^[132], wobei letzteres durch die Caspase 8 erst zum aktiven *truncated Bid* (tBid) gespalten werden muss ^[133]. Diese Proteine realisieren die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, was die Freisetzung von Cytochrom C und weiteren apoptosefördernden Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma zur Folge hat. Die Komplexbildung von Cytochrom C mit 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP) und dem *apoptotic*

peptidase activating factor-1 (Apaf-1) ist die Voraussetzung für die Bindung der Pro-Caspase 9 und deren Autoaktivierung unter Bildung des sogenannten Apoptosoms. Das Apoptosom ist über die Caspase 9 für die Aktivierung der Effektorcaspasen verantwortlich ^[134]. Die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7) führen zur Repression der DNA-Reparatur, zur Aktivierung proteolytischer Enzyme und sind selbst auch am Abbau des Zytoskeletts sowie der Kernmembranen beteiligt ^[127].

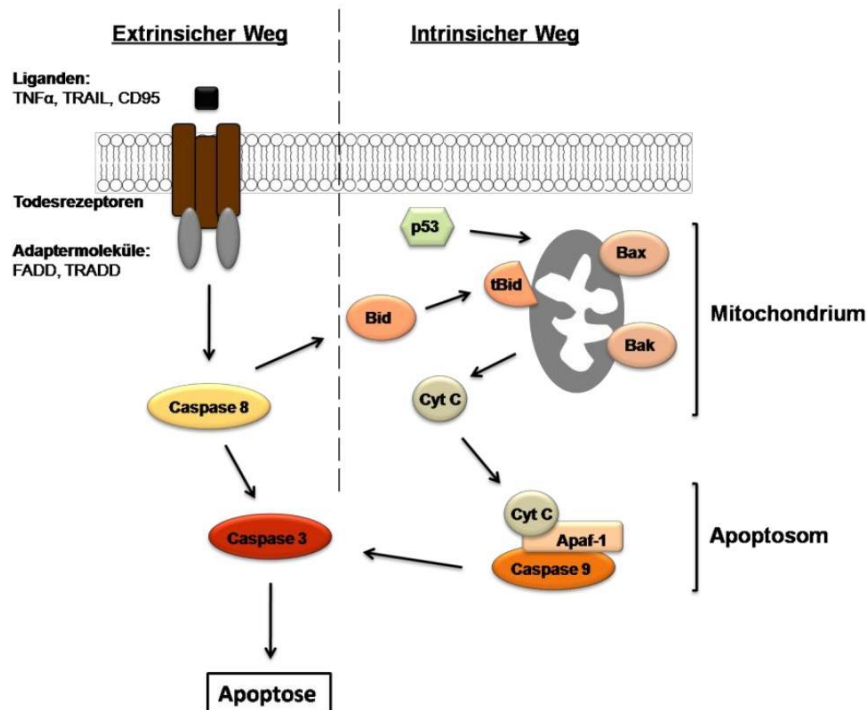


Abb. 4: Schema des „extrinsischen“ (Todesrezeptor-vermittelten) und „intrinsischen“ (Mitochondrien-vermittelten) Apoptoseweges (Modell nach ^[135])

Apaf-1 apoptotic peptidase activating factor-1; Bak Bcl-2-antagonist/killer; Bax Bcl-2-associated X protein; Bid BH3 interacting domain death agonist; Cyt C Cytochrom C; FADD Fas-associated protein with death domain; p53 Tumorprotein 53; TNF tumor necrosis factor; TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor; TRADD TNFRSF1A-associated via death domain; tBid truncated Bid

Durch eine Induktion der Apoptose lassen sich entartete Zellen eliminieren und darüber das unkontrollierte Wachstum und die Ausbildung maligner Tumore verhindern. Folglich stellt die Aktivierung der Apoptose durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe ein wichtiges Ziel der sekundären Chemoprävention dar.

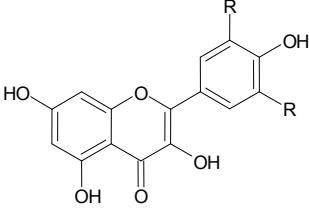
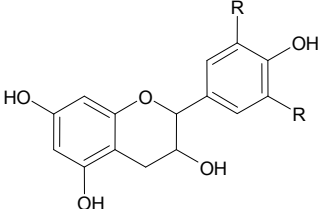
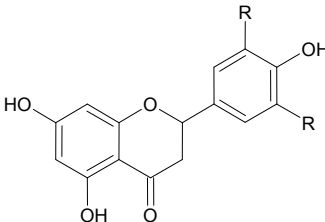
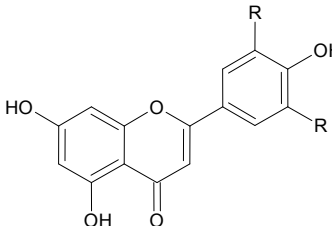
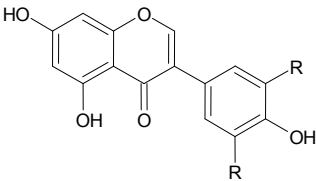
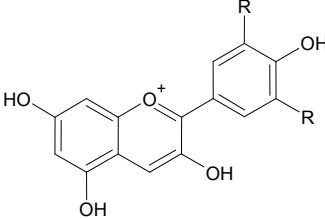
1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe – Polyphenole

Polyphenole sind Verbindungen mit mindestens zwei, direkt am aromatischen Ring gebundenen Hydroxylgruppen, die vor allem in den Randschichten von Obst, Gemüse und Getreide vorkommen. Sie werden im Sekundärstoffwechsel der Pflanze gebildet und haben damit keinerlei Einfluss auf die primäre Entwicklung und das Wachstum der Pflanze. Vielmehr verleihen sie ihr den typischen Geruch, die Farbe und den Geschmack ^[136]. Außerdem schützen sie vor UV-Licht und Infektionen und fungieren als Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde ^[137]. Doch sie dienen nicht nur dem Schutz der Pflanze, sondern können, in Abhängigkeit der Zufuhrmenge und der Beschaffenheit des Polyphenols, auch für den Menschen protektive Eigenschaften aufweisen. Insbesondere aufgrund ihrer starken antioxidativen Kapazität wird den Polyphenolen in einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Studien ein antikanzerogenes Potential zugesprochen (zusammengefasst durch ^[138]). Allerdings erweist sich die Bewertung von krebspräventiven Nahrungsinhaltsstoffen häufig als sehr schwierig. Dies ist nicht zuletzt darin begründet, dass infolge der Komplexität eines Lebensmittels oft keine Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einer bestimmten Substanzklasse möglich sind. Um die Relevanz für die Humansituation einzuschätzen zu können, sind deshalb vergleichende *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen mit isolierten Extrakten und dem komplexen Lebensmittel von großer Bedeutung.

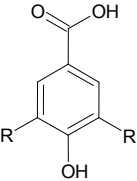
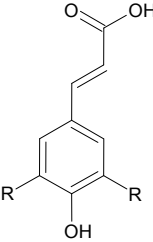
1.3.1 Einteilung und Vorkommen

Polyphenole sind primär in Früchten und daraus hergestellten Säften, in Gemüse und Getränken (Tee, Kaffee, Bier, Wein), aber auch in Nüssen und Getreideprodukten enthalten. Bisher wurden mehr als 8000 Verbindungen beschrieben, die in zehn verschiedene Klassen einzuordnen sind ^[139]. Die Einteilung in die beiden Hauptklassen aller mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole (Flavonoide, 30 % und Phenolkarbonsäuren, 60 %), die Molekülstrukturen sowie repräsentative Verbindungen und die relevanten Nahrungsquellen sind in Tab. 1 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 1: Einteilung der Polyphenole, repräsentative Verbindungen und Verteilung in der Nahrung ^[140,141,139,138]

Klasse	Subklasse	Grundstruktur	Verbindungen	Nahrungsquelle
Flavonoide	Flavonole		Quercetin, Myricetin, Rutin, Kaempferol	Rotwein, Tee, Äpfel, Zwiebeln, Broccoli, Tomaten, Lauch
	Flavanole		Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechingallat	Rotwein, Tee, Schokolade, Äpfel, Bohnen, Kirschen, Aprikosen
	Flavanone		Hesperidin, Naringinin, Neohesperidin	Orange, Grapefruit
	Flavone		Apigenin, Luteolin, Chrysin	Sellerie, Petersilie, Thymian
	Isoflavone		Daidzein, Genistein	Sojabohnen, Hülsenfrüchte
	Anthocyanidine		Cyanidin, Malvidin, Delphinidin, Petunidin	Rotwein, Kirschen, Erd-, Brom-, Blau-, Johannisbeeren, Rotklee

Tab. 1 Fortsetzung

Klasse	Subklasse	Grundstruktur	Verbindungen	Nahrungsquelle
Phenolcarbon-säuren	Hydroxy-benzoensäuren		Gallussäure	Rotwein, Schwarzer Assam-Tee
	Hydroxy-zimtsäuren		Kaffeesäure, Chlorogensäure, Ferulasäure, Sinapinsäure	Kaffee, Rotwein, Tee, Kakao, Äpfel, Olivenöl, Reis, Hafer, Senfsaat

1.3.2 Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Polyphenolen

Über eine ausgewogene Ernährung können täglich etwa 1 g Polyphenole aufgenommen werden ^[137]. Im Duodenum werden Polyphenol- und Matrix-abhängig nur geringe Mengen (5 – 10 %) absorbiert, wobei maximale Flavonoid-Plasmakonzentrationen von 1 µM 1 – 2 h nach Verzehr von Lebensmitteln zu verzeichnen sind ^[142,143]. Bis zu 95 % der aufgenommenen Polyphenole erreichen in freier oder konjugierter Form das Kolon ^[143], wo sie einer mikrobiellen Fermentation unterliegen. Die Polyphenolkonzentration im Darmlumen nach Aufnahme von 300 ml Wein wird beispielsweise auf 3 mM geschätzt ^[144]. In einer Humanstudie von Kahle *et al.* konnten nach Aufnahme von einem Liter trübem Apfelsaft bis zu 33 % eines niedermolekularen Polyphenols sowie über 90 % der oligomeren Procyanidine in den Ileostomieproben der Probanden wiedergefunden werden ^[145,146], was erste Hinweise auf die tatsächlichen Gehalte im Dickdarm gibt. Abb. 5 veranschaulicht mögliche Metabolisierungs- und Verteilungswege der aufgenommenen Polyphenole im menschlichen Organismus.

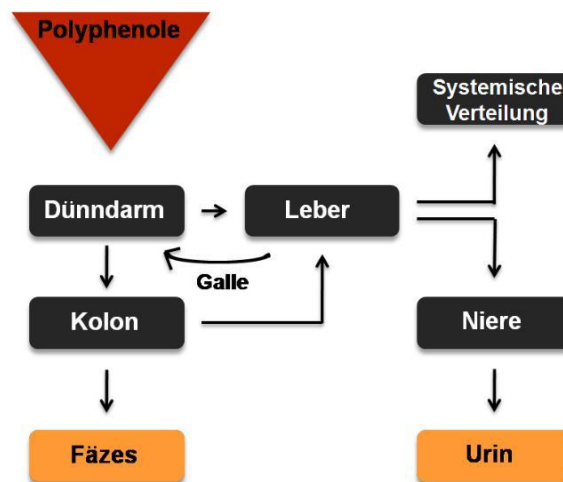


Abb. 5: Metabolisierungs- und Verteilungswege von Polyphenolen (Modell nach ^[142])

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen variiert mit der zugehörigen Klasse und der damit verbundenen chemisch vorliegenden Struktur. Des Weiteren spielen Matrixeffekte der Nahrung eine entscheidende Rolle. In Lebensmitteln liegen die Phenolsäuren vielfach verestert mit organischen Säuren, Zuckern oder Lipiden vor, die aufgrund mangelnder körpereigener Esterasen erst durch mikrobielle Tätigkeiten im Kolon metabolisiert werden ^[147]. Ähnlich verhält es sich mit den Flavonoiden, die mit Ausnahme der Flavanole in glycosylierter Form vorliegen. Dadurch weisen sie eine starke Hydrophilie auf, so dass sie die Bürstensaummembran des Dünndarmes, bis auf einige Quercetinglycoside, nicht passieren können ^[148]. Die Deglycosylierung erfolgt mittels Laktase-Phloridzin-Hydrolasen (LPH) bzw. durch zytosolische β -Glucosidasen (CBG), die in der Nahrung selbst enthalten oder in den Zellen der Dünndarmmukosa synthetisiert werden. LPH sind membrangebundene Enzyme im Bürstensaum des Dünndarms und katalysieren hauptsächlich die Hydrolyse von Laktose, aber auch die Abspaltung von Glucose aus Phloridzin. β -Glucosidasen weisen demgegenüber eine breite Substratspezifität auf und kommen vor allem in Leber, Niere und Dünndarm vor ^[149]. Das Monosaccharid Rhamnose, gebunden an ein Polyphenol, repräsentiert kein Substrat der humanen β -Glucosidasen. Eine aktive Spaltung findet daher erst über β -Glucosidasen mikrobiellen Ursprungs nach Erreichen des Dickdarms statt ^[142]. Die Polyphenole unterliegen nach Absorption im Dünndarm einer Konjugation in Form von Methylierungs-, Sulfatierungs- und Glucuronidierungsreaktionen ^[140]. Catechol-*O*-Methyltransferasen (COMT), mit dem höchsten Expressionsniveau in Leber und Niere, katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin an z. B.

Quercetin, Catechin und Kaffeesäure ^[142,150]. Phenol-Sulfotransferasen (SULT) ermöglichen das Anheften eines Sulfatrestes von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat an eine Hydroxylgruppe des Polyphenols in der Leber ^[151]. Die Polyphenole selbst können aber auch die Aktivität dieser Transferasen hemmen. Ein Beispiel hierfür ist die Wirkung von Quercetin auf die SULT1A1 ^[152]. Die weitaus am häufigsten stattfindende Konjugationsreaktion wird, unter Bildung eines Polyphenol-Glucuronids, von UGTs der UGT1A-Familie vor allem in der Leber, aber auch in den Enterozyten des Darms selbst und in der Niere katalysiert ^[153,142]. Insgesamt ist der Metabolisierungsweg immer von der Art des Polyphenols und von der aufgenommenen Konzentration abhängig. So bewirken beispielsweise hohe Polyphenoldosen eine Verlagerung von den generell bevorzugten Sulfatierungsreaktionen hin zu Glucuronidierungen ^[154]. Durch die Glucuronidase-Aktivität der Leber können die Glucuronide wieder gespalten werden und biliär über den enterohepatischen Kreislauf als Aglyca, aber auch in methylierter und/oder sulfatierter Form in das Kolon gelangen ^[155]. Dort unterliegen sie einer zusätzlichen katalytischen und hydrolytischen Umsetzung durch die Mikroflora. Neben der Dekonjugierung und der Hydrolyse von Zuckerresten katalysieren die Mikroorganismen auch die Spaltung der Polyphenole in kleine, einfach strukturierte Verbindungen (z. B. phenolische Säuren). Die Exkretion dieser Metabolite erfolgt über den Fäzes und nach Resorption auch über den Urin ^[137].

1.3.3 Mikrobielle Polyphenolmetabolite und Fäzeswasser als Biomarker

Die mikrobiellen Abbauprodukte der Polyphenole bedürfen besonderer Beachtung, da sie im Gegensatz zu den unmetabolisierten, intakten Polyphenolen nach Aufnahme polyphenolreicher Nahrung in weitaus höheren Konzentrationen im Dickdarm bzw. in den Fäzes vorzufinden sind ^[156]. Polyphenole werden in der Regel durch die intestinale Mikroflora zu Derivaten der Phenylelessigsäure, Phenylpropionsäure und Benzoesäure abgebaut ^[157].

Durch Inkubationsversuche von Polyphenolen mit humanen Mikroorganismen konnte eine Reihe von Abbauprodukten charakterisiert werden. *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus*, *Enterococcus casseliflavus* und *Eubacterium ramulus* weisen β -Glucosidase- bzw. β -Rhamnosidase-Aktivitäten auf und bewirken damit die Hydrolyse von Flavonoidglycosiden wie z. B. des Quercetin-3-O-Rhamnosids ^[158,159,160]. Die folgende Reduktion der Doppelbindung am

heterozyklischen C-Ring des Flavonoids kann genau wie die hydrolytische Ringöffnung durch *Eubacterium ramulus* oder *Clostridium orbiscindens* erfolgen. Es entstehen aus Quercetin, teilweise über weitere Zwischenschritte, die Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (ES) und das Phloroglucinol, wobei letzteres in Anwesenheit von Glucose weiter zu Butyrat und Acetat abgebaut werden kann^[156,161,162]. Wie der Abbauweg von Quercetin sind auch die Metabolisierungsschritte der Chlorogensäure durch Bakterientätigkeiten bekannt. Die Spaltung der Esterbindung zwischen Kaffee- und Chinasäure resultiert aus der Esteraseaktivität der Bakterien *Escherichia coli*, *Bifidobacterium lactis* und *Lactobacillus gasseri*^[163]. Über die Reduktion der Doppelbindung von Kaffeesäure entsteht anschließend 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (PS)^[159].

Die mikrobiellen Abbauprodukte können im Dickdarm selbst protektive Effekte entfalten oder aber nach Resorption in der Leber dehydroxyliert und/oder β -oxidiert werden. Durch anschließende Glycinierung werden Hippursäurederivate gebildet, die renal ausgeschieden und als finale Produkte des Metabolismus von Catechinen, Chlorogensäure und Quercetinglycosiden beschrieben werden^[164,159].

Die mikrobiellen Metabolite der Polyphenole (wie die Benzoessäure-, die Phenylpropion- und die Phenyllessigsäurederivate) können nach Aufnahme von polyphenolreichen Lebensmitteln auch in Fäzes wiedergefunden werden^[165,159]. Als Biomarker der Exposition reflektiert der humane Stuhl in seiner Komplexität die aufgenommene Nahrung, deren Metabolisierungswege während der Verdauung und den mikrobiellen Umsatz. Die Zellen des Kolonepithels stehen in direktem Kontakt zur Fäzesmatrix und sind dadurch kontinuierlich potentiell kanzerogenen Substanzen^[4], aber auch antikanzerogenen, protektiven Verbindungen (z. B. kurzkettige Fettsäuren [SCFA]) ausgesetzt^[166]. Deshalb bildet die Untersuchung von Fäzes bzw. von durch Ultrazentrifugation gewonnenem Fäzeswasser (FW) als Biomarker des Effekts, aber auch der individuellen Exposition eine ideale Möglichkeit zum einen das Dickdarmkrebsrisiko und zum anderen Mechanismen der Prävention von Dickdarmkrebs zu untersuchen^[167,168]. FW zur Endpunktmessung findet aufgrund der guten Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit als nicht-invasive Methode in Assoziationsstudien Anwendung. Dabei kann der Zusammenhang zwischen den Ernährungsgewohnheiten und dem Krebsrisiko beurteilt werden^[169,170].

1.3.4 Polyphenole des Apfels

Äpfel sind in Deutschland das beliebteste Frischobst (Zentrale Marketinggesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft, CMA). Mit 0,1 bis 10 g Polyphenolen pro kg Frischfrucht liefern sie in Abhängigkeit von Apfelsorte, Reife, Anbaugebiet, Jahrgang und Lagerbedingungen einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an Polyphenolen innerhalb der menschlichen Ernährung ^[137]. Dabei befinden sich im Vergleich zum Fruchtfleisch die höheren Gehalte in der Schale ^[171,172]. Das Polyphenolprofil von Äpfeln ist gut untersucht und für alle Sorten nahezu identisch. Die Gehalte variieren allerdings sortenabhängig beträchtlich. Die wichtigsten Polyphenole des Apfels sind die Flavane (71 – 90 %), Hydroxyzimtsäuren (4 – 18 %), Flavone (1 – 11 %), Dihydrochalkone wie das Phloridzin (2 – 6 %) und in rotschaligen Äpfeln auch die Anthocyanidine (1 – 3 %) ^[173]. Neben dem Verzehr der Früchte ist ebenso der daraus hergestellte Saft mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von über 9 l/Jahr der beliebteste Fruchtsaft in Deutschland ^[174,175]. Zwischen den Säften und der Frischware gibt es allerdings erhebliche Unterschiede im Polyphenolmuster und -gehalt. Aufgrund technologischer Verarbeitungsschritte werden in den Säften deutliche Einbußen an phenolischen Verbindungen verzeichnet. Dafür verantwortlich sind beispielsweise die Phenol-Oxidase-Aktivität sowie Oxidationsprozesse während der Pressung und dem Zermahlen der Früchte. Des Weiteren führen Schönungs- und Filtrationsprozesse zu klaren Apfelsäften unvermeidlich zum Verlust an Polyphenolen ^[176,172]. Auch verbleiben häufig Polyphenole aus den festen Bestandteilen des Apfels (Schale und Gehäuse) im Trester zurück ^[177]. Trotzdem sind sortenabhängig noch Polyphenolkonzentrationen von bis zu 180 mg/l für Säfte aus Tafeläpfeln bzw. bis zu etwa 1 g/l für Säfte aus „alten“ Apfelsorten nachzuweisen, wobei für Granny Smith die niedrigsten und für Boskoop die höchsten Gehalte detektiert werden konnten ^[178].

1.3.5 Apfelpolyphenole und mikrobielle Abbauprodukte als potentielle chemopräventive Agenzien

Sowohl Kohorten- als auch Fall-Kontroll-Studien belegen eine inverse Beziehung zwischen der Aufnahme von Obst und Gemüse und der Inzidenz an Kolonkrebs zu erkranken (^[179] und zusammengefasst durch ^[180]). Demgegenüber stehen aber vor allem jüngere Untersuchungen, die diesen Zusammenhang nicht mehr oder nur teilweise bestätigen konnten ^[181,182,183,184]. Nachweisbar scheint hingegen die inverse Korrelation zwischen der Apfel- bzw. Apfelsaftaufnahme und dem Kolonkrebsrisiko.

Barth *et al.* untersuchten in zwei voneinander unabhängigen Studien den Einfluss von Apfelinhaltsstoffen auf die Entstehung von Tumoren im Dickdarm ^[185,186]. Das präventive Potential wurde im Rattenmodell bestimmt, wobei 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) zur Induktion der Kolonkarzinogenese genutzt wurde. DMH bewirkt nach intraperitonealer Injektion die Entwicklung intestinaler Tumore und ruft damit vergleichbare Läsionen hervor, wie sie beim Menschen während der Entwicklung sporadischer Entartungen auftreten. Im Rahmen der ersten Interventionsstudie wurde den Tieren einmal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen DMH injiziert, wobei die Gabe der Testsubstanzen (klarer bzw. trüber Apfelsaft, Wasser als Kontrolle) täglich erfolgte. Es zeigte sich, dass eine Intervention mit trübem Apfelsaft die DMH-induzierten DNA-Schäden in den isolierten Mukosazellen des distalen Kolons, aber auch die Ausbildung sogenannter *Aberrant Crypt Foci* (ACF), mögliche Vorstufen von Adenomen und Karzinomen, signifikant reduzierte. In der zweiten, darauffolgenden siebenwöchigen Intervention wurden neben den Apfelsäften auch die bioaktiven Komponenten des Apfelsaftes getestet. Dabei konnte die Aufnahme der Polyphenolfraktion, der Trubfraktion oder einer Kombination aus beiden die DMH-induzierte Hyperproliferation hemmen und DNA-Schäden tendenziell minimieren. Allerdings waren diese Effekte in ihrer Intensität nicht mit dem des trüben Apfelsaftes vergleichbar. Eine Studie von Gossé *et al.* machte deutlich, dass vor allem den Procyanidinen des Apfels möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Prävention von Kolonkrebs zugeschrieben werden kann ^[187]. So konnte durch die Gabe einer Procyanidin-reichen Fraktion die durch Azoxymethan (AOM)-induzierte Ausbildung von ACF im Rattenmodell signifikant um 50 % reduziert werden.

Neben den Erkenntnissen im NagermodeLL gibt es ebenso Hinweise auf präventive Effekte des ApfelverzehrS im Menschen. In einer Fall-Kontrollstudie von Deneo-Pellegrini *et al.* konnte sowohl für Frauen als auch für Männer eine inverse Beziehung zwischen der Aufnahme von Äpfeln und dem Dickdarmkrebsrisiko festgestellt werden ^[188]. Auch verweist die Auswertung einer Reihe von Fall-Kontroll-Studien aus Italien auf ein reduziertes Erkrankungsrisiko bei einer Aufnahme von ≥ 1 Apfel/Tag ^[189]. Ferner bestätigt zudem die *Nurses' Health Study* den protektiven Effekt eines hohen Apfelkonsums ^[190]. Dabei korrelieren die Menge an täglich verzehrten Äpfeln und die Inzidenz von kolorektalen Karzinomen invers ^[191,192].

2 ZIEL- UND PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Basierend auf der Beliebtheit des Apfels in Deutschland und dessen potentiell präventiven Potentials bezüglich der KolonkrebSENTSTEHUNG förderte auch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) das Netzwerkprojekt „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmkrankheiten und Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung“. Insgesamt wurden deutschlandweit neun Teilprojekte mit der Aufgabe betraut, die gesundheitsfördernde und präventive Wirkung von Apfelinhaltsstoffen, mit Hauptaugenmerk auf den sekundären Pflanzenstoffen, auf maligne und entzündliche Darmerkrankungen zu untersuchen (www.nutrition-net.org). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen galt es, zugrundeliegende Wirkmechanismen der Chemoprävention *in vitro* zu identifizieren, um damit potentielle Effekte aus Tier- und Humanstudien zu erklären.

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Modulation von zellulären Entgiftungssystemen durch Apfelpolyphenole und ausgewählte Darmfermentationsprodukte in humanen Kolonzellen. Besondere Berücksichtigung fand dabei das Phase II-Enzym GSTT2. Daneben sollte der Einfluss genannter Testsubstanzen auf weitere Mechanismen der Chemoprävention wie die Induktion apoptotischer und die Reduktion entzündlicher Prozesse eine Rolle spielen.

Folgende Aspekte sollten im Zuge dessen Beachtung finden:

- Zunächst sollte der Einfluss eines aus Apfelsaft isolierten Polyphenolextraktes (AE) auf die Genexpression tumorrelevanter Gene mittels cDNA-Arrays in humanen Kolonadenomzellen (LT97) ermittelt werden (**Publikation I**).
- Im Weiteren wurden die erfassten Expressionsänderungen Fremdstoff-metabolisierender Gene (UGTs und GSTs) Isoenzym-spezifisch analysiert und verifiziert (**Publikation I**).
- Einen besonderen Schwerpunkt bildeten Untersuchungen zur GSTT2 (**Publikation II, Publikation III und Publikation IV, zusätzliche Ergebnisse**). Die Beurteilung funktioneller Konsequenzen einer veränderten Genexpression von *GSTT2* durch Apfelinhaltsstoffe erfolgte dabei über die Bestimmung des Potentials zur Reduktion induzierter DNA-Schäden.

- Darüber hinaus wurde der Einfluss von Lagerbedingungen und Alter eines AE auf dessen Zusammensetzung und auf chemopräventive Effekte in LT97 Zellen untersucht (**Publikation III**).
- Untersuchungen mit einer synthetisch hergestellten Polyphenolmischung (SPM) sollten, im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Original- und dem gelagerten Extrakt, Aufschluss über potentiell bioaktive Komponenten im AE geben (**Publikation III**).
- Zur besseren Annäherung an die *in vivo*-Situation im Kolon sollten relevante Polyphenolmetabolite [3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (PS) und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (ES)] hinsichtlich einer Modulation der Genexpression und Aktivität von GSTT2 untersucht werden (**Publikation IV**).
- Als Risikofaktor für die Entstehung von Kolonkrebs sollte weiterhin die Modulation der COX-2 und damit indirekt auch der COX-2-abhängigen Entzündungsprozesse durch die Polyphenolmetabolite Gegenstand dieser Arbeit sein (**Publikation IV**).
- Bedingt durch den hohen Procyanidin- und Ballaststoffgehalt sollte des Weiteren eine aus trübem Apfelsaft isolierte Trub-Fraktion untersucht werden. Die Unlöslichkeit der Testsubstanz in allen für die Zellkultur gängigen Lösungsmitteln setzt eine vorherige *in vitro*-Simulation der Magen-Darm-Passage voraus. Mit dem nach Zentrifugation gewonnenen Fermentationsüberstand wurde die Wirkung auf die Expression verschiedener Fremdstoff-metabolisierender Gene in LT97 Zellen ermittelt. Darüber hinaus galt es, die Induzierbarkeit der Apoptose zu beleuchten (**zusätzliche Ergebnisse**).
- Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen zum Einfluss einer Intervention mit trübem Apfelsaft in gesunden und zusätzlich in adipösen Probanden. Das Interesse lag dabei auf den *ex vivo*-Effekten von vor und nach der Interventionsphase isolierten FW in LT97 Zellen (**zusätzliche Ergebnisse**).

3 PUBLIKATIONEN

3.1 Publikation I: Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells.

Veeriah Selvaraju, Miene Claudia, Habermann Nina, Hofmann Thomas, Klenow Stefanie, Sauer Julia, Böhmer Frank-D., Wölfl Stefan, Pool-Zobel Beatrice L.

International Journal of Cancer, 2008, 122(12):2647-55.

Der Apfel, das von der Mehrheit der Deutschen favorisierte Obst, ist eine gute Polyphenolquelle. Polyphenole sind in der Lage, Mechanismen der Karzinogenese zu beeinflussen und damit chemopräventiv zu wirken. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Modulation von v. a. Genen der Biotransformation durch einen Apfelpolyphenolextrakt (AE) in LT97 Kolonadenomzellen durchgeführt. Dies geschah zunächst im Vergleich zweier Array-Plattformen (SuperArray[®] und PIQORTM-Microarray), die sich in der Anzahl der gespotteten Gene (SuperArray[®] mit 96 Biotransformationsgenen; PIQOR-Array mit 300 Genen aus den Kategorien Biotransformation, Stress- und Signaltransduktion, Apoptose, Tumorsuppression, Zellzyklusregulation und -arrest, sonstige) unterschieden. Die Expressionsänderung ausgewählter, durch AE regulierter Phase II-Gene (*GSTP1*, *GSTT2*, *GSTA4*, *UGT1A1* und *UGT2B7*) konnte anschließend mittels *real-time qRT-PCR* verifiziert werden. Des Weiteren wurde die Gesamtzymaktivität der GSTs und UGTs durch den AE induziert.

Die damit verbundene Verbesserung der Entgiftungskapazität durch Apfelpolyphenole könnte eine gesteigerte Abwehr gegenüber endogenen und exogenen Kanzerogenen in den Kolonozyten gewährleisten.

Eigenanteil:

- Zellkultur, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, Genexpressionsuntersuchungen mittels *real-time qRT-PCR*
- Durchführung der Enzymaktivitätsassays
- Statistische Auswertung, Interpretation und Darstellung der eigenen Ergebnisse

Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells

Selvaraju Veeriah¹, Claudia Miene¹, Nina Habermann¹, Thomas Hofmann¹, Stefanie Klenow¹, Julia Sauer¹, Frank Böhmer², Stefan Wölff³ and Beatrice Louise Pool-Zobel^{1*}

¹Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany

²Institute of Molecular Cell Biology, Medical Faculty, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany

³Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

Apples contain significant amounts of flavonoids that are potentially cancer risk reducing by acting antioxidative or antiproliferative and by favorably modulating gene expression. The purpose of this study was to investigate whether polyphenols from apples modulate expression of genes related to colon cancer prevention in preneoplastic cells derived from colon adenoma (LT97). For this, LT97 cells were treated with effective concentrations of apple extracts (AEs). RNA was isolated and used for synthesis and labeling of cDNA that was hybridized to cDNA-arrays. Gene expression studies were performed using a commercial cDNA-array from Superarray[®] that contains a limited number of genes (96 genes) related to drug metabolism, and a custom-made cDNA microarray that contains a higher number of genes (300 genes, including some genes from Superarray) related to mechanisms of carcinogenesis or chemoprevention. Real-time PCR and enzyme activity assays were additionally performed to confirm selected array results. Treatment of cells with AE resulted in 30 and 46 genes expressed over cut-off values (≥ 1.5 - or ≤ 0.7 -fold) in Superarray and custom array, respectively. Of 87 genes spotted on both arrays, 4 genes (*CYP3A7*, *CYP4F3*, *CHST7*, *GSTT2*) were regulated with similar directional changes. Expression of selected phase II genes (*GSTP1*, *GSTT2*, *GSTA4*, *UGT1A1*, *UGT2B7*), regulated on either array, was confirmed by real-time PCR. The enzyme activities of glutathione *S*-transferases and UDP-glucuronosyltransferases were altered by treatment of LT97 cells with AE. The observed altered gene expression patterns in LT97 cells, resulting from AE treatment, points to a possible protection of the cells against some toxicological insults.

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: apple polyphenols; colon cancer chemoprevention; gene expression; LT97 cells; microarray

Colon cancer is among the most common types of epithelial malignancies in both genders, affecting the Western world and most probably related to dietary habits.¹ Although debatable, it is thus a promising expectation that changes in diet, such as the frequent consumption of fruits and vegetables with high contents of polyphenols and flavonoids, may reduce the risk of developing carcinoma of the colon.² One mechanism is thought to occur through the composition of the luminal environment that may alter the expression of genes in the intestinal epithelium and thus, directly influence disease. Experimental studies have shown that selected polyphenolic compounds can affect cellular processes that are important for cancer development. For instance, *in vitro* studies with colorectal cancer cell lines have demonstrated that flavonoids (*e.g.*, quercetin, phloretin) are able to inhibit cell proliferation, induce cell differentiation and apoptosis and enhance anti-inflammatory responses.^{3,4} The chemopreventive properties of various flavonoid compounds also have been found to include the induction of carcinogen detoxifying systems,⁵ interaction with cellular signaling pathways and modulation of gene expression.⁶

Apples have significant amounts of polyphenolic compounds⁷ and are an important source of flavonoids in peoples' diets in the United States of America and Europe.⁸ Effective absorption of the apple polyphenols from the mammalian colon has been shown *in vivo* and *in vitro*.^{9,10} Other than antioxidative effects¹¹ and their ability to scavenge carcinogens, the apple polyphenols may be chemoprotective by affecting molecular events in the initiation, promotion and progression stages of carcinogenesis.¹² A variety

of cellular effectors have been recognized as targets for actions of apple flavonoids as well. One recent *in vitro* study has shown that polyphenolic procyanidins from apples can increase the expression of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), activity of caspase-3, inhibit G2/M phase cell cycle arrest and suppress protein kinase c (PKC) in SW620 cells.¹³ The epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, that plays an important role in the regulation of cell proliferation, was substantially inhibited by a polyphenol-rich apple extract (AE).¹⁴ On the other hand, the *PTRJ* gene, encoding the protein-tyrosine phosphatase DEP-1, a candidate tumor suppressor with antiproliferative activity in colon epithelial cells, was induced upon cell treatment with apple polyphenols.¹⁵ Interestingly, AE can significantly reduce the DNA strand breakage and the proliferation of rat colon cells isolated from animals pretreated with dimethylhydrazine (DMH).¹⁶ Another *in vivo* rat study showed that intervention with apple procyanidins reduced the number of aberrant crypt foci (ACF) and preneoplastic lesions initiated by azoxymethane (AOM).¹³ However, the molecular bases of the chemopreventive effects of flavonoids, in general, and of apple flavonoids, in particular, are poorly understood.

Gene expression studies using microarrays can yield important information on the mechanisms of how dietary components may influence colorectal carcinogenesis. We have reported previously that a HT29 colon carcinoma cell line treated with AE differentially modulated the expression of several genes associated with the process of chemoprevention.⁴ We, therefore, proposed that the upregulation of chemoprevention-related genes, especially those involved on phase II metabolism such as, glutathione *S*-transferases (GSTs) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) could potentially reduce the availability of carcinogens to the healthy colonic mucosa, thereby preventing the carcinogen from acting directly on the tissue. In support of this proposal, now it was of high interest to explore the effect of AE on gene expression in preneoplastic colon cells that are not tumorigenic. Therefore in this study, we have used as target cells a recently established human colon adenoma (LT97) cell line, which represents preneoplastic lesions.¹⁷ We sought to identify genes specifically related to mechanisms of carcinogenesis or chemoprevention using cDNA

Abbreviations: ACF, aberrant crypt foci; AE, apple extract; AOM, azoxymethane; BPDE, benzo[a]pyrene diol epoxide; Cum-OOH, cumene hydroperoxide; DMH, dimethylhydrazine; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase-1/2; GSTs, glutathione *S*-transferases; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; HT29, human colon carcinoma cell line; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LT97, human colon adenoma cell line; 4MU, 4-methylumbelliferone; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; PKC, protein kinase c; UGTs, UDP-glucuronosyltransferases.

Grant sponsor: Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany; Grant number: FKZ.01EA0103.

*Correspondence to: Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutritional Sciences, Friedrich-Schiller-University Jena, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany. Fax: +49-3641-949672.

E-mail: b8pobe@uni-jena.de

Received 8 June 2007; Accepted after revision 8 November 2007

DOI 10.1002/ijc.23440

Published online 19 March 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

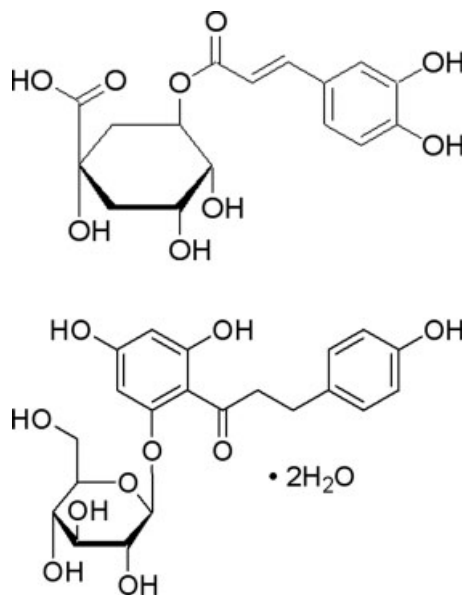


FIGURE 1 – Chemical structures of some major polyphenolic compounds identified in apples.

microarrays, which allow the simultaneous detection of expression of a high number of genes.¹⁸

First, cDNA microarray analysis of AE (128 $\mu\text{g/ml}$) treated LT97 cell line was performed using a commercially available cDNA array membrane (SuperArray[®], Frederick, MD) which, however, contained only a limited number of genes (96 human drug metabolism genes) and the analysis of more of the relevant target genes of interest would have necessitated the use additional arrays. Therefore, a more focused, custom-made cDNA microarray (PIQOR[™], Memorec, Germany) was designed that was spotted with 300 human genes involved in distinct pathways of carcinogenesis. It was commercially produced (Miltenyi Biotec, Köln, Germany) according to our selection of the genes that was based on (i) functionality of the gene products in chemoprevention or carcinogenesis and (ii) expression levels in the numerous cell systems used in our laboratory. The baseline expression levels had previously been determined with Superarray membranes in several types human colon,¹⁹ breast²⁰ and prostate²¹ cells, and it was the aim of this study to assess the modulation of their expression in LT97 cells treated with AE.

Material and methods

Apple polyphenols extract

The AE was produced as has been described before⁴ and was kindly provided by Dr. Frank Will and Prof. Dr. Helmut Dietrich (Institute for Oenology and Beverage Research, Geisenheim, Germany). An aliquot was used for analysis of individual polyphenol ingredients. Chlorogenic acid and phloridzin (found exclusively in apples, see Fig. 1) were identified as the major polyphenols in the AE.⁴ Other aliquots were needed for determining biological properties in the colon cells.

Cell line and culture conditions

The human colon adenoma cell line LT97 was established from colon micro adenomas of a patient with Familial Adenoma Polyposis coli¹⁷ and were kindly provided by Prof. Brigitte Marian (Institute of Cancer Research, University of Vienna, Vienna, Austria). The LT97 cell line was cultured as previously described,¹⁹ but instead of 2.5 U/ml PenStrep, 10 mg/ml Gentamicin (Invi-

trogen GmbH, Karlsruhe, Germany) was used. The cells between passages 21 and 32 were used for the experiments described here.

Cell treatment and RNA extraction

Cell proliferation assays had been previously conducted to determine effective concentration ranges of the apple polyphenol extract in LT97 cells. The studies showed that AE concentrations of 128 and 255 $\mu\text{g/ml}$ reduced cell numbers to 93 and 83%, respectively, after treatment for 24 hr. Prolonged treatment resulted in pronounced loss of numbers of cells compared to the medium control after 72 hr to 82 and 71%, respectively.²² The effect of apple polyphenol extract on cell-cycle phases will be analyzed by flow cytometric methods and the results will be published in a later manuscript, together with data on modulation of apoptosis by the extract. In the present study, these 2 concentrations were used to test if there were any differences in biological effects on gene expression and enzyme activities. The LT97 cells were sub-cultured in the T25 flask (Falcon, UK). Seventy-two hours later, cells were treated with 128 and 255 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of AE for 24 hr. LT97 cells were harvested by incubation with EDTA-PBS, and then resuspended in 5 ml of medium. After centrifugation, the cell pellet was resuspended and washed once with ice-cold PBS (pH 7.4). Total RNA from these cells was isolated using a RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). RNA was checked for stability and DNA contamination by gel electrophoresis. The purity of RNA samples was determined based on the ratio of spectrophotometric absorbance of the sample at 260 nm to that of 280 nm (A260/A280) using a NanoDrop ND-1000 photometer (Wilmington, DE). Only RNA samples with A260/A280 ratio ≥ 1.8 were used for further experiments.

Superarray[®] analysis

The Superarray system (SuperArray) was utilized to compare the relative levels of mRNA expressed in LT97 cells with or without AE treatment (128 $\mu\text{g/ml}$). The Superarray (Cat No. HS-011-N) contained 96 spotted genes probes related to drug metabolism. cDNA synthesis, probe preparation and hybridizations to the array were done, as previously described in quadruplicate.⁴ For each set of quadruplicates, the mean value for each gene was determined and used to calculate the fold-changes (treatment *versus* medium control). Using cut-off criteria, a 1.5-fold induction or a 0.7-fold repression in expression were considered to be of biological importance.

Custom-made cDNA microarray analysis

In addition to the drug metabolism related genes, it was of interest to also analyze a broader range of genes involved in additional mechanisms of carcinogenesis or chemoprevention. This was done using a customized cDNA-array system (Miltenyi Biotec, Germany) spotted with 300 genes belonging to 9 functional categories, namely: (i) phase I metabolism, (ii) phase II metabolism, (iii) phase III metabolism, (iv) phase II gene regulation pathway, (v) stress and signal transduction pathway, (vi) apoptosis signaling pathway, (vii) tumor suppressor genes, (viii) cell cycle arrest/regulation of cell cycle and (ix) miscellaneous (several functions). The total RNA prepared for Superarray analysis was 3-years-old and therefore, the new batch of total RNA was isolated from LT97 cells treated with AE (128 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. First-strand cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA with a primer incorporating a T7-RNA polymerase promoter. After second-strand cDNA synthesis (Invitrogen GmbH), cRNA amplification was performed with RNA polymerase (Ambion, Cambridgeshire, UK). Subsequently, the cRNA was used as template to prepare labeled cDNAs with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Labeled cDNAs were hybridized to the custom cDNA-arrays overnight at 65°C by following the manufacturer's instructions.

TABLE I – PRIMER SEQUENCES FOR REAL-TIME PCR, PRIMERS DESIGNED BY USING PERLPRIMER V1.1 SOFTWARE

Locus ID	Gene name	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Primer name	Primer sequences 5' to 3'
NM_000854	<i>GSTT2</i>	142	60–63	iGSTT2_F iGSTT2_R	tgacactggctgatctcatggcc gcctcctggcatagctcagcac
NM_000852	<i>GSTP1</i>	149	60–63	iGSTP1_F iGSTP1_R	ctgcgatgctgctggcagatc ttggactggtacagggtgaggtc
NM_001512	<i>GSTA4</i>	131	56–60	iGSTA4_F iGSTA4_R	cggatggagtccgtgagatgg ccatgggcactgttggaacagc
NM_000463	<i>UGT1A1</i>	145	57–60	iUGT1A1_F iUGT1A1_R	tcatgctgacggacccttcc ctggcagctagagaatgg
NM_007120	<i>UGT1A4</i>	131	57–60	iUGT1A4_F iUGT1A4_R	ccggatggagtccgtgagatgg ccatgggcactgttggaacagc
NM_001074	<i>UGT2B7</i>	230	64.2–65	iUGT2B7_F iUGT2B7_R	taattgcatcagccctggccc gttgatcggcaacaatggaatc
NM_002046	<i>GAPDH</i>	110	62–65	iGAPDH_F iGAPDH_R	accactcctccaccttggac tccaccacctgttgcgtgag

Primer pairs were verified by normal PCR with gene specific amplicons.

Preprocessing of custom array data

Slides were scanned by GenePix[®] 4000B microarray scanner and preprocessing of the custom arrays data was carried out using GenePix Pro v6.0 software (Molecular Devices, Union City). Experiments were independently reproduced 4 times, and the average intensity of each set of probes was used for normalization based on the *GAPDH* gene. The differential gene expression was analyzed by using the same cut-off value (≥ 1.5 - or ≤ 0.7 -fold change) as described for the Superarray analysis, and changes in genes of interest were confirmed by real-time PCR analysis.

Quantification of mRNA levels by real-time PCR

The relative differences in expression levels of selected genes of interest (*GSTT2*, *GSTP1*, *GSTA4*, *UGT1A1*, *UGT1A4* and *UGT2B7*) were evaluated by real-time PCR using the iCycler iQ[®] (Bio-Rad GmbH München, Germany) system. First-strand cDNA probes were prepared as reported previously.⁴ The real-time PCR experiments were performed with gene specific primers (Table I). A standard curve was generated for each run using cDNA-templates to determine the PCR amplification efficiency of the target and of an endogenous reference. Each experiment was independently repeated 3 times, with each sample run in duplicate each time. The relative mRNA expression levels of targets genes were calculated as previously described.⁴

Total GST and UGT enzyme activity assays

LT97 medium (control) and AE (128 and 255 $\mu\text{g/ml}$, 24 hr) treated cells were washed with PBS, and harvested with 5 mM EDTA in PBS and the cytosol was extracted as previously described.²³ Total GST enzyme activity was determined using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as a substrate according to the procedure of Habig *et al.*²⁴ Enzyme activities were normalized to total cytosolic protein measured according to the Bradford method.²⁵ Mean enzyme activities for AE-treated cells were calculated, and the fold-induction enzyme activities determined by taking a ratio of AE-treated enzyme activities to the controls.

UGT enzyme activity was determined with 4-methylumbelliferone (4MU, 50 μM) as a substrate in 96-well microtiter plates as described previously by Collier *et al.*²⁶ The rate of UGT activity was determined by the 4MU-dependent, fluorescent reduction during 4MU-glucuronidating activity. The microsomal proteins were prepared as described by Collier *et al.*, cells were resuspended with homogenization buffer (0.1 M Tris, 2 mM Pefabloc, pH 7.8) followed by ultrasonification and centrifugation (9,000 g, 20 min, 4°C). 105 μl of 4MU, 30 μl homogenization buffer, 30 μl of microsomal proteins was added to the reaction mixture, and reactions were started by the addition of 20 μl of UDPGA (0.2 M) in a final volume of 155 μl . Blank controls for each experiment were incubated in the presence of assay buffer (0.1 M Tris-HCl, 5 mM

MgCl₂, 0.05% BSA, pH 7.4) instead of microsomal proteins. Using a microtiter plate reader (SpectraFLUOR Plus, Tecan, Austria) readings were obtained at Ex/Em 360/465 nm for 60 min at 5 min intervals, at 37°C. Mean specific enzyme activities were calculated from the slope and the fold-inductions were calculated by taking a ratio of the values obtained for AE-treated LT97 cells and for the medium controls.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad[®] Prism software Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego) and Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, WA), based on the mean values of independently reproduced experiments. All experiments performed *in vitro* were repeated at least 3 times, unless otherwise indicated. Significant differences between treatment and control values were determined by the 2-tailed student *t*-test and 1-way ANOVA with Bonferroni's post-test. The values of $p \leq 0.05$ were taken to be statistically significant.

Results

Effects of apple flavonoids on gene expression in LT97 cells (Superarray analysis)

For Superarray array analysis resulted in, there was no statistically significant ($p \leq 0.05$, *t*-test) regulation of genes in LT97 cells in response to treatment with AE. However, on the basis of the evaluation criteria (≥ 1.5 - or ≤ 0.7 -fold), the analysis revealed an increased expression for 30 genes of the 96 spotted sequences after 24-hr treatment with AE (Table II). Twenty-five of the thirty altered genes belonged to the phase II genes and included major detoxifying enzyme systems of GSTs family (7 genes, *GSTA3*, *GSTM5*, *GSTP1*, *GSTT2*, *MGST1*, *MGST2*, *MGST3*). Also 5 acetyltransferase genes (*CRAT*, *DLAT*, *HAT1*, *NAT1*, *NAT5*), 5 sulfotransferase genes (*CHST5*, *CHST6*, *CHST7*, *SULT1C1*, *TPST1*), 3 methyltransferase genes (*TPMT*, *HNMT*, *COMT*), 2 genes from UDP-glycosyltransferase family (*UGT1A1*, *UGT1A4*) and 3 epoxide hydrolase genes (*EPX1*, *EPH2*, *LT4H*) were upregulated. Three genes of the phase I cytochrome-p450 family (*CYP2B6*, *CYP3A7*, *CYP4F3*) and two miscellaneous function genes (*MT1E*, *ABCC3*) were altered as well.

Effects of apple flavonoids on gene expression in LT97 cells (custom-made cDNA microarray analysis)

Custom array results indicated that expression of 14 genes was significantly ($p \leq 0.05$, *t*-test) modulated (Table III). Moreover, a total of 46 genes were upregulated on the basis of the evaluation criteria (≥ 1.5 - or ≤ 0.7 -fold) in response to AE (128 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. The target genes were all upregulated, and none of the genes were downregulated. Notably, a relatively higher number of carcinogen metabolism-related genes tended to be upregulated

TABLE II – GENE EXPRESSION ANALYSIS USING A cDNA MICROARRAY SYSTEM (SUPERARRAY[®]) IN LT97 CELLS

Gene ID	Gene name	Descriptions	Ratio	STD	P values <i>t</i> -test
Phase I					
P450 gene family					
NM_000767	<i>CYP2B6</i>	Cytochrome P450, family2, subfamily B, polypeptide 6	1.6	0.35	0.489
NM_000765	<i>CYP3A7</i>	Cytochrome P450, family3, subfamily A, polypeptide 7	2.4	2.22	0.248
NM_000896	<i>CYP4F3</i>	Cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 3	3.2	3.43	0.144
Phase II					
Acetyltransferases					
NM_000755	<i>CRAT</i>	Carnitine acetyltransferase	1.8	1.01	0.465
NM_001931	<i>DLAT</i>	Dihydrolipoamide <i>S</i> -acetyltransferase	2.8	2.87	0.405
NM_003642	<i>HAT1</i>	Histone acetyltransferase 1	2.1	1.45	0.358
NM_000662	<i>NAT1</i>	<i>N</i> -acetyltransferase 1 (arylamine <i>N</i> -acetyltransferase)	2.3	1.99	0.676
NM_016100	<i>NAT5</i>	<i>N</i> -acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, <i>S.cerevisiae</i>)	2.6	2.34	0.478
Sulfotransferases					
NM_012126	<i>CHST5</i>	Carbohydrate (<i>N</i> -acetylglucosamine 6- <i>O</i>) sulfotransferase 5	3.1	3.66	0.296
NM_021615	<i>CHST6</i>	Carbohydrate (<i>N</i> -acetylglucosamine 6- <i>O</i>) sulfotransferase 6	2.9	3.50	0.809
NM_019886	<i>CHST7</i>	Carbohydrate (<i>N</i> -acetylglucosamine 6- <i>O</i>) sulfotransferase 7	3.9	4.48	0.387
NM_001056	<i>SULT1C1</i>	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1	1.9	1.11	0.440
NM_003596	<i>TPST1</i>	Tyrosylprotein sulfotransferase 1	2.6	1.64	0.475
Glutathione <i>S</i> -transferases					
NM_000847	<i>GSTA3</i>	Glutathione <i>S</i> -transferase A3	1.6	0.51	0.220
NM_000851	<i>GSTM5</i>	Glutathione <i>S</i> -transferase M5	1.8	0.42	0.221
NM_000852	<i>GSTP1#</i>	Glutathione <i>S</i> -transferase P1	2.2	0.85	0.105
NM_000854	<i>GSTT2#</i>	Glutathione <i>S</i> -transferase T2	3.0	3.15	0.149
NM_020300	<i>MGST1</i>	Microsomal glutathione <i>S</i> -transferase 1	2.2	1.32	0.086
NM_002413	<i>MGST2</i>	Microsomal glutathione <i>S</i> -transferase 2	2.7	1.82	0.058
NM_004528	<i>MGST3</i>	Microsomal glutathione <i>S</i> -transferase 3	1.9	1.09	0.598
Methyltransferases					
NM_000367	<i>TPMT</i>	Thiopurine methyltransferase	3.3	4.39	0.287
NM_001024074	<i>HNMT</i>	Histamine <i>N</i> -methyltransferase	2.5	1.19	0.326
NM_000754	<i>COMT</i>	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase	1.8	1.08	0.458
UDP-Glycosyltransferases					
NM_000463	<i>UGT1A1</i>	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1	1.9	0.94	0.501
NM_007120	<i>UGT2B</i>	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10	1.8	0.50	0.434
Epoxide hydrolases					
NM_000120	<i>EPHX1</i>	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	2.4	2.55	0.519
NM_001979	<i>EPHX2</i>	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	2.1	1.45	0.358
NM_000895	<i>LTA4H</i>	Leukotriene A4 hydrolase	2.3	2.17	0.428
Miscellaneous (several functions)					
NM_175617	<i>MT1E</i>	Metallothionein 1E (functional)	3.5	4.32	0.286
NM_003786	<i>ABCC3</i>	ATP-binding cassette, subfamily C (MDR/TAP), member 3	4.1	6.05	0.439

The table shows data for selected genes with fold changes ≥ 1.5 or ≤ 0.7 . Note that all of these 30 genes were upregulated by AE (128 $\mu\text{g/ml}$). # indicates those genes for which mRNA levels were confirmed by real-time PCR. Significant differences to the medium controls were analyzed with a 2-tailed student *t*-test ($n = 4$), but were not found.

(19 genes) by AE treatment than genes belonging to the other functional categories. The mRNA of GSTs (*GSTT2* [$p = 0.009$], *GSTA4* [$p = 0.022$]), carbohydrate sulfotransferases (*CHST3* [$p = 0.016$], *CHST7*) and UGTs (*UGT1A6*, *UGT2B7* [$p = 0.056$]) were markedly elevated. Treatment of LT97 cells with AE also resulted in upregulated expression of genes related to cell cycle control (*CDKN1A*, *NFKB2* [$p = 0.008$], *NFKB1B* [$p = 0.039$], *CGRF1* [$p = 0.039$]), apoptosis signaling (*CASP10* [$p = 0.009$], *WNT3*), oxidative stress (*GPX2*, *FMO1*, *HSPA5*, *UBE2D1*) and tumor suppression (*BRCA2*, *PTPRJ* [$p = 0.019$], *PTPN6* [$p = 0.034$], *PTPRN*, *PTPRT*).

Comparison of results from Superarray and custom array analysis

Of the 96 genes present on the Superarray, 87 genes were also spotted on the custom array (see Fig. 2 for detailed information). Of these 87 genes, 30 were found upregulated in the Superarray analysis, of which only 4 were similarly altered in the custom array analysis (*CYP3A7*, *CYP4F3*, *GSTT2*, *CHST7*) in response to AE treatment in LT97 cells. Thus, 86% of the genes detected in the superarray experiments were not identified with the custom array. This can be explained with a higher sensitivity of the Superarray in comparison to the custom array. However, the differences obtained by custom array were statistically significant, and the differences obtained from superarray were not statistically significant meaning that the custom array platform seemed to be of higher ac-

curacy. This discrepancy indicates that results from screening using cDNA-arrays must be confirmed by additional methods as real-time PCR analysis described below.

Real-time PCR analysis for mRNA enhanced expression in LT97 cells by apple flavonoids

To confirm gene expression differences observed from microarray results, real-time PCR was performed on 6 genes (*GSTA4*, *GSTT2*, *GSTP1*, *UGT1A1*, *UGT1A4*, *UGT2B7*). The choice of these genes had been based on their functional importance and expression levels in the human cell model. We analyzed the mRNA expression levels in response to 2 AE concentrations (128 and 255 $\mu\text{g/ml}$). Figure 3 shows that RNA from LT97 cells, thus treated, revealed modulation of *GSTP1* (1.7, 1.2-fold), *GSTT2* (1.9, 1.4-fold), *GSTA4* (1.8, 1.4-fold), *UGT1A1* (1.1, 1.8-fold) and *UGT2B7* (2.7, 1.9-fold) that were all similar directional changes as those revealed in the analysis of the arrays. However, *UGT1A4* (0.7, 0.5-fold, data not shown) was altered in the opposite direction as in the Superarray (Table II). With the exception of *UGT1A1*, which was most effectively altered at the higher AE concentration (255 $\mu\text{g/ml}$, which was cytotoxic), the 128 $\mu\text{g/ml}$ was most effective in eliciting modulated responses of gene expression. The mRNA expression levels of all of these verified genes were significantly ($p \leq 0.05$) altered in response to AE treatment in LT97 cells (Fig. 3).

TABLE III – GENE EXPRESSION ANALYSIS OF AE (128 µg/ml) TREATED LT97 CELLS USING A CUSTOM-MADE cDNA MICROARRAY

Gene ID	Gene symbol	Gene description	Ratio	STD	<i>p</i> values <i>t</i> -test
Phase I metabolism					
NM_000761	<i>CYP1A2</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	1.5	1.0	0.366
NM_000782	<i>CYP24A1</i>	Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	4.5	2.9	0.025
NM_000771	<i>CYP2C9</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	4.6	3.8	0.344
NM_000765	<i>CYP3A7</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	1.6	0.5	0.062
NM_000896	<i>CYP4F3</i>	Cytochrome P450, subfamily 4 F, polypeptide 3	2.2	2.2	0.777
NM_000941	<i>POR</i>	P450 (cytochrome) oxidoreductase	1.7	1.5	0.519
Phase II metabolism					
NM_005891	<i>ACAT2</i>	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	1.8	1.7	0.874
NM_001512	<i>GSTA4#</i>	Glutathione S-transferase A4	1.7	0.2	0.022
NM_000854	<i>GSTT2#</i>	Glutathione S-transferase theta 2	1.5	0.3	0.009
NM_004273	<i>CHST3</i>	Carbohydrate sulfotransferase 3	2.2	0.5	0.016
NM_005769	<i>CHST4</i>	Carbohydrate sulfotransferase 4	1.6	0.7	0.134
NM_019886	<i>CHST7</i>	Carbohydrate sulfotransferase 7	1.6	0.3	0.094
NM_004861	<i>CST</i>	Cerebroside sulfotransferase	2.5	1.5	0.258
NM_003595	<i>TPST2</i>	Tyrosylprotein sulfotransferase 2	1.5	0.7	0.160
NM_001072	<i>UGT1A6</i>	UDP-glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6	2.1	1.8	0.660
NM_019077	<i>UGT1A7</i>	UDP-glycosyltransferase 1 family, polypeptide A7	1.5	0.5	0.109
NM_01074	<i>UGT2B7#</i>	UDP-glycosyltransferase 2 family, polypeptide B7	2.1	1.2	0.056
Phase III drug transporters					
NM_004996	<i>ABCC1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	2.2	1.0	0.007
NM_000392	<i>ABCC2</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	1.6	0.5	0.057
Phase II gene regulation pathway					
NM_006219	<i>PIK3CB</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, β polypeptide	1.6	0.8	0.176
NM_002649	<i>PIK3CG</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, γ polypeptide	1.6	0.6	0.068
NM_005253	<i>FRA-2</i>	FOS-like antigen 2	4.3	7.8	0.894
NM_001621	<i>AHR</i>	Arylhydrocarbon	1.8	1.9	0.721
Stress and signal transduction					
NM_002021	<i>FMO1</i>	Flavin containing monooxygenase 1	1.6	0.7	0.074
NM_002083	<i>GPX2</i>	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	1.9	2.3	0.730
NM_005347	<i>HSPA5</i>	Heat shock 70 kDa protein 5	1.6	1.3	0.611
NM_003338	<i>UBE2D1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1	1.9	0.8	0.071
Apoptosis signaling					
NM_001230	<i>CASP10</i>	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	1.7	0.4	0.009
NM_030753	<i>WNT3</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	1.7	0.7	0.245
Tumour suppressor					
NM_000059	<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2, early onset	2.7	2.6	0.217
NM_002843	<i>PTPRJ</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, J	1.6	0.3	0.019
NM_002846	<i>PTPRN</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	1.5	0.8	0.330
NM_007050	<i>PTPRT</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, T	1.7	1.6	0.475
NM_002831	<i>PTPN6</i>	Protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6	1.6	0.3	0.034
Cell cycle arrest-regulation of cell cycle					
NM_000389	<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.6	0.9	0.180
NM_006568	<i>CGRF1</i>	Cell growth regulator with ring finger domain 1	2.8	1.5	0.039
NM_001437	<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2 (ER β)	1.6	0.6	0.108
NM_002502	<i>NFKB2</i>	Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	2.2	0.6	0.008
NM_002503	<i>NFKB1B</i>	Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, β	3.8	4.2	0.039
NM_003236	<i>TGFA</i>	Transforming growth factor, α	1.5	0.2	0.015
Miscellaneous (several functions)					
NM_000799	<i>EPO</i>	Erythropoietin	1.6	0.4	0.022
NM_000146	<i>FTL</i>	Ferritin, light polypeptide	1.6	1.0	0.426
NM_000578	<i>SLC11A1</i>	Solute carrier family 11, member 1	2.3	24	0.529
NM_000617	<i>SLC11A2</i>	Solute carrier family 11, member 2	1.6	1.2	0.586
NM_014585	<i>SLC40A1</i>	Solute carrier family 40, member 1	1.9	17	0.528
NM_003234	<i>TFRC</i>	Transferrin receptor (p90, CD71)	1.7	1.4	0.452

The table includes genes that have increased expression levels of ≥ 1.5 - or ≤ 0.7 -fold the medium control cells. Altogether 46 of 300 genes were modulated using this custom array. # indicates those genes for which mRNA levels were confirmed by real-time PCR. Numbers in bold are significantly modulated genes. Significant differences to the medium controls were calculated with a 2-tailed student *t*-test ($p \leq 0.05$, $n = 4$).

Induction of total GST and UGT enzyme activities in colon cells by apple polyphenols

In addition to the induction of GSTs and UGTs transcript levels, also total GST and UGT enzyme activities were assessed in LT97 cells treated with AE (128 and 255 µg/ml). The analysis revealed that GST and UGT enzyme activities seemed to be altered in LT97 cells in response to the AE treatment (Fig. 4). The altered GST (3.8, 2.8-fold) enzyme activities, however, were not significantly different from the control (Fig. 4a), whereas the UGT (1.2, 1.5-fold) enzyme activities were enhanced significantly ($p \leq$

0.001) in the presence of the higher concentration (255 µg/ml) of AE that was cytotoxic (Fig. 4b).

Discussion

According to Superarray and custom array analysis, it was observed that 30 and 46 genes were upregulated by treatment of LT97 cells with AE, respectively. Among these, 83% (25 genes from Superarray) and 41% (19 genes from custom array) of the genes are potentially involved in the key processes of phase II

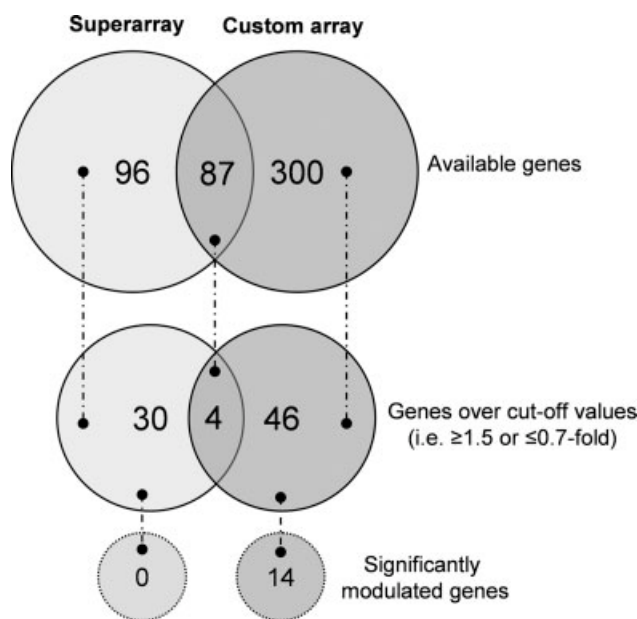


FIGURE 2 – Venn diagram illustrates the comparison of the Superarray with custom array data. For each mapping the data were obtained from Superarray and custom array experiments, and that were detected in 4 replicates for both arrays. The numbers that are shown in big gray circles are the total number of genes spotted on either array. The numbers that are shown in small gray circles are chosen as the number of regulated (≥ 1.5 - or ≤ 0.7 -fold change) genes. The numbers in small dotted gray circles refer to the number of genes that are detected as significantly differentially expressed (2-tailed student *t*-test).

detoxification metabolism, such as GSTs and UGTs. Genes belonging to these groups were selected for more detailed studies to verify their responses to AE. In particular, *GSTT2*, *GSTP1*, *GSTA4*, *UGT1A1*, *UGT2B7* were also upregulated according to real-time PCR analysis. The enhanced levels of *GSTT2* products possibly result in an elevated detoxification of peroxides. For instance, the enzyme has pronounced substrate specificity toward cumene hydroperoxide (Cum-OOH) which, however, is not physiologically available.²⁷ Examples of physiological peroxides, are those formed during lipid peroxidation or arachidonic acid metabolism, such as 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HpETE) and arachidonic acid 15-hydro peroxide, later which potentially damages DNA and is pronounced substrate for *GSTT2*.^{28,29} The metabolic deactivation of endogenously formed peroxides may indeed be favored by enhanced *GSTT2* levels, thus providing cellular chemoprotection. This mechanism is also of interest in the case of an upregulated *GSTP1*, although the carcinogenic substrates that may be deactivated belong to different chemical classes. One candidate of interest is benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE), a metabolically activated form of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo(a)pyrene.³⁰ Another target of interest is *GSTA4* that is involved in the detoxification of final lipid peroxide products, such as 4-hydroxy-2-nonenal (HNE).³¹ Thus, its upregulation by AE could also be related to an antigenotoxic potential and chemoprotection of LT97 cells. UGTs such as, *UGT1A1*, *UGT2B7* are another group of phase II enzymes. They play a role in glucuronidation and subsequent elimination of potentially toxic xenobiotics, endogenous compounds (e.g., bilirubin) and exogenous carcinogenic compounds (e.g., heterocyclic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons).^{32,33}

In addition to upregulation of GSTs and UGTs mRNA, AE also seemed to alter GST and UGT enzyme activities in LT97 cells. This is meaningful since GSTs and UGTs potentially play important roles in cancer chemoprevention.^{34,35} Both GST and UGT

genes are regulated by the transcription factor Nrf2.³⁶ Related to this mechanism is our finding from the custom array analysis that AE also resulted in an upregulation of 4 down stream transcription factors of Nrf2 namely, *PIK3CB*, *PIK3CG*, *FRA-2* and *AHR*. These transcription factors may result in the enhanced transcription of phase II genes such as GSTs, UGTs and NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (*NQO1*).³⁷ Moreover, the data of the Superarray analysis showed that exposure of LT97 cells to AE triggers the transcription level of the *HAT1* gene. *HAT1* is a member of the histone gene family involved in histone acetylation, particularly of histone H4. As a consequence, histone acetylation alters nucleosomal conformation, which can increase the accessibility of transcriptional regulatory proteins to chromatin templates and subsequently increases gene expression, while deacetylation is associated with decreases in gene expression.³⁸ Together, these results show that activation of these transcription factors and the histone gene family by AE could be a relevant mechanism of transcriptional activation of phase II genes such as GSTs and UGTs. Moreover, the effects of apple polyphenols have not yet been studied for inhibition of COX enzyme activities. This has been shown for epicatechingallate, quercetin, resveratrol and genistein in colon cells *in vitro*.^{39,40}

In addition to the capacity of AE to modulate detoxification related genes, AE also seemed to modulate several other genes spotted on the custom array that are related to important functions such as, tumor suppression, cell cycle control, cell signaling as well as apoptosis. For instance, AE increased the expression of 5 established or candidate tumor suppressor genes namely, *BRCA2*, *PTPRT*, *PTPN6*, *PTPRN* and *PTPRJ* (*Dep-1*) in LT97 cells. Expression of *BRCA2* is reported to play a role in DNA repair, and thus to maintain chromosomal stability.⁴¹ *PTPRJ* (*Dep-1*), a newly identified candidate tumor suppressor gene, that has been reported to be involved in apoptosis, cell cycle arrest and tumor suppression. It's re-expression in *PTPRJ*-negative SW480 cells leads to inhibition of cell growth and cell migration, and induction of *PTPRJ* expression by apple polyphenols in HT29 cells.¹⁵ These findings indicate that the upregulation of several tumor suppressor genes by AE might reduce the probability for tumor progression.

Custom array analysis also showed an increase of mRNA from genes involved in the cell cycle arrest and regulation of cell cycle, such as *CDKN1A*, *CGRRF1*, *ESR2*, *NFKB2*, *NFKBIB* and *TGFA* in response to AE treatment. Upregulation of these genes could modulate cell signaling, block progression of cell cycle and inhibit proliferation.⁴² This is in accordance with previous findings showing that AE modulated growth and survival of LT97 cells with EC₅₀ values of 650.9 $\mu\text{g/ml}$ after 24-hr treatment.²² In addition, AE influenced genes from the stress and signal transduction pathways namely, *FMO1*, *GPX2*, *HSPA5* and *UBE2D1*, the products of which have several functions such as peroxidase activity and ubiquitination.⁴³ Moreover, there was an AE-mediated upregulation of the apoptosis mediator *CASP10*, which is part of the caspase cascade. Overexpression of *CASP10* (a caspase closely related to *CASP8*) induces apoptosis,⁴⁴ and thus this finding suggests that AE can modulate apoptosis signaling.¹³

Our previous study with Superarray gene expression analysis of the human colon carcinoma cell line (HT29) treated with AE (510 $\mu\text{g/ml}$ or 30 μM , Ph.E) showed that 8 genes were altered and most of them were related to phase II metabolism gene family.⁴ In our present study using the same Superarray system in human colon adenoma (LT97) cell line, 30 genes were altered, even though the concentration of AE added to LT97 cells was lower (128 $\mu\text{g/ml}$) compared to the treatment used for the HT29 cells. Accordingly, apple polyphenols might have stronger biological effects in the preneoplastic colon epithelial cells than in adenoma cells or carcinoma cells. Moreover, validation of microarray results by real-time PCR with 2 different concentrations (128 and 255 $\mu\text{g/ml}$) of AE showed that induction was more pronounced with the lower concentration, indicating that AE can alter the gene expression in colon cells even at low concentrations.

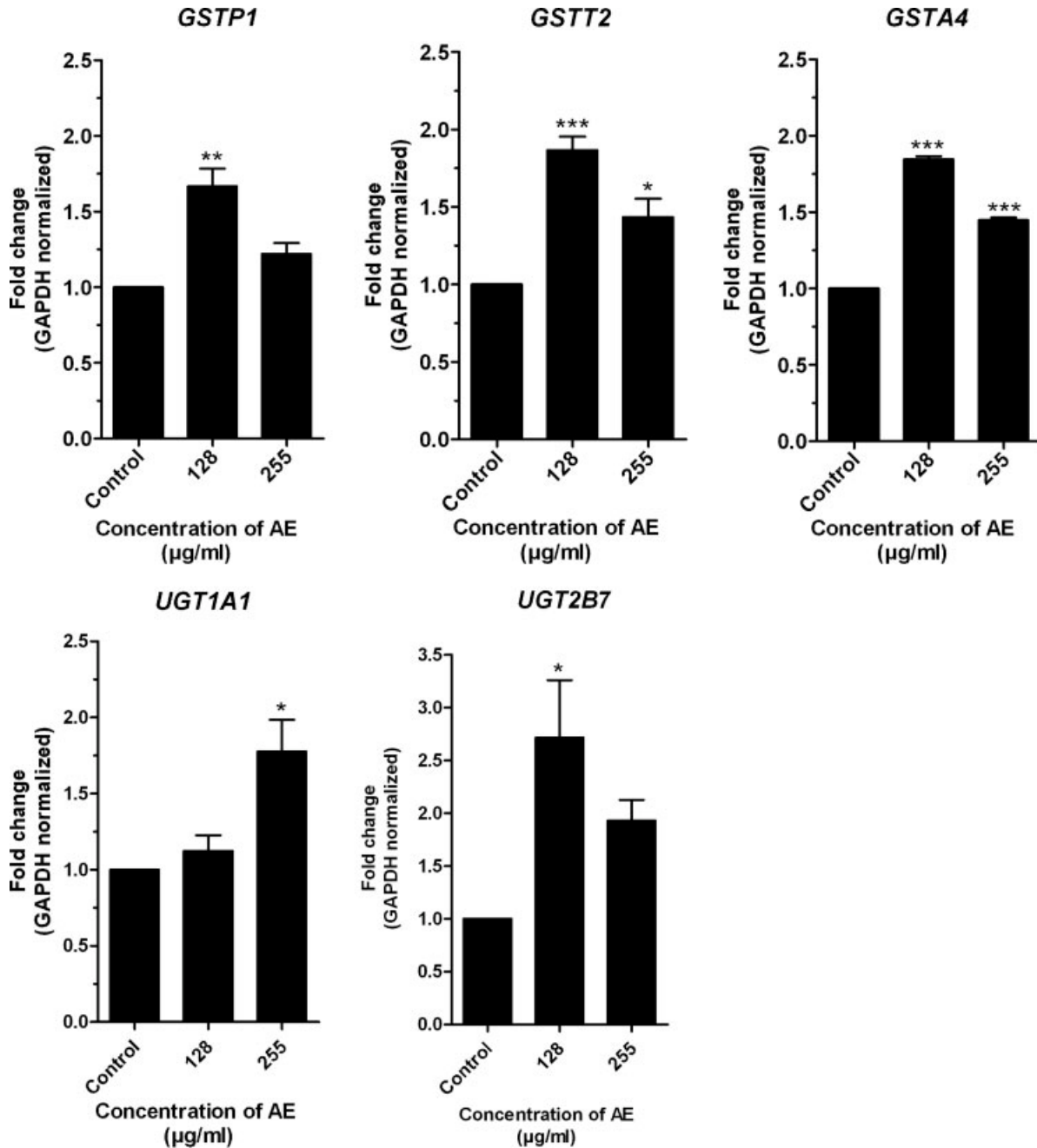


FIGURE 3 – Real-time PCR analysis of selected genes that were modulated in LT97 cells by AE treatment according to cDNA microarrays: Effects of AE on the expression levels of *GSTP1*, *GSTT2*, *GSTA4*, *UGT1A1* and *UGT2B7* mRNA are shown. Total RNA samples were isolated from LT97 cells treated with 128 and 255 µg/ml of AE for the 24 hr, and then subjected to real-time PCR analyses using the gene specific primers (summarized in Table I). The modulations of mRNA levels were obtained by comparing the treatment groups to the medium controls and calculating the fold changes. The *GAPDH* (housekeeping gene) was used as internal reference control. Mean values \pm SD. Significant differences to the controls were calculated by a 1-way ANOVA with Bonferroni's post-test (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$).

In this study with LT97, the comparison of Superarray to custom array data showed that of 87 genes mutually spotted on both arrays, only 4 genes (*CYP3A7*, *CYP4F3*, *GSTT2*, *CHST7*) were altered on both arrays that may be due to differences in sensitivity. These 2 genes (*CYP3A7*, *CYP4F3*) are not involved in carcinogen activation and not yet described to be involved in colon carcinogenesis. The Venn diagram⁴⁵ was used to assess the across-platform agreement. It is important to note that this was used to compare results from 2 different RNA preparation experiments, and thus we did not expect a perfect agreement. From the genes pres-

ent on both arrays, 11 genes were only detected as regulated on the custom array and 25 were only detected with Superarray, respectively. Collectively, the results indicate that there were considerable differences in the responsiveness of the 2 arrays. Since the work up procedure was very similar, the observed differences were probably more due to the platform and to the different probes than to the processes involved in amplification and hybridization.⁴⁶ Accordingly, additional methods were used to confirm mRNA expression data. The lower variation of spotted glass slide array is most likely due to the much lower dynamic range of the

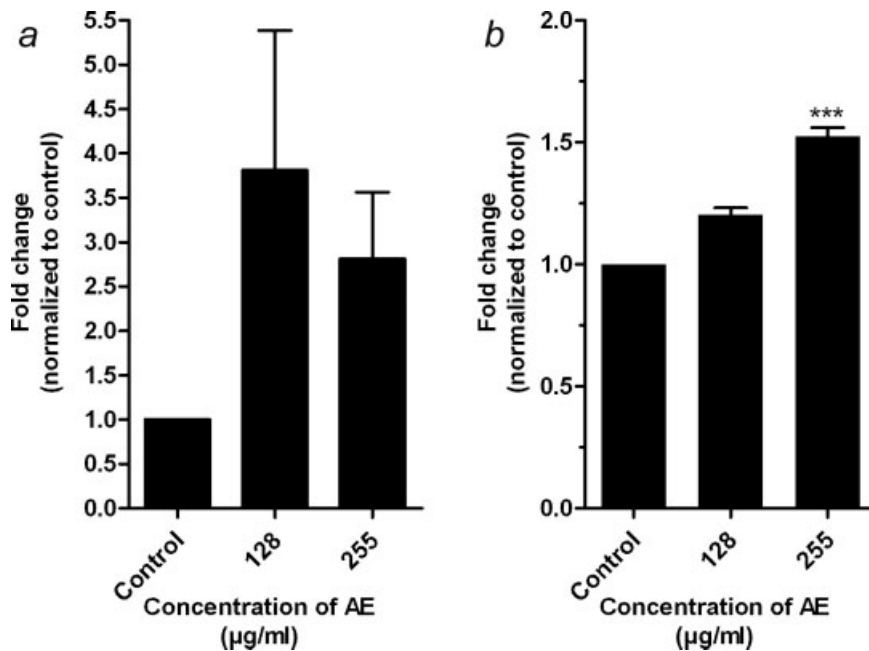


FIGURE 4 – Effects of AE on the activity levels of total GST (a) and UGT (b) enzymes in AE treated (128 and 255 µg/ml, 24 hr) LT97 cells. The total enzyme activity levels were obtained by comparing the treatment groups to the medium controls and calculating the fold changes. Mean values \pm SD. Significant differences to the controls were calculated by a 1-way ANOVA with Bonferroni's post-test (***) $p \leq 0.001$, $n = 3$).

system, which is limited by the thermodynamics of the hybridization process. This phenomena is a very crucial point which is often not considered when looking at data (Wölfl S *et al.*, unpublished observation). In any case, it will be still necessary to confirm mRNA expression obtained with any method by studying levels of protein expression and by determining functional consequences. This is necessary in order to correctly identify meaningful alterations caused by such types of exposures.

In conclusion, apple polyphenols are able to induce gene expression of enzymes related to tumor suppression, cell cycle arrest, regulation of cell cycle, apoptosis signaling, stress and signal transduction and, in particular, detoxification enzymes systems (GST and UGT) in LT97 adenoma cells. Statistically significant modulations were generally more pronounced in custom array than in Superarray analysis. Based on gene expression analysis using real-time PCR, the lower concentration of AE was more effective. However, the higher concentration used here, which was also cytotoxic, was more effective in enhancing UGT enzyme activity. Induction of detoxification enzymes in colon cells may account for the chemopreventive potential of apple polyphenols *in vitro*. The validity of such *in vitro* effects, however, needs to be supported by *in vivo* studies, especially human intervention trials. In this context, we have analyzed ileostomy samples from volunteers who had consumed apple juice and found that samples from individual persons induced *GSTT2* in HT29 cells and protected the cells from genotoxic insult (Veeriah *et al.* submitted for publication). Similar biomarker analyses with fecal samples from 2 other intervention studies are ongoing. However, one should realize that the dose of apple polyphenols used here (128 and 255 µg/ml) needs to be related to the amounts that can be reached in the

human colon. Our recent studies in volunteers with ileostomy pouches have, for instance, revealed that a total of 16.0 ± 3.5 mg polyphenols (16,000 µg per bag with ~360 ml) could be retrieved from the samples of eleven subjects, who had consumed one litre of cloudy apple juice 2 hr before (Veeriah S *et al.*, submitted for publication). This may not be too far removed from the concentrations that reach the colon, but definite measurements will be needed with colon samples before coming to a conclusion. An additional consideration regards the total human diet that contains additional polyphenols from many more sources. Jointly, these might lead to a prolonged exposure and thus be able to exert effects on detoxification enzymes, such as GSTs and UGTs. The induction of these detoxification enzymes by AE or other plant foods in adenoma cells may detoxify compounds that lead to further progression, and thus contribute to chemoprotection in stages subsequent to the initiation stage. The hypothesis will need further experimental back up investigations, but the mechanism could be a promising contribution to cancer chemoprotection by diet.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Brigitte Marian, Institute of Cancer Research, University of Vienna, Austria for the generous gift of LT97 adenoma cells. The author is deeply grateful to PD. Dr. Ferdinand von Eggeling and Dipl. Biol. Julia Diegmann at the Institute for Human genetics and Anthropology, Jena for the GenePix scanner, and their collaboration partner Dr. Frank Will and Prof. Dr. Helmut Dietrich for providing the apple extract. They are grateful to Dr. Herbert Thijs (Center for Statistics, Hasselt University, Belgium) for his statistical advice.

References

1. Ferguson LR, Philpott M, Karunasinghe N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 2004;198:147–59.
2. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, Wolk A. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:525–33.
3. Kawai S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:896–9.
4. Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* 2006;45:164–74.
5. Canivenc-Lavier MC, Vernevauf MF, Totis M, Siess MH, Magdalou J, Suschetet M. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology* 1996;114:19–27.
6. Wenzel U, Herzog A, Kuntz S, Daniel H. Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics* 2004;4:2160–74.

7. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 2002;50:7449–54.
8. Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:76–81.
9. Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 1997;418:152–6.
10. Boyer J, Brown D, Liu RH. Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 2004;52:7172–9.
11. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 2003;51:609–14.
12. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001;21:381–406.
13. Gosse F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, Raul F. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26:1291–5.
14. Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:317–28.
15. Balavenkatraman KK, Jandt E, Friedrich K, Kautenburger T, Pool-Zobel BL, Ostman A, Bohmer FD. DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene* 2006;25:6319–24.
16. Barth SW, Fahndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G. Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 2005;26:1414–21.
17. Richter M, Jurek D, Wrba F, Kaserer K, Wurzer G, Karner-Hanusch J, Marian B. Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer* 2002;38:1937–45.
18. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21(Suppl 1):10–14.
19. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wolff S. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 2005;26:1064–76.
20. Steiner C, Peters WH, Gallagher EP, Magee P, Rowland I, Pool-Zobel BL. Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system. *Carcinogenesis* 2007;28:738–48.
21. Raschke M, Rowland IR, Magee PJ, Pool-Zobel BL. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. *Carcinogenesis* 2006;27:2322–30.
22. Veeriah S, Hofmann T, Gleit M, Dietrich H, Will F, Schreiber P, Knaup B, Pool-Zobel BL. 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* 2007;55:2892–900.
23. Kautenburger T, Beyer-Schlemeyer G, Festag G, Haag N, Kuhler S, Kuhler A, Weise A, Marian B, Peters WHM, Liehr T, Claussen U, Pool-Zobel BL. The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:692–700.
24. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130–9.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
26. Collier AC, Tingle MD, Keelan JA, Paxton JW, Mitchell MD. A highly sensitive fluorescent microplate method for the determination of UDP-glucuronosyl transferase activity in tissues and placental cell lines. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1184–6.
27. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51–88.
28. Powell WS, Chung D, Gravel S. 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of human eosinophil migration. *J Immunol* 1995;154:4123–32.
29. Hiratsuka A, Nishijima T, Okuda H, Ogura K, Watabe T. Rat liver theta-class glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: their chromatographic, electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal Biochem* 1997;252:229–37.
30. Sundberg K, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B. Detoxication of carcinogenic fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferase P1-1 variants and glutathione. *FEBS Lett* 1998;438:206–10.
31. Knoll N, Ruhe C, Veeriah S, Sauer J, Gleit M, Gallagher EP, Pool-Zobel BL. Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci* 2005;86:27–35.
32. Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, Walle T. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells—potential role in carcinogen bioactivation. *Pharm Res* 2001;18:374–9.
33. Thibaudeau J, Lepine J, Tojcic J, Duguay Y, Pelletier G, Plante M, Brisson J, Tetu B, Jacob S, Perusse L, Belanger A, Guillemette C. Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone. *Cancer Res* 2006;66:125–33.
34. Malfatti MA, Felton JS. N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 2001;22:1087–93.
35. Kensler TW. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ Health Perspect* 1997;105 (Suppl 4):965–70.
36. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002;62:5196–203.
37. Pool-Zobel B, Veeriah S, Bohmer FD. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* 2005;591:74–92.
38. Marmorstein R. Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:693–703.
39. Al-Fayez M, Cai H, Tunstall R, Steward WP, Gescher AJ. Differential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive flavonoids tricetin, apigenin and quercetin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:816–25.
40. Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA, Yang CS. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1175–83.
41. Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001;7:263–72.
42. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817–25.
43. Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993;268:2571–6.
44. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnot D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001;276:46639–46.
45. Kestler HA, Muller A, Gress TM, Buchholz M. Generalized Venn diagrams: a new method of visualizing complex genetic set relations. *Bioinformatics* 2005;21:1592–5.
46. Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, Gabrielson E, Garcia JG, Geoghegan J, Germino G, Griffin C, Hilmer SC, et al. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods* 2005;2:345–50.

3.2 Publikation II: *GSTT2*, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage.

Petermann Astrid*, Miene Claudia*, Schulz-Raffelt Gabriele, Palige Katja, Hölzer Jana, Glei Michael, Böhmer Frank-D.

Molecular Nutrition and Food Research, 2009, 53(10):1245-53.

*** gleichwertige, geteilte Erstautorenschaft**

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass Apfelpolyphenole (AE) die Expression des Phase II-Gens *GSTT2* in humanen Kolonzellen signifikant induzieren. Daraus ergab sich die Hypothese, dass Apfelpolyphenole möglicherweise vor oxidativem Stress und den damit verbundenen DNA-Schäden schützen können. Zur Beurteilung wurden HT29 Kolonadenokarzinomzellen mit dem genotoxischen Substrat Cumenhydroperoxid (CumOOH) geschädigt. Die detektierten DNA-Schäden konnten durch Vorinkubation mit AE signifikant reduziert werden. Unter Verwendung genetisch modifizierter HT29 Zellen (*GSTT2*-überexprimierende Zellen und *GSTT2-knockdown* Zellen) konnte der Nachweis des Zusammenhangs zwischen der *GSTT2*-Expression bzw. Aktivität und der Genotoxizität von CumOOH erbracht werden. So wurden in *GSTT2*-überexprimierenden Zellen signifikant weniger DNA-Schäden im Comet Assay ermittelt. Hingegen wiesen *GSTT2-knockdown* Zellen signifikant höhere CumOOH-induzierte Schäden in der DNA auf. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das chemopräventive Potential der Polyphenole und spezifischer deren antigenotoxische Eigenschaften *in vitro* zumindest teilweise auf die Induktion der *GSTT2* zurückzuführen ist.

Eigenanteil:

- Zellkultur
- Planung und Durchführung der Comet Assays
- Statistische Auswertung, Darstellung und Interpretation aller Ergebnisse
- Anteilige Verfassung des Manuskriptes

Research Article

GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage

Astrid Petermann^{1*}, Claudia Miene^{2*}, Gabriele Schulz-Raffelt¹, Katja Palige¹, Jana Hölzer¹, Michael Gleis^{2**}, Frank-D. Böhmer^{1*}

¹ Center for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Cell Biology, Friedrich-Schiller-University Jena, Germany

² Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Friedrich-Schiller-University Jena, Germany

The potential protective effect of a polyphenol-rich diet for colon carcinogenesis is of great scientific and medical interest. Apples are a main source of polyphenols, and apple juice has been shown to attenuate chemically induced colon carcinogenesis in animal models. In addition to an antioxidant and antiproliferative activity, apple polyphenols have been shown to elevate expression of the phase II gene glutathione S-transferase T2 (*GSTT2*) in colon epithelial cells. We hypothesized that apple polyphenols may thereby provide protection against oxidant-induced DNA damage. Using *GSTT2* promoter constructs and luciferase reporter assays, we found that polyphenolic apple extracts (AE) can directly enhance *GSTT2* promoter activity. Comet assays demonstrated that the genotoxicity of the *GSTT2* substrate cumene hydroperoxide (CumOOH) was significantly reduced when HT29 colon epithelial cells were pretreated with AE. Overexpression of *GSTT2* in HT29 cells significantly reduced CumOOH induced DNA damage, whereas shRNA mediated knockdown of *GSTT2* gene expression resulted in higher damage. Our results causally link *GSTT2* levels with protection from genotoxic stress, and provide evidence that the antigenotoxic effects of apple polyphenols *in vitro* are at least in part due to an induction of *GSTT2* expression. Induction of phase II genes may contribute to primary chemoprevention of colon cancer by apple polyphenols.

Keywords: Apple polyphenols / Chemoprevention / Cumene hydroperoxide / Genotoxic stress / *GSTT2*

Received: March 12, 2009; revised: April 25, 2009; accepted: May 4, 2009



1 Introduction

Malignant alterations in the colon, caused frequently by the typical diet and lifestyle in Western countries [1], can possibly be prevented by a diet rich in vegetables and fruits [2, 3]. These beneficial effects have been partially attributed to secondary plant products, notably polyphenols, which are among the most abundant antioxidant compounds. Apples and the corresponding apple juices, favoured in the Western diet, contain high amounts of phenolic compounds such as hydroxycinnamates, flavan-3-ols, flavonols, dihydrochal-

cones and anthocyanins [4, 5], and their intake may therefore be beneficial with respect to prevention of colorectal cancer. In animal models of colon carcinogenesis, apple juice and apple polyphenol extracts had indeed a protective effect [6, 7], however, the underlying mechanisms of protection are yet incompletely understood. *In vitro* studies with colon adenoma and carcinoma cell lines have revealed different potential mechanisms relating to the chemopreventive properties of apple polyphenols. Antioxidant activity of apple polyphenols has been shown in several studies, and this activity could also be demonstrated with reconstituted mixtures of pure compounds [8, 9]. Apple polyphenol extracts have also been shown to inhibit proliferation of colon adenoma and colon carcinoma cells, and to induce apoptosis [10, 11]. The antiproliferative activity may be partially mediated by induction of the *PTPRJ* gene (*protein tyrosine*

Correspondence: Professor Frank-D. Böhmer, Center for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Cell Biology, Friedrich-Schiller-University Jena, Hans-Knöll-Straße 2, 07745 Jena, Germany

E-mail: boehmer@med.uni-jena.de

Fax: +49-3641-9395602

Abbreviations: AE, apple extract; CumOOH, cumene hydroperoxide; FCS, fetal calf serum; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; H₂O₂, hydrogen peroxide

* These authors contributed equally to this work.

** Additional corresponding author: Dr. Michael Gleis, E-mail: Michael.Gleis@uni-jena.de

phosphatase receptor type J), a candidate tumour suppressor gene encoding the protein-tyrosine phosphatase DEP-1 [12]. In addition to the antiproliferative, pro-apoptotic and antioxidative properties of apple ingredients, an induction of phase II gene expression was shown as a further potential mechanism of chemoprevention. Among the phase II enzymes, the glutathione S-transferases (GSTs) comprise one of the most efficient detoxifying enzyme systems in humans. GSTs catalyse the conjugation of electrophiles with glutathione to more hydrophilic and less reactive derivatives [13]. The human GSTs of the theta-class GSTT1 and GSTT2, possess activity against a wide range of compounds, including known carcinogens, implicating a possible role in prevention of carcinogenesis [14]. Previous work from our and other laboratories has indicated that GSTT2 may be important for chemoprevention by apple polyphenols. Expression of *GSTT2* was significantly up-regulated in HT29 cells *in vitro* after pre-treatment with an apple polyphenol extract [15]. Moreover, recent data indicated an interaction between a reduced genotoxicity, enhanced antigenotoxicity and modulation of *GSTT2* gene expression in HT29 cells using ileostomy samples collected from human volunteers after intervention with apple juice [16].

Based on these results, we hypothesized that apple polyphenols may provide protection against oxidant-induced DNA damage by increasing expression of GSTT2. By reporter assays we could demonstrate a direct effect of apple polyphenol treatment on *GSTT2* promoter activity. Apple polyphenole extracts (AE) were protective against the genotoxic activity of cumene hydroperoxide (CumOOH), a model substrate of GSTT2 [17, 18]. Further, GSTT2 expression in genetically modified HT29 cell lines was inversely correlated with susceptibility to CumOOH-induced DNA damage.

2 Materials and methods

2.1 Preparation and analysis of the apple polyphenol extracts (AE)

The apple polyphenol extract AE02 was produced from a mixture of apple varieties from the cultivar year 2002. For the AE05, clear apple juice was produced from a composition of cider apples from the crop year 2005, representing a commercially available cider apple juice. The juice production, preparation of a polyphenol extract as well as the analysis of polyphenol composition have been described before [19, 20].

2.2 Cell culture conditions

The human colon adenocarcinoma cells HT29 (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD), established in 1964 by Fogh and Tempe [21], were grown in tissue culture flasks with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM,

Gibco BRL, Eggenstein, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and maintained under sterile conditions in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂, 95% humidity). Cells were routinely checked for mycoplasma contaminations using the MycoAlert® Detection Assay (Lonza Biosciences, Verviers, Belgium), and were cultured without antibiotics. For the experiments in this study, cells in passages 15–35 were used.

Phoenix amphotropic packaging cells (kindly provided by Dr. Gary Nolan, Stanford, CA, USA) were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS. HEK293 cells were grown in DMEM-F12 medium (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) containing 10% FCS.

2.3 Luciferase reporter assay for GSTT2 promoter activity

GSTT2 promoter activity in response to AE treatment was determined with a dual luciferase reporter assay. pGL3 constructs containing the firefly luciferase gene under control of the *GSTT2* promoter, were kindly provided by Dr. Paul R. Buckland, University of Cardiff, U.K. [22]. For the experiments in this study, the most prevalent polymorphic variant A was used. The promoterless pGL3 Basic Vector (Promega, Mannheim, Germany) served as control for basal luciferase activity. A plasmid encoding *Renilla* luciferase under control of the thymidine kinase promoter (pRL-TK, Promega, Mannheim, Germany) served for normalization to cell count and transfection efficiency.

HT29 cells were transfected with the *GSTT2* promoter construct (or pGL3-Basic for control) and pRL-TK (ratio 10:1) using Lipofectamine 2000, with a DNA:Lipofectamine ratio of 1:6. After 5 h of transfection, cells were trypsinized and 2×10^4 cells were seeded per well of a 96 well plate (flat bottom, clear, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany, cat.No 655098). AE treatment was started the next day, either in presence or absence of 100 U/mL catalase (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany). After treatment, cells were washed twice with PBS, and lysed in 20 µl Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim, Germany). Luminescence was measured in a LumiStar Galaxy reader (BMG Labtechnologies, Durham, NC, USA) as described in ref. [23]. The firefly luciferase values were normalized to *Renilla* luciferase activity. Reporter activity was measured in at least three independent experiments, with at least four replicates each.

2.4 Formation of H₂O₂ by apple polyphenols

H₂O₂ production in the HT29 culture medium was measured by the ferrous ion oxidation-xylenol orange (FOX) assay [24]. Different concentrations of AE02 and AE05 (0–850 µg/mL) were incubated in DMEM for 24 and 48 h in a humidified incubator. Afterwards, 40 µL of each concentration was added to 360 µL of FOX reagent [250 µM ammo-

nium ferrous sulphate, 100 μM xylenol orange, 25 mM H_2SO_4 , 4 mM butylated hydroxytoluene (BHT) in 90% v/v methanol], followed by 30 min incubation at room temperature. Finally, the samples were centrifuged (10 min, 10 000 $\times g$) to eliminate flocculated material and the absorbance of the supernatant was then read at 550 nm. Concentrations of H_2O_2 were calibrated using a standard curve of H_2O_2 (0–300 μM), performed in parallel.

2.5 Comet assay

To study the antigenotoxic potential of apple polyphenols, DNA damage after incubation with CumOOH was measured using the alkaline version of single cell micro gel electrophoresis (Comet assay). HT29 cells were seeded in cell culture flasks (25 cm^2) and plated for 24 h. A pre-treatment with 510 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AE05 in absence or presence of 100 U/mL of catalase (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 24 or 48 h followed. After incubation, cells were harvested, washed and then treated with CumOOH in concentrations ranging from 18.8 to 150 μM for 15 min at 37°C. The Comet assay was performed as described by Tice *et al.* [25]. Cells were embedded into low melting agarose on pre-coated microscope slides, lysed for 60 min, before dissected DNA was unwound in alkaline electrophoresis buffer. After unwinding, DNA fragments caused by CumOOH *via* strand breaking activities were electrophoretically separated at 1.25 V/cm, 300 mA for 20 min, washed three times for 5 min with PBS, and stained with 30 μL of fluorescence dye SYBR Green per slide (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany). DNA damage was microscopically quantified using a ZEISS Axiovert 25 microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and the Komet 4.0 image analysis system (Kinetic Imaging Corp., Liverpool, UK). 3 \times 50 cells were scored per experiment and the mean of tail intensity (TI; percentage of fluorescence in the tail) was calculated in percentage relative to the control treated with the highest CumOOH concentration for normalization. For analysis of DNA damage in HT29 cells with genetically modified *GSTT2* expression levels, the AE pre-incubation step was omitted. DNA damage was induced by incubation with 75 μM CumOOH for 15 min at 37°C. Otherwise, the assay was performed as described above.

2.6 Generation of GSTT2-overexpressing HT29 cells

The *GSTT2* cDNA with N-terminal His-tag was subcloned from a bacterial expression vector (pQEHT1-GSTT2, kindly provided by Dr. P. G. Board, Canberra) [26] into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 using standard methods. In order to test whether the expression construct is functional, we transfected HEK293 cells with the plasmid using polyethylenimine (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany) [27]. Control cells were transfected with a green

fluorescent protein (GFP) expression plasmid. Twenty-four hours after transfection, cells were lysed in lysis buffer containing 1% NP40, 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10% glycerol and protease inhibitors. Lysates were cleared by centrifugation, boiled in reducing sample buffer and separated on a 13% SDS–PAGE gel. Proteins were then transferred to a PVDF membrane (Millipore). Detection of the His-tagged GSTT2 protein was performed with anti-hGSTT2 antibody (Abnova, Heidelberg, Germany) and subsequent incubation with horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibody or with HRP-coupled anti-penta His antibody (Qiagen, Hilden, Germany), respectively.

To stably overexpress *GSTT2*, HT29 cells were transfected with the expression vector pcDNA3.1-GSTT2, or the empty pcDNA3.1 vector using Lipofectamine 2000. Selection of stably transfected cells with 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) was started 48 h after transfection. Single cell clones were obtained by the dilution method.

2.7 GSTT2 knock down in HT29 cells

Stable *GSTT2* knock down in HT29 cells was achieved with retrovirally delivered *GSTT2*-targeting shRNA expression constructs. Phoenix amphotrophic packaging cells were transfected with pRS plasmids encoding either one of four non validated *GSTT2* targeting shRNAs (only the sense strand of the targeting sequence is given; sequence 1: GTCTACATCTTCGCCAAGAAGAATGGCAT; sequence 2: CCGACTGCATCCGTGGCACCTTTGGTATA; sequence 3: GAGAAGGTGGAACGCAACAGGACTGCAT; sequence 4: ATCATCTTGAGCATCCTGGAA-CAGGCGGC) or a non targeting shRNA (Origene, Rockville, USA) with the polyethylenimine (PEI) method. Twenty-four and 48 h after transfection, the medium containing the replication-deficient retrovirus particles was collected and used for infection of HT29 cells. The incubation with the virus was performed for 5 h in the presence of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene (1.5-dimethyl-1.5-diazaundecamethylene polymethobromide, AL-118, Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany). Selection of stably transfected cells was started 48 h after the second infection with 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany).

2.8 cDNA synthesis and quantitative real time PCR

The extent of *GSTT2* overexpression or depletion in the stably transfected HT29 cells was examined with quantitative real time PCR. Total RNA was isolated from the stably transfected HT29 cells using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was synthesized from 4 μg RNA by Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR with oligo(dT)_{12–18} primers according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Real time PCR

was carried out with Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using primers specific for human *GSTT2* (Hs_GSTT2_2_SG QuantiTect Primer Assay; Qiagen, Hilden, Germany) and *GAPDH* for normalization (*GAPDH* for 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGAC 3'; *GAPDH* rev 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'; Sigma-Genosys, Germany). Samples were measured in duplicates.

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad® Prism software Version 4.0 (GraphPad® Software Inc., San Diego, USA). All experiments performed *in vitro* were repeated at least three times independently. All values are presented as mean ± SD. The two-tailed *t*-test was chosen to compare reporter activity of medium-treated and AE-treated cells as well as Comet assay data obtained for cells with genetically modified *GSTT2* expression levels. FOX assay data were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Significant differences between medium-treated cells and AE-treated cells after damage with CumOOH were calculated using two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. Differences with *p* values <0.05 are indicated as significant.

3 Results

3.1 Polyphenolic apple extracts induce a *GSTT2* reporter

We have previously shown that endogenous *GSTT2* expression in HT29 colon carcinoma cells is enhanced upon treatment with an apple polyphenol extract (here referred to as AE02) [15]. To establish a direct effect of apple polyphenols on *GSTT2* gene regulation, we employed reporter assays with a *GSTT2* promoter-regulated firefly luciferase expression construct. HT29 cells were transiently transfected with the reporter, and subsequently treated with AE02 under conditions which caused endogenous *GSTT2* expression regulation (510 µg/mL for 24 h). As depicted in Fig. 1, reporter activity was increased 2.3-fold by AE02. An even more pronounced effect (3.1-fold induction) was obtained upon treatment with AE02 for 48 h. We also tested an AE from a different crop year (AE05) for its capacity to activate the reporter expression. As shown in Fig. 1, AE05 was also capable of inducing the reporter in a time dependent manner, albeit to a somewhat lesser extent than AE02. Luciferase activity was 1.5-fold increased after 24 h and 2.5-fold after 48 h of incubation with AE05, respectively. Thus, in addition to the previously described increase in endogenous *GSTT2* transcript levels, we confirmed the *GSTT2* inducing activity of apple polyphenols at the level of promoter activity. This regulation was not related to the known hydrogen peroxide (H₂O₂) production during the

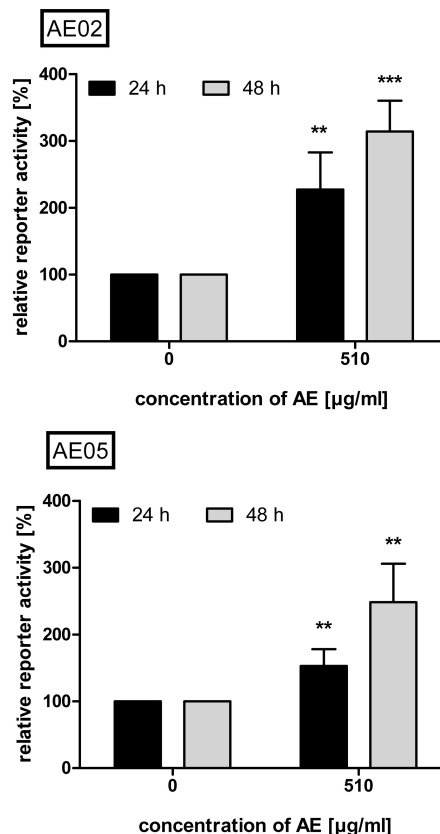


Figure 1. Induction of *GSTT2* promoter activity by apple polyphenols. HT29 colon carcinoma cells were transiently transfected with a *GSTT2* promoter construct driving expression of firefly luciferase. Cells were treated with AE02 or AE05 for the indicated times. Cells were lysed and luciferase activity was measured and normalized to activity of co-transfected *Renilla* luciferase. Results are shown as mean ± SD. Significant differences to medium control were calculated by two-tailed student *t*-test (***p* < 0.01, ****p* < 0.001; *n* = 5 for 24 h and *n* = 6 for 48 h measurement).

interaction of apple polyphenols with cell culture media [28, 29]. While AE02 and AE05 indeed caused H₂O₂ production in cell-free culture medium (Figure S1 of Supporting Information), addition of catalase completely decomposed the generated H₂O₂ (data not shown). The induction of the *GSTT2* reporter was undistinguishable in absence or presence of catalase (Figure S2 of Supporting Information). Nevertheless, further experiments were carried out in the presence of catalase to exclude possible effects of H₂O₂.

3.2 Treatment of HT29 cells with AE protects from CumOOH-induced DNA damage

Comet assays were carried out to evaluate the antigenotoxic potential of apple polyphenols and the possible role of *GSTT2* expression. To induce oxidative DNA damage, the genotoxic compound CumOOH was selected as test sub-

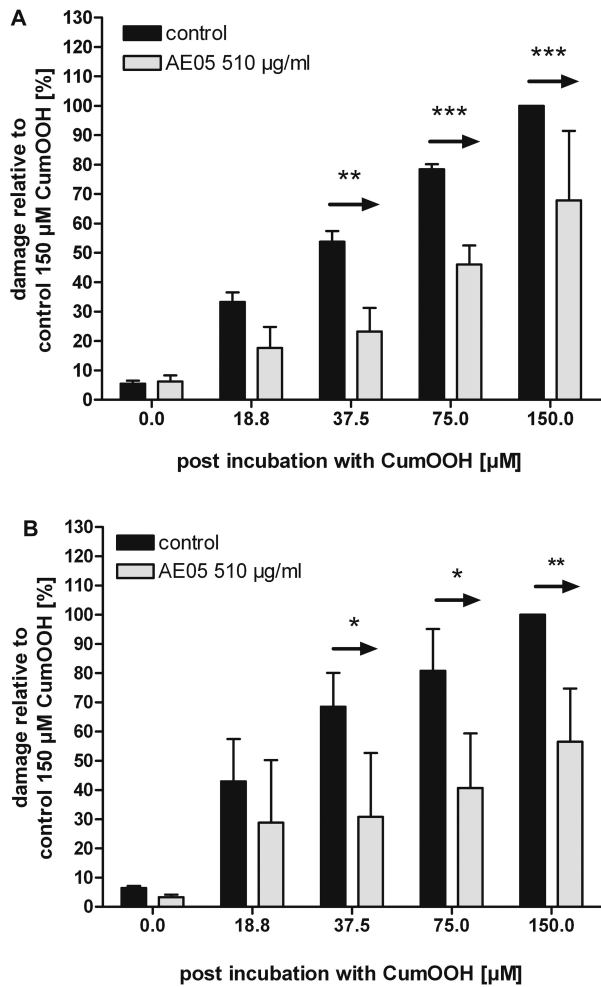


Figure 2. Impact of apple polyphenols on CumOOH-induced DNA damage. Levels of DNA damage in HT29 colon carcinoma cells induced by 18.8–150 µM CumOOH (15 min at 37°C) after pre-incubation with AE05 (510 µg/mL, grey bars) or DMEM medium control (black bars) for 24 (A) and 48 h (B) in presence of catalase were measured with an alkaline Comet assay. Tail intensities relative to 150 µM CumOOH-treated control are shown as mean \pm SD. Significant differences to untreated medium control were calculated by two-way ANOVA, including Bonferroni's multiple comparison test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$).

stance. Cells were pre-treated with apple polyphenols (AE05) at a concentration, which is known to induce expression of *GSTT2*. As shown in Fig. 2, a 24 h (2A) or 48 h (2B) pre-incubation with 510 µg/mL AE05 significantly reduced genotoxicity of CumOOH in HT29 cells. Pre-treatment with AE05 resulted in a decrease of DNA damage by 30% after 24 h and by ~40% after 48 h compared to the medium control, respectively. These results indicate that apple polyphenols protect from genotoxic damage generated by a substrate of GSTT2 enzymes.

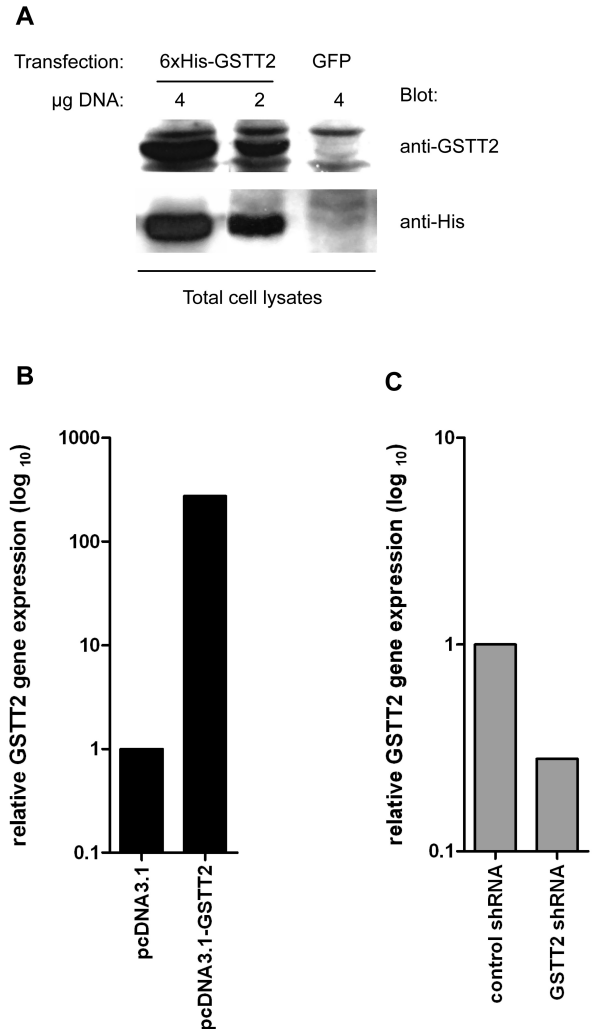


Figure 3. Modulation of GSTT2 expression levels in HT29 colon epithelial cells. (A) Functionality of a GSTT2 expression construct in HEK293 cells. The *GSTT2* cDNA with N-terminal His tag was subcloned into pcDNA3.1. Expression of the His-GSTT2 was tested in HEK293 cells transiently transfected with the construct, or a GFP expression vector as control. Cells were lysed 24 h after transfection and analysed by immunoblotting using anti-GSTT2 or anti-penta His antibody, as indicated. The lanes of the anti-His blot were on the same membrane with identical exposure and image processing, but were rearranged for better clarity. (B) Stable overexpression of GSTT2 in HT29 colon epithelial cells. Cells were transfected with the expression construct analysed in (A), or pcDNA3.1 control vector, and selected with G418. *GSTT2* mRNA expression was analysed by qRT-PCR. A clone with high-level overexpression was chosen for functional analysis. (C) Stable downregulation of GSTT2 expression in HT29 colon epithelial cells. Cells were retrovirally transduced with different non-validated shRNAs directed against *GSTT2*, and stable cell pools were selected with puromycin. Downregulation of *GSTT2* mRNA was validated by qRT-PCR and is shown for cells transduced with the best targeting construct 2, which were used for further analysis.

3.3 Genetic modulation of GSTT2 expression affects susceptibility to CumOOH-induced DNA damage

We next addressed the question of whether the protective effect of apple polyphenols may be attributed to the induction of *GSTT2* gene expression. To analyse this, we generated HT29 cells with genetically modified *GSTT2* expression levels by either overexpressing *GSTT2* or knocking down endogenous *GSTT2* expression. To overexpress *GSTT2*, an expression construct in the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 was employed. Functionality of this construct was tested by transient transfection of HEK293 cells with the expression plasmid (or a GFP encoding plasmid as control) and analysis of corresponding cell lysates by immunoblotting. As shown in Fig. 3A, *GSTT2* protein was detectable both with a *GSTT2*- or a His-tag specific antibody, indicating that the construct effectively drives *GSTT2* protein expression. We next stably transfected HT29 cells with the *GSTT2* expression construct or the empty pcDNA3.1 vector as control. Since endogenous *GSTT2* protein expression was not detectable by immunoblotting, presumably due to lower expression levels compared to transiently transfected HEK293 cells, and expression of His-tagged *GSTT2* in stably transfected cell lines was only weakly detectable (hampered by technical problems, data not shown), we measured *GSTT2* mRNA expression levels by quantitative RT-PCR, and selected a cell line with high *GSTT2* expression level (Fig. 3B) for comparison with empty vector transfected cells for testing the effect of *GSTT2* overexpression on CumOOH-induced DNA damage. As depicted in Fig. 4A, HT29 cells overexpressing *GSTT2* showed significantly reduced DNA damage compared with cells transfected with pcDNA3.1. To further corroborate a correlation between *GSTT2* expression levels and susceptibility to DNA damage, we also analysed the genotoxic effect of CumOOH in HT29 cells with reduced *GSTT2* levels. In order to knock down endogenous *GSTT2* expression, cells were virally transduced with expression plasmids encoding either one of four non validated *GSTT2* targeting shRNAs or a control shRNA. *GSTT2* expression in stably transfected cells was measured by quantitative RT-PCR. Of the four *GSTT2* targeting shRNA sequences, only sequence 2 considerably reduced *GSTT2* expression to 28% of the control cell level (Fig. 3C). This *GSTT2* depleted cell line and cells stably transduced with an expression construct for non-targeting shRNA (control cells) were now compared for their susceptibility to CumOOH-induced DNA damage. As apparent from Fig. 4A, *GSTT2* knock-down significantly increased tail intensity compared to the control cells. From these results, it can be concluded that endogenous *GSTT2* protects cells from oxidative DNA damage by CumOOH. Taken together, *GSTT2* expression levels were inversely correlated with susceptibility to genotoxic stress.

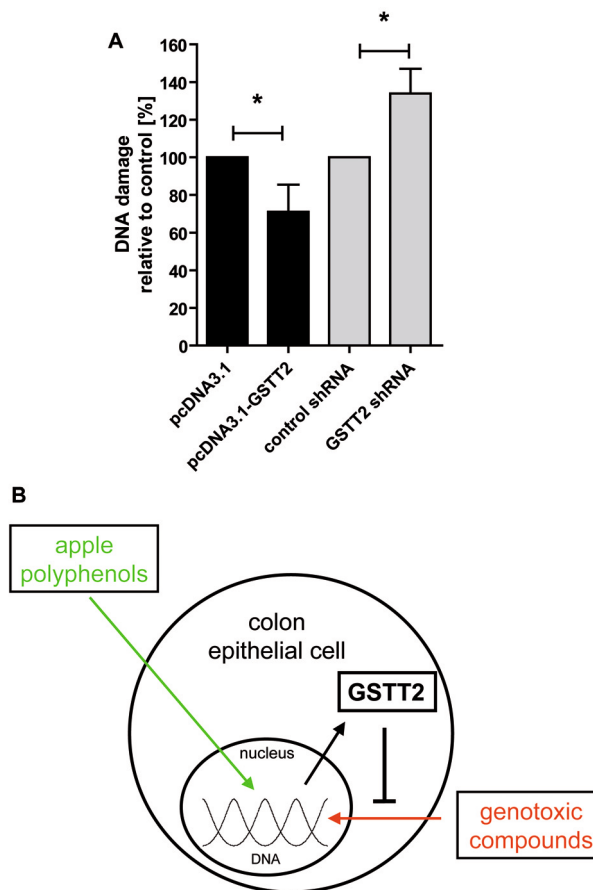


Figure 4. Modulation of CumOOH-induced DNA damage by alteration of *GSTT2* expression levels. (A) *GSTT2*-overexpressing, *GSTT2*-depleted and corresponding control HT29 cell lines were incubated with 75 μ M CumOOH for 15 min and analysed by Comet assay. Data were cumulated from four independent experiments. Tail intensities were normalized to intensities of the respective control cell line and shown as mean \pm SD. Significance of differences were calculated by two-tailed student *t*-test ($*p < 0.05$; $n = 4$). (B) Schematic representation of the proposed role of *GSTT2* regulation by apple polyphenols for protection against genotoxic damage.

4 Discussion

Several epidemiological studies have linked the consumption of apple with a reduced risk for colorectal cancer. One mechanism by which apple compounds may exert a protective function is the modulation of phase I and phase II carcinogen metabolism (reviewed in [30]). We have previously shown that the transcript levels of *GSTT2* and other genes involved in biotransformation of xenobiotics are modulated by the treatment with a polyphenolic AE [15]. With this study we demonstrate that apple polyphenols protect from oxidant-induced DNA damage and provide evidence that this effect may be directly caused by the increased expression of *GSTT2*.

To establish a direct effect of apple polyphenols on *GSTT2* gene regulation, we used a reporter assay to study *GSTT2* promoter activity in response to AE treatment in HT29 cells. For two different apple polyphenol extracts we found a time-dependent increase in promoter activity. This finding demonstrates that the previously found enhancement of endogenous *GSTT2* mRNA levels was at least partially mediated by activation of transcription.

The mechanisms leading to the transcriptional activation of the *GSTT2* promoter, and the promoter elements involved in the process remain to be identified. Antioxidant-response elements (ARE) have been described in promoters of rodent *GST* genes [13]. The *GSTT2*-reporter, which we have used in this study was, however, not induced under conditions causing strong activation of an ARE-containing Nrf2 reporter (not shown), suggesting the absence of ARE elements. Dissection of *GSTT2* promoter regulation would clearly be facilitated by identifying the chemical components in the apple polyphenol extracts, which are responsible for the *GSTT2* induction. We therefore tested a number of known components of the extracts (phloridzin, epicatechin, caffeic acid, quercetin-3-rutinosid, quercetin-3-galactosid, quercetin-3-rhamnosid, quercetin-3-glycosid, phloretin (aglycon), quercetin (aglycon), chlorogenic acid and procyanidines B1 and B2) [20] for their capacity to activate the *GSTT2* promoter. However, none of the compounds significantly induced reporter activity (data not shown). This indicates that either the active compound was not among the tested substances or that compounds are active only when applied as a mixture allowing additive or synergistic effects.

We next addressed the question of whether apple polyphenols might confer protection from genotoxic stress by inducing *GSTT2* expression. To analyse this, HT29 cells were preincubated with an apple polyphenol extract and subsequently challenged with different concentrations of the *GSTT2* substrate CumOOH. Our results demonstrate clearly that apple polyphenols reduce the genotoxic activity of CumOOH. This effect is independent of H₂O₂ generation in the medium since the protective effect was insensitive to catalase addition (data without catalase not shown). An obvious explanation for the AE mediated protection is an enhanced detoxification of CumOOH due to the elevated *GSTT2* expression. To test this hypothesis we created cell lines with elevated or decreased *GSTT2* expression levels and analysed them for their susceptibility to CumOOH-induced DNA damage. The Comet assay results showed that cells overexpressing *GSTT2* were more resistant towards the action of CumOOH while *GSTT2* depleted cells exhibited a higher susceptibility. These findings clearly prove that (I) endogenous levels of *GSTT2* protect cells from CumOOH-induced damage and (II) that protection can be enhanced by an up-regulation of *GSTT2* expression levels.

CumOOH, which we used to study the *GSTT2* mediated antigenotoxicity, is a synthetic hydroperoxide [31]. Among

the physiological substrates described for *GSTT2* are peroxides generated during lipid acid metabolism and arachidonic peroxidation, such as arachidonic acid 15-hydroperoxide [32], which is involved in DNA-adduct formation. From our results it could be speculated that elevated *GSTT2* levels might also protect from oxidative stress caused by endogenously produced peroxides.

Nevertheless, further glutathione transferases, such as GSTA2 and GSTK1 are involved in detoxification of CumOOH [13]. Furthermore, it is not yet known whether these enzymes are modulated by apple polyphenols. Thus, it cannot be excluded that these enzymes could also contribute to the AE-mediated protection against CumOOH-induced DNA damage. However, our experiments with genetically modified HT29 cells suggest that this protection is due at least in part to an enhanced *GSTT2* level.

Pool-Zobel *et al.* reported that *GSTT2* expression levels in the colon vary among different individuals [33]. Our results suggest that individuals might therefore be differently susceptible to oxidative DNA damage by agents which are detoxified by *GSTT2*. An impact of *GSTT2* expression is also suggested by the study of Jang *et al.*, who reported an association of *GSTT2* promoter polymorphisms with colorectal cancer risk [34]. One could speculate that a favourable modulation of *GSTT2* expression in the colon might reduce the risk for oxidative DNA damage and colon cancer.

Our data show that apple polyphenols can induce *GSTT2* expression in HT29 cells *in vitro*. Whether the consumption of apple polyphenols affects *GSTT2* expression level in the colon *in vivo* is currently unknown. Analysis of ileostomy samples collected from human volunteers after intervention with cloudy apple juice revealed that polyphenols are subjected to rapid metabolism and/or absorption upon passage of stomach and small intestine [35]. However, an enhanced *GSTT2* mRNA level and promoter activity as well as a reduced genotoxicity were detected in HT29 cells treated with ileostomy samples from the intervention study [16]. These observations suggest that sufficient amounts of *GSTT2* inducing components in apple juice may arrive in the colon.

In conclusion, our study revealed that apple polyphenols induce *GSTT2* expression in HT29 colon carcinoma cells by enhancing *GSTT2* promoter activity. Furthermore, we demonstrated that AE treatment reduces oxidative DNA damage caused by the *GSTT2* substrate CumOOH. By genetically modifying *GSTT2* expression levels we proved that *GSTT2* has an antigenotoxic potential, which is likely to mediate at least in part the protective effects of apple polyphenols (Fig. 4B). These results suggest that *GSTT2* might be a promising target for dietary chemoprevention.

We are grateful to Drs. P. R. Buckland and P. G. Board for kind provision of reagents and to Dr. G. Nolan for provision of Phoenix amphotropic packaging cells. Furthermore, the

authors thank our collaboration partners M. Olk, Dr. F. Will and Prof. Dr. H. Dietrich for providing the apple extracts, Dr. K. K. Balavenkatraman for help with cDNA cloning, and E. Woschee for her technical assistance. This work was supported by a grant from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, FKZ.01EA0103), Germany.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Slattery, M. L., Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin. Gastrointest. Dis.* 2000, 11, 142–146.
- [2] Steinmetz, K. A., Potter, J. D., Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 1996, 96, 1027–1039.
- [3] Koushik, A., Hunter, D. J., Spiegelman, D., Beeson, W. L., *et al.*, Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007, 99, 1471–1483.
- [4] Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F., Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6532–6538.
- [5] Kahle, K., Kraus, M., Richling, E., Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 797–806.
- [6] Barth, S. W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., *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.
- [7] Gosse, F., Guyot, S., Roussi, S., Lobstein, A., *et al.*, Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005, 26, 1291–1295.
- [8] Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Janzowski, C., Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 413–417.
- [9] Bellion, P., Hofmann, T., Pool-Zobel, B. L., Will, F., *et al.*, Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6310–6317.
- [10] Kern, M., Pahlke, G., Balavenkatraman, K. K., Böhmer, F. D., *et al.*, Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4999–5006.
- [11] Veeriah, S., Hofmann, T., Gleis, M., Dietrich, H., *et al.*, 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.* 2007, 55, 2892–2900.
- [12] Balavenkatraman, K. K., Jandt, E., Friedrich, K., Kautenburger, T., *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.
- [13] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 45, 51–88.
- [14] Landi, S., Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res* 2000, 463, 247–283.
- [15] Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., *et al.*, Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinog.* 2006, 45, 164–174.
- [16] Veeriah, S., Balavenkatraman, K. K., Böhmer, F., Kahle, K., *et al.*, Intervention with cloudy apple juice results in altered biological activities of ileostomy samples collected from individual volunteers. *Eur. J. Nutr.* 2008, 47, 226–234.
- [17] Hussey, A. J., Hayes, J. D., Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem. J.* 1992, 286 (Pt 3), 929–935.
- [18] Tan, K. L., Board, P. G., Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem. J.* 1996, 315 (Pt 3), 727–732.
- [19] Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H., Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of corresponding juices. *Eur. Food Res.* 2000, 211, 291–297.
- [20] Huemmer, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., *et al.*, Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnol. J.* 2008, 3, 234–243.
- [21] Fogh, J., Tempe, G., *New human tumor cell lines. Human Tumor Cells in Vitro*, Plenum Press, New York 1975, pp. 115–159.
- [22] Guy, C. A., Hoogendoorn, B., Smith, S. K., Coleman, S., *et al.*, Promoter polymorphisms in glutathione-S-transferase genes affect transcription. *Pharmacogenetics* 2004, 14, 45–51.
- [23] Dyer, B. W., Ferrer, F. A., Klinedinst, D. K., Rodriguez, R., A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal. Biochem.* 2000, 282, 158–161.
- [24] Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Wolff, S. P., Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal. Biochem.* 1994, 220, 403–409.
- [25] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., *et al.*, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000, 35, 206–221.
- [26] Tan, K. L., Chelvanayagam, G., Parker, M. W., Board, P. G., Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with different substrates involves different residues. *Biochem. J.* 1996, 319 (Pt 1), 315–321.
- [27] Karagyozov, L., Godfrey, R., Böhmer, S. A., Petermann, A., *et al.*, The structure of the 5'-end of the protein-tyrosine phosphatase PTPRJ mRNA reveals a novel mechanism for translation attenuation. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, 4443–4453.
- [28] Lapidot, T., Walker, M. D., Kanner, J., Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H(2)O(2) during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3156–3160.
- [29] Akagawa, M., Shigemitsu, T., Suyama, K., Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, 67, 2632–2640.
- [30] Gerhäuser, C., Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med.* 2008, 74, 1608–1624.

- [31] Hiratsuka, A., Kanazawa, M., Nishiyama, T., Okuda, H., *et al.*, A subfamily 2 homo-dimeric glutathione S-transferase mYrs-mYrs of class theta in mouse liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 212, 743–750.
- [32] Hiratsuka, A., Nishijima, T., Okuda, H., Ogura, K., *et al.*, Rat liver theta-class glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: their chromatographic, electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal. Biochem.* 1997, 252, 229–237.
- [33] Pool-Zobel, B. L., Selvaraju, V., Sauer, J., Kautenburger, T., *et al.*, Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 2005, 26, 1064–1076.
- [34] Jang, S. G., Kim, I. J., Kang, H. C., Park, H. W., *et al.*, GSTT2 promoter polymorphisms and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007, 7, 16.
- [35] Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., *et al.*, Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10605–10614.

3.3 Publikation III: Impact of apple polyphenols on GSTT2 gene expression, subsequent protection of DNA and modulation of proliferation using LT97 human colon adenoma cells.

Miene Claudia, Klenow Stefanie, Veeriah Selvaraju, Richling Elke, Gleis Michael
Molecular Nutrition and Food Research, 2009, 53(10):1254-62.

In dieser Studie wurden chemopräventive Eigenschaften wie die antigenotoxische und die antiproliferative Kapazität der Apfelpolyphenole (AE) in Abhängigkeit der Zusammensetzung und des Alters der Testsubstanzen untersucht. Es zeigte sich, dass ein frisch isolierter Extrakt aus Apfelsaft (AE[A]) sowohl CumOOH-induzierte als auch H₂O₂-induzierte DNA-Schäden in LT97 Zellen signifikant reduzieren kann. Diese Effekte konnten dagegen für einen für 4 Jahre bei Raumtemperatur gelagerten AE[B] derselben Produktionslinie nicht mehr nachgewiesen werden. Auch zeigten sich keinerlei Einflüsse auf die Induzierbarkeit der *GSTT2*. Eine dem AE[A] analog nachempfundene synthetische Polyphenolmischung (SPM) wies diesbezüglich ebenfalls keine chemopräventiven Eigenschaften auf. Allerdings hatten AE[A] und SPM vergleichbare Effekte auf die Zellzahl im DAPI- (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Assay, wohingegen AE[B] weitaus stärkere antiproliferative Eigenschaften zeigte. Eine vergleichende Analytik der beiden Extrakte AE[A] und AE[B] machte Unterschiede in der Polyphenolzusammensetzung deutlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass chemopräventive Effekte des AE in Abhängigkeit der Polyphenolzusammensetzung variieren, wobei die Zusammensetzung wiederum von Lagerbedingungen und Alter der Extrakte beeinflusst werden kann.

Eigenanteil:

- Zellkultur
- Anteilige Durchführung des DAPI-Assays
- Anteilige Planung und Durchführung der Comet Assays
- Planung/Durchführung der Genexpressionsuntersuchungen mit *real-time qRT-PCR*
- Anteilige statistische Auswertung, Darstellung und Interpretation der Ergebnisse
- Anteilige Verfassung des Manuskriptes

Research Article

Impact of apple polyphenols on *GSTT2* gene expression, subsequent protection of DNA and modulation of proliferation using LT97 human colon adenoma cells

Claudia Miene¹, Stefanie Klenow¹, Selvaraju Veeriah¹, Elke Richling² and Michael Gleis¹

¹ Institute for Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Friedrich-Schiller-University Jena, Jena, Germany

² Food Chemistry and Toxicology, University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany

Apple extract (AE) enhances expression of glutathione *S*-transferases (*e.g.*, *GSTT2*) in human colon cells (LT97). Therefore, aim of the present study was to identify functional consequences of *GSTT2* induction by AE and to determine the relation of AE effects to isolated compounds. Polyphenol composition of AE was analyzed. LT97 cells were treated with AE or synthetic polyphenol mixture (SPM) under conditions that induced *GSTT2*, and challenged with *GSTT2*-2 substrate cumene hydroperoxide (CumOOH) to determine DNA damage using comet assay. Modulation of *GSTT2* expression (real-time PCR) was reassessed, and the influence on cell proliferation and pro-oxidative potential of AE and SPM were assessed to understand additional mechanisms. Induction of *GSTT2* by AE was accompanied by protection of LT97 cells from CumOOH-induced genotoxicity. Although SPM was unable to reflect AE-specific bioactivity related to *GSTT2* modulation and anti-genotoxicity, inhibition of LT97 cell proliferation by SPM was comparable. Storage of AE caused changes in phenolic composition along with loss of activity regarding *GSTT2* induction and amplified growth inhibition. At the applied concentrations, no H₂O₂ formation was detectable with any of the substances. AE can protect against oxidatively induced DNA damage. Nevertheless, chemopreventive effects of AE strongly depend on the specific composition, which is modified by storage.

Keywords: Apple polyphenols / Chemoprevention / Cumene hydroperoxide / *GSTT2* / LT97

Received: September 25, 2008; revised: May 28, 2009; accepted: June 4, 2009

1 Introduction

Even though the recent report of the World Cancer Research Fund appraised the protective effects of fruits on the risk for colon cancer as limitedly suggestive, it is widely believed that a diet rich in fruits and vegetables shows protective effects against colorectal cancer [1, 2]. Many studies

demonstrated chemopreventive properties of phytochemicals, among them antioxidant activities, induction or inhibition of enzymes and anti-proliferative effects [3]. In particular the modulation of drug-metabolizing enzymes seems to be important in terms of chemoprevention since these enzymes can inactivate carcinogens [4].

Apples are widely consumed in the Western diet and they are a major source of flavonoids [5–7]. Recently, *in vivo* studies with rats revealed properties of apples related to anti-carcinogenic activities. Treatment of rats with a cloudy apple juice resulted in reduced DNA damage, pre-neoplastic lesions and number of aberrant crypt foci initiated by an injection of the colon carcinogens dimethylhydrazine or azoxymethane [8, 9]. Apple extract (AE) was found to inhibit protein kinase C activity in a cell-free system and was shown to induce apoptosis in HT29 colon carcinoma cells [10]. Studies with the procyanidin-enriched fraction of

Correspondence: Claudia Miene, Friedrich-Schiller-University Jena, Institute for Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany
E-mail: claudia.miene@uni-jena.de
Fax: + 49-3641-949672

Abbreviations: AE, apple extract; CumOOH, cumene hydroperoxide; DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol; EC₅₀, effective concentration that reduces number of cells by 50%; FCS, fetal calf serum; FOX, ferrous iron in xylitol orange; GSH, glutathione; GST, glutathione *S*-transferase; SPM, synthetic polyphenol mixture

an AE have shown that this compound increases the protein expression of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, c-Jun N-terminal kinase and the activity of caspase-3, indicating induction of apoptosis resulting in cell death [11]. In the same study the authors also showed that apple procyanidins arrest cells in G2/M phase of the cell cycle and reduce activities of ornithine decarboxylase and *S*-adenosylmethionine decarboxylase in a human colorectal carcinoma cell line (SW620) and thus, inhibit promotion of colon carcinogenesis.

In a previous study we have shown that the exposure of LT97 colon adenoma cells to 128 µg/mL AE (7.5 µM phloridzin equivalents) for 24 h induced *GSTT2* mRNA (real-time PCR: 1.8-fold, $p \leq 0.001$) [12]. The gene products of *GSTT2* may biologically activate selected industrial chemicals, such as ethylene oxide, halogenated alkanes and epoxides, and thus enhance their toxicity [13, 14]. Alternatively, human GSTT2-2 has a peroxidase activity with *t*-butyl hydroperoxide and most pronounced cumene hydroperoxide (CumOOH) as substrates, whereas there was no detectable activity for hydrogen peroxide (H₂O₂) [15–17]. While the physiologically existing 15-hydroxyperoxide of arachidonic acid was identified as a substrate for a rat Theta class GST, *i.e.*, Yrs-Yrs, no natural substrate for human GSTT2-2 has yet been identified [15, 18, 19]. The identification of such a natural substrate is critical to define a specific function of this enzyme within the human defense system. So far, it can be only speculated that human GSTT2-2 may help to protect cells from oxidative stress induced by peroxides generated during peroxidation of lipids or arachidonic acid.

Although GSTT2-2 has pronounced substrate specificity for CumOOH, GSTA2-2 and GSTK1-1 as well as mu-class GST enzymes have also been reported to show affinity for this compound [15, 19, 20]. In addition, CumOOH is also a substrate for glutathione peroxidase [21].

Based on the *GSTT2* gene expression results, we assumed that a pre-treatment of human LT97 colon adenoma cells with AE would alter the genotoxic response to CumOOH. The AE batch (termed AE[A]) used for previous studies [12, 22, 23] ran out during experiments. Therefore, we had to order a new batch of AE (termed AE[B]) from the same charge, cultivar year and production line, but different storage conditions. To explore the effects of AE more in depth, a synthetic polyphenol mixture (SPM) of phenolic compounds as detected in the AE[A] was prepared and its effects were compared to results obtained with this AE. Furthermore, modulation of LT97 cell proliferation by AE batches and SPM was compared. Considering that polyphenols are not only known for their antioxidant effects but also for their pro-oxidative potential *in vitro* and *in vivo* [24–28], the ability of AE compounds to induce formation of H₂O₂ in cell culture media was investigated to clarify whether H₂O₂ has to be considered for AE-mediated modulation of *GSTT2* expression and proliferation.

Overall, the aim of the study was to identify functional consequences of *GSTT2* induction by AE and the relation of AE effects to isolated compounds.

2 Materials and methods

2.1 AE and SPM

Clear apple juice from the cultivar year 2002 was produced from a defined mixture of table apples as has been described before [22]. Polyphenols of 100 L of that juice were retained on a 5-L adsorber resin (XAD 16 HP, Rohm & Haas, Frankfurt, Germany) packed onto a Pharmacia glass column (BPG 100, 100 × 10 cm). After washing out water-soluble juice ingredients, polyphenols were eluted with three bed volumes of ethanol (96%). The ethanolic fraction was concentrated by evaporation, transferred into the water phase and freeze dried [29]. AE[A] was stored at 4°C until further use. An aliquot was used for analysis of polyphenol contents [23, 30], other aliquots were needed to treat the colon cells prior to determining biological activities. AE[A] was in use from 01/2003 to 01/2006. In contrast, AE[B] was stored approximately 4 years at room temperature until use starting in 03/2007.

To assess whether the interaction of compounds in AE are responsible for the effects of *GSTT2* gene expression modulation and the anti-genotoxic potential of the AE, an SPM was created. Commercially available polyphenols, corresponding to those found in the analysis of AE[A] (highlighted in Table 1), were dissolved at corresponding concentrations in ethanol or methanol, and were freshly mixed for each experiment to avoid any effects on the activity of SPM (chlorogenic acid, caffeic acid, phloretin-2'-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside, quercetin-3-*O*-rutinosid and (–)-epicatechin were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Germany), whereas quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside and the procyanidins B₁ and B₂ were obtained from Fluka (Deisenhofen, Germany). Because of the different solubility of the SPM constituents, two different alcoholic solvents were used to obtain the conditions required for cell culture experiments. The total polyphenol content of the SPM was equal to about 50% of the AE[A] (480.4 µg/mL in AE[A]; 264.2 µg/mL in SPM). To exclude any effects of the solvents on cell metabolism, the final concentrations did not exceed 0.2% for ethanol and 0.05% for methanol.

2.2 Analysis of phenolic compounds

The polyphenol content of the AE[B] was measured in 2007 in the same way as for AE[A], which was analyzed in 2002 [23], to compare differences in composition between the batches. An aliquot of the AE[B] was diluted with the internal standard 3,4,5-trimethoxycinnamic acid and directly submitted to a HPLC-DAD system. Detailed infor-

Table 1. Phenolic composition in mg/g and fold differences of AE[A] and AE[B] determined by HPLC-DAD analysis (details see Section 2). The polyphenols used for preparing SPM according to AE[A] are in italics.

Substance	AE[A]	AE[B]	Fold difference (AE[A]/AE[B])
<i>Chlorogenic acid</i>	181.5	149.5	1.2
<i>Caffeic acid</i>	4.8	2.7	1.8
<i>p</i> -Coumaric acid	–	1.7	–
4-Coumaroyl-quinic acid	77.3	19.3	4.0
<i>Procyanidin B1</i>	7.0	1.7	4.1
<i>Procyanidin B2</i>	15.1	6.1	2.5
<i>(–)-Epicatechin</i>	19.15	0.6	32.0
<i>(+)-Catechin</i>	–	0.6	–
<i>Phloridzin</i>	27.9	20.0	1.4
Phloretin	–	0.5	–
Phloretin-xyloglucoside	138.9	34.6	4.0
<i>Quercetin-3-O-glucoside</i>	1.4	–	–
<i>Quercetin-3-O-galactoside</i>	0.8	0.5	1.6
<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	2.6	0.2	13.0
<i>Quercetin-3-O-rhamnoside</i>	4.1	0.6	6.8
Quercetin	–	1.1	–
Sum	480.4	215.9	

mation about HPLC conditions and evaluation has been published elsewhere [31, 32].

2.3 Cell lines and culture conditions

The human colorectal adenoma cell line LT97 represents an early stage of tumor development (kind gift from Professor B. Marian, Institute for Cancer Research, University of Vienna, Austria) [33, 34]. It was established from colon microadenoma of a patient with hereditary familial polyposis, and has an almost normal karyotype [34]. LT97 cells were maintained in MCDB culture medium according to Klenow *et al.* [35].

2.4 Challenge with CumOOH or H₂O₂ using comet assay

To investigate the influence of AE and the SPM on protection against DNA damage, LT97 cells were incubated with 128 µg/mL AE or SPM (corresponding to AE[A]), respectively, for 24 h. The cells were harvested and challenged with different concentrations of CumOOH (120–300 µM; Sigma-Aldrich) or H₂O₂ (18.8–150 µM; 30% aqueous solution from Merck, Darmstadt, Germany) in vials prior to embedding them on glass slides. Neither incubation with AE or SPM nor the damage with genotoxic compounds affected cell viability. The working solutions were freshly prepared with PBS for each experiment. First, cells were incubated for 5 min at 4°C to avoid repair of the induced oxidative DNA damage and inhibit enzymatic processes, according to [36]. Second, the protocol for the challenge was modified to 37°C for 5 min to allow enzymatic activity, *i.e.*, GSTT2-2 activity. The comet assay was carried out

under the conditions described by Tice *et al.* [37]. DNA damage was microscopically quantified using a ZEISS Axi-overt 25 microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and the Comet 4.0 image analysis system (Kinetic Imaging Corp., Liverpool, UK). Per sample, 150 cells were analyzed and the percentage of fluorescence in the tail (TI, “tail intensity”) was evaluated.

2.5 GSTT2 expression using real-time PCR

The same treatment conditions as described for the comet assay were applied to LT97 cells before total RNA was isolated using Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quality of RNA samples were characterized by the RNA Integrity Number (RIN) ranging from 8.5 to 9.7 using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, United States). First-strand cDNA synthesis from 2.5 µg total RNA was performed by Super ScriptTMII Reverse Transcriptase (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Germany) using poly (dT) primers. Furthermore, *GSTT2* gene expression in LT97 cells was evaluated by real-time PCR using SYBR Green[®] as DNA stain (iCycler IQ[®], Bio-Rad GmbH, München, Germany) as described by Veeriah *et al.* [22]. The relative mRNA modulation of *GSTT2* is expressed as fold difference to the medium-treated controls normalized to the housekeeping gene *GAPDH*.

2.6 Determination of LT97 cell number

Cell proliferation in the presence of AE or SPM was determined in 96-well microtiter plates using the 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) assay. LT97 cells were grown to a confluence of approximately 40%, exposed

to 0–510 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AE or corresponding concentrations of SPM and maintained in culture for 24 h. Cell number analysis was carried out as previously described [23]. For each sample and control, the fluorescence of DAPI-stained DNA, which reflects the cell number, was measured (excitation 360 nm/emission 465 nm, TECAN Spectrafluor GmbH, Grailsheim, Germany).

2.7 Determination of H_2O_2 formation

Peroxide production or rather H_2O_2 formation in the cell-free MCDB culture medium in the presence of AE or SPM was analyzed using the ferric-xylenol orange assay (FOX) method [38, 39]. Different concentrations of the test substances (0–510 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in culture medium) were incubated for 24 h at 37°C in a humidified incubator to allow H_2O_2 formation. Then 40 μL of the test concentrations were mixed with 360 μL of the FOX solution and incubated for 30 min at room temperature. H_2O_2 oxidizes ferrous iron to ferric iron, which can be detected by the formation of a colored complex with xylenol orange. Serial concentrations of H_2O_2 (0–300 μM) were processed in parallel for calibration. After centrifugation ($10\,000 \times g$, 10 min), $2 \times 100 \mu\text{L}$ of the supernatant were transferred to a 96-well plate and absorption was recorded at 550 nm (TECAN Spectrafluor). Concentrations of H_2O_2 were determined from the standard curve.

2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad® Prism software Version 4.0 (GraphPad® Software Inc., San Diego, USA). All experiments performed *in vitro* were repeated at least three times independently unless otherwise indicated. Repeated measures (one-way) ANOVA, including Bonferroni's multiple comparison test were used to compare the significance of differences between PBS-treated controls and CumOOH- or H_2O_2 -treated cells. Comparisons of medium-treated controls with AE treatments were calculated using repeated measures (mixed model) ANOVA with matched subjects, including paired-wise Bonferroni's multiple comparison test. Differences with p values = 0.05 were considered significant. Formation of significant amounts of H_2O_2 was tested using one-way ANOVA, including Bonferroni's multiple comparison test.

3 Results

3.1 AE batches differed in phenolic composition

The analysis of AE[B] revealed that the overall amount of polyphenols was reduced compared to the previous analysis of AE[A] in 2002 (Table 1). In particular the flavan-3-ols like procyanidins and (–)-epicatechin, and the flavonols, *i.e.*, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside

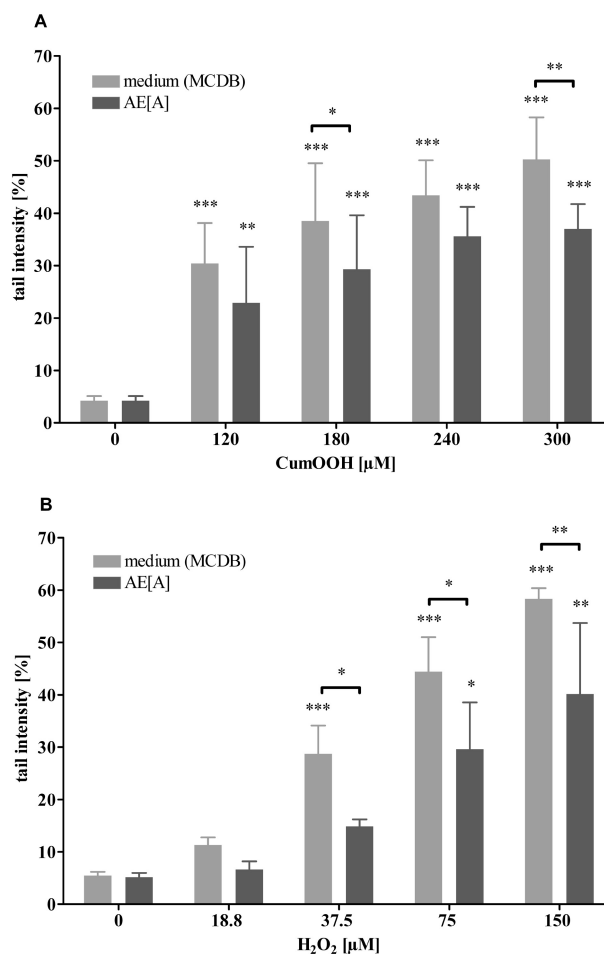


Figure 1. Levels of DNA damage in LT97 cells induced by: (A) 120–300 μM CumOOH (5 min at 4°C , $n=3$) or (B) 18.8–150 μM H_2O_2 (5 min at 4°C , $n=3$) after pre-incubation with AE[A] (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dark gray bars) or medium control (light gray bars) measured with the standard version of the alkaline comet assay (mean + SD). The significant differences to the untreated control were calculated by one-way ANOVA including Bonferroni's multiple comparison test. The effect of the AE pre-incubation was calculated using two-way ANOVA (repeated measures) including Bonferroni's multiple comparison test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

and quercetin-3-*O*-rutinoside, were present in much higher concentration in AE[A]. Also some deglycosylated metabolites, like phloretin and quercetin were detected in AE[B], indicating degradation processes during storage. To mimic the mixture of AE[A] composition, SPM was prepared to assess whether these particular compounds could be responsible for the effects of AE[A] batch.

3.2 Genotoxicity of CumOOH and H_2O_2 was modulated by AE[A]

CumOOH and H_2O_2 were significantly genotoxic in LT97 cells (light gray bars in Figs. 1A and B). In the first set of

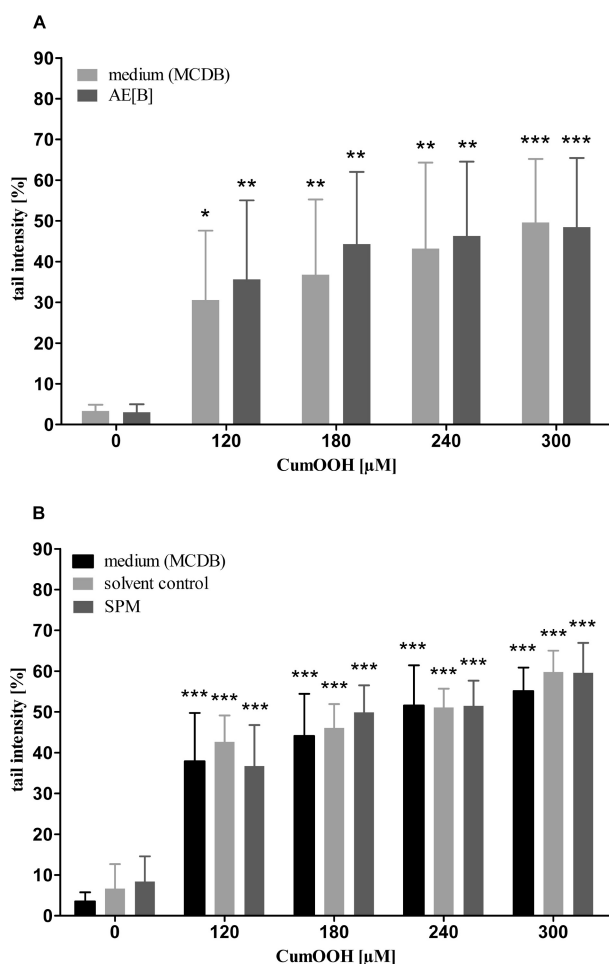


Figure 2. Levels of DNA damage in LT97 cells induced by 120–300 μM CumOOH (5 min at 37°C, $n=3$) after pre-incubation with: (A) AE[B] (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dark gray bars) or (B) SPM (corresponding to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AE[A], dark gray bars) measured with the standard version of the alkaline comet assay (mean + SD). The significant differences to the untreated control were calculated by one-way ANOVA including Bonferroni's multiple comparison test. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

experiments, LT97 cells were pre-incubated with AE or SPM, respectively, for 24 h and challenged with CumOOH at 4°C for 5 min. AE[A] significantly reduced the CumOOH-induced DNA damage at 180 μM by 23% ($p \leq 0.05$) and at 300 μM by 26% ($p \leq 0.01$) compared to the medium control (Fig. 1A, dark gray bars). For pre-treatment with AE[B] and SPM, respectively, no reduction of CumOOH genotoxicity was detected (data not shown).

Comparable to CumOOH, pre-treatment with AE[A] for 24 h resulted in a significant reduction of H_2O_2 -induced genotoxicity of up to 48% compared to medium control (Fig. 1B, dark gray bars).

To simulate physiological conditions, the second set of experiments with AE[B] and the SPM were performed at 37°C for 5 min. Again, AE[B] and SPM had no impact on

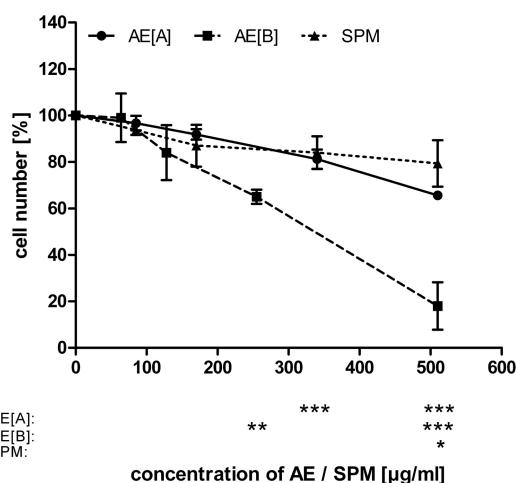


Figure 3. Modulation of cell number by both tested AE batches (0–510 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and SPM (corresponding to AE[A]). LT97 cells were grown to a maximum confluence of 40% and incubated in a humidified incubator (37°C, 5% CO_2 , 95% humidity) for 24 h ($n=3$). Significant differences to the untreated medium control (cell number = 100%) were calculated by one-way ANOVA, including Bonferroni's multiple comparison test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). The anti-proliferative activity of the AE[A] was already published previously [23].

CumOOH genotoxicity (Figs. 2A and B). Because of depletion of the sample during the experimental work, this experiment could not be performed with AE[A].

3.3 AE[B] and SPM did not increase *GSTT2* mRNA expression

To understand the inactivity of AE[B] and SPM in the comet assay, their impact on *GSTT2* expression was investigated. Veeriah *et al.* [12] summarized the induction of gene expression obtained with AE[A] in LT97 cells with different platforms (Superarray: 3.0-fold, Custom array: 1.5-fold and real-time PCR: 1.8-fold). Repetition of *GSTT2* gene expression analyses with AE[B] and SPM using real-time PCR revealed that neither AE[B] nor SPM were as effective as AE[A] (fold change of 1.0 for AE[B] and 0.7 for SPM).

3.4 Number of cells was reduced more by AE[B] compared to AE[A] and SPM

The anti-proliferative activity of the AE[A] was shown in our previous publication [23]. In the present study, the potential of AE[B] and SPM was compared to AE[A] (Fig. 3). Treatment of LT97 cells with AE[B] with the same concentration range (0–510 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and SPM (corresponding to AE[A]) caused a concentration-dependent decrease of cell number. After 24 h, the anti-proliferative activities of the SPM was comparable to AE[A]. Only SPM equivalent to 510 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AE[A] caused a significantly different

result ($p \leq 0.05$). However, there was a vast difference in response to AE[B]. The reduction of number of cells was much more pronounced. The EC_{50} value of this batch was $333 \pm 18 \mu\text{g/mL}$, whereas the EC_{50} value was not determinable for the other two test mixtures (AE[A] and SPM).

3.5 Minor concentrations of H_2O_2 formed by AE and SPM

To identify mechanisms behind the detected effects of AE on transcriptional level and the differences of both AE batches and the SPM, their pro-oxidative potential was investigated using the FOX assay. After incubation of the AE (0–510 $\mu\text{g/mL}$) in LT97 cell culture medium for 24 h, H_2O_2 was detectable but in very low concentrations. The formation of H_2O_2 induced by AE[A] and that by AE[B] were not significantly different. Only for 510 $\mu\text{g/mL}$ AE[A] significant amounts of H_2O_2 (7 μM) were detectable compared to medium control. After addition of SPM to cell culture medium, no H_2O_2 generation was detectable for any tested concentration or for the solvent control. The concentration used for gene expression and comet assay, thus resulted in $<1 \mu\text{M}$ H_2O_2 in LT97 cultures (128 $\mu\text{g/mL}$ AE).

4 Discussion

Phenolic compounds isolated from apples are implicated in preventing diseases related to oxidative stress, like cancer development [40]. For AE[A], prepared from apple juice, an induction of *GSTT2* mRNA has been shown in human colon cells *in vitro* [22]. Since little is known about *GSTT2*, it was of interest to determine whether the modulation of *GSTT2* could result in functional consequences and reduce DNA damage induced by the *GSTT2*-2 substrate CumOOH. Since the original AE[A] batch was depleted during experimental work, another batch from the same cultivar year and production line (AE[B]) was used for further investigations. Storage conditions of the two AE batches differed, thus the phenolic composition of AE[B] was analyzed to compare this batch to AE[A]. Vast differences in phenolic composition and concentration were detected. It is already known that phenolic compounds undergo various changes during storage caused by oxygen [41], pH [42], UV light [43] and temperature [41, 43, 44]. The resulting degradation products most probably have different biological activities. Storage of the AE resulted in decrease of polyphenols, especially of procyanidins, (-)-epicatechin and quercetin glycosides, whereas aglycons like quercetin and the apple-specific phloretin appeared. These results confirm the findings of Spanos *et al.* [45] that storage of apple juice concentrates for nine month at 25°C causes a decline of cinnamic acids, quercetin glycosides and total loss of procyanidins. Also, experiments with a polyphenol extract of *Myrtus communis* L. demonstrated the instability

of flavonoids during 1 year of storage. The unaltered polyphenol composition was only preserved for the initial 3 months and the antioxidant activity of this extract could be provided over this time period [46]. For SPM, polyphenol concentrations equivalent to those of AE[A] were mixed, but the limited commercial availability of the single compounds prohibited the complete reproduction of AE. Substances in SPM were found in both AE batches, but in different amounts. Nevertheless, it should be pointed out that the total composition of the AE has not yet been completely elucidated. It has been estimated that only 50% of all polyphenols in the AE have so far been identified. Recently, Huemmer *et al.* [31] published a method that enabled the detection and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins; using this method the elucidation of nearly all the phenolic AE composition is possible.

In a first set of experiments using AE[A] aimed at determining whether the already detected up-regulation of *GSTT2* resulted in reduced DNA damage generated by the *GSTT2*-2 substrate CumOOH, a distinct protection was seen against CumOOH, as well as against H_2O_2 , in LT97 adenoma cells. These data were obtained under conditions that make distinct enzymatic activity unexpected. Thus, there are only non-enzymatic processes that are responsible for detected protective effects. Excluding direct interaction between polyphenols and the genotoxic compounds CumOOH/ H_2O_2 , modulation of redox state by polyphenols *via* increasing intracellular glutathione (GSH) level is possible. GSH represents one of the most important endogenous antioxidant defense systems, and GSH synthesis is known to be induced in response to polyphenols [47, 48]. The tripeptide GSH can directly detoxify H_2O_2 , other peroxides and free radicals; hence, increased GSH levels implicate an enhanced cell protection against exogenously induced oxidative stress [49, 50]. Therefore, GSH should be considered in further investigations using a freshly extracted polyphenol mixture from apple juice.

We have been able to show that pre-incubation of HT29 cells with chlorogenic acid reduced the DNA-damaging effects of H_2O_2 [51]. Since chlorogenic acid is the main polyphenolic compound in both AE batches and SPM, we conclude that the protective action against H_2O_2 could be achieved by this substance. As AE[B] and SPM contain equal amounts of chlorogenic acid, this hydroxycinnamate may be irrelevant for protection against CumOOH.

To investigate possible effects of enzymatic detoxification, the protocol was modified. As the supply of AE[A] was used up, these experiments were not possible with AE[A]. Neither AE[B] nor SPM induced *GSTT2* or protected against CumOOH-induced DNA damage. Thus, we could not confirm a causal correlation between *GSTT2* up-regulation and protection against CumOOH found by others in genetically modified cells [52].

The procyanidins with high molecular weight (400 mg/g AE[A] [31]) might play an important role for the detected

chemopreventive effects of AE, since they are a predominant polyphenolic fraction in apples and though to have beneficial health properties [11, 53, 54]. Procyanidins have a pronounced instability during storage [45] and they are not commercially available. Thus, they were not present in either AE[B] or SPM, which may explain their inactivity regarding *GSTT2* up-regulation and protection against genotoxicity of CumOOH. Despite this inactivity, SPM showed almost the same effects on LT97 cell number as AE[A], indicating that modulation of *GSTT2* and inhibition of proliferation are mediated *via* different mechanisms. AE[A] and SPM were also equally anti-proliferative in HT29 cells after treatment for 24 h [22]. However, the impact of AE on cell number was more pronounced in LT97 cells compared to HT29 cells [23], and AE[B] showed an even larger effect on LT97 cell proliferation than AE[A]. This result was surprising since this batch contained far fewer polyphenols than the AE[A]. But AE[B] contained more aglycons as a consequence of glycoside degradation. A former analysis of the impact of quercetin glycosides on HT29 cell proliferation demonstrated that it did not reduce cell number even after treatment for 72 h, whereas reduction of HT29 cells was pronounced with quercetin [22]. It has also been demonstrated that reduction of LT97 cell number by quercetin results from apoptosis [55]. Therefore, the more active aglycons, which are only present in AE[B], could be responsible for the observed differences in growth inhibitory properties compared to AE[A] and SPM. The effective concentrations of single compounds in HT29 and LT97 cells by far exceed concentrations detected in AE[B]. For instance, the concentration of AE[B] that reduced LT97 cell number by 80% contained only 1.9 μM quercetin while Kaindl *et al.* [55] found an EC_{50} for quercetin of 48 μM . Furthermore, Srivastava *et al.* [44] found that storage of phenolic extracts reduces growth inhibitory potential of extracts rather than accelerating it.

The pro-oxidative capacity of phenolic substances in aqueous phases may be involved in modulation of cell growth [56]. Fridrich *et al.* [54] found that formation of H_2O_2 induced by apple polyphenols in cell culture medium modulates cellular response even though the mechanism seems to be complex. For LT97 cell culture medium, no or only marginal formation of H_2O_2 with AE or SPM was observed. Nonetheless, we assume that oxidation of apple phenolic compounds still occurs since we found evidence for the oxidation in the brownish color change as described by Kader *et al.* [57]. H_2O_2 formed by this oxidation processes is not detectable due to reduced stability in this particular medium [39]. In addition, results with AE[A] in HT29 cell culture medium (DMEM with 10% FCS), revealed an extensive formation of H_2O_2 ($240 \pm 8 \mu\text{M}$ H_2O_2 with 510 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AE after 24 h, data not shown). Both media differ in their concentration of transition metals. Higher amounts of transition metals in MCDB cell culture medium may result in H_2O_2 instability due to Fenton reac-

tion, explaining low detectable H_2O_2 concentrations. Nevertheless, this would also mean that the cells are exposed to even more reactive oxygen species. Whether the resulting radicals are able to induce intracellular response is doubtful due to their high reactivity.

However, *in vitro* results generated with an isolated mixture of different polyphenols should be interpreted carefully, because recently published data about bioavailability and bacterial degradation of polyphenols demonstrate the actual and physiological situation in the human gut. Kahle *et al.* [58] have shown that after apple juice intake only a limited amount of ingested polyphenols reach the colon unmetabolized in healthy ileostomy patients, *e.g.*, recovery of chlorogenic acid and 3-*p*-coumaroylquinic acid in ileostomy bags was 10.2% and 33.1%, respectively. Therefore, regarding single compounds, 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AE seems to be quite high. But this concentration corresponds to a polyphenol content of approximately 0.5–1 L apple juice. Overall, it will be important to repeat the investigations with degradation products of polyphenols reflecting physiological conditions in the human gut more closely.

In conclusion, AE can reduce DNA damage induced by oxidative stress in adenoma cells *in vitro*. Nevertheless, our results indicate that storage conditions caused changes in stability, and thus in the particular composition of the polyphenolic extracts, accompanied by modifications in biological effectiveness of AE. Some possible active compounds of the AE are not part of the SPM as they are either not commercially available or have not been so far identified in the AE.

The authors acknowledge grant funding from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, FKZ.01EA0103), Germany. They thank Prof. Brigitte Marian, Institute of Cancer Research, University of Vienna, Austria for the generous gift of LT97 adenoma cells and our collaboration partner Melanie Olk, Dr. Frank Will and Prof. Dr. Helmut Dietrich for providing the apple extract. Furthermore, we thank Dr. Yvonne Knöbel and Esther Woschee for technical assistance and Daniel Scharlau for proof-reading. This manuscript is dedicated to Beatrice L. Pool-Zobel.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, AICR, Washington, DC, 2007.
- [2] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 2005, 55, 74–108.
- [3] Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S., Cancer phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level. *Phytother. Res.* 2008, 22, 567–577.

- [4] Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E., Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro* 2006, 20, 187–210.
- [5] Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellewaara, M., *et al.*, Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* 1997, 146, 223–230.
- [6] Arts, I. C., Hollman, P. C., Feskens, E. J., Bueno de Mesquita, H. B. *et al.*, Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2001, 55, 76–81.
- [7] Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., Bose, P., Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5315–5321.
- [8] Kern, M., Tjaden, Z., Ngiewih, Y., Puppel, N., *et al.*, Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 317–328.
- [9] Barth, S. W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., *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.
- [10] Kern, M., Pahlke, G., Balavenkatraman, K. K., Bohmer, F. D., *et al.*, Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4999–5006.
- [11] Gosse, F., Guyot, S., Roussi, S., Lobstein, A., *et al.*, Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005, 26, 1291–1295.
- [12] Veeriah, S., Miene, C., Habermann, N., Hofmann, T., *et al.*, Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int. J. Cancer* 2008, 122, 2647–2655.
- [13] Hayes, J. D., Strange, R. C., Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000, 61, 154–166.
- [14] Sherratt, P. J., Pulford, D. J., Harrison, D. J., Green, T., *et al.*, Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem. J.* 1997, 326, 837–846.
- [15] Tan, K. L., Board, P. G., Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem. J.* 1996, 315, 727–732.
- [16] Hussey, A. J., Hayes, J. D., Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem. J.* 1992, 286, 929–935.
- [17] Hiratsuka, A., Nishijima, T., Okuda, H., Ogura, K., *et al.*, Rat liver theta-class glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: Their chromatographic, electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal. Biochem.* 1997, 252, 229–237.
- [18] Hiratsuka, A., Yamane, H., Yamazaki, S., Ozawa, N., *et al.*, Subunit Ya-specific glutathione peroxidase activity toward cholesterol 7-hydroperoxides of glutathione S-transferases in cytosols from rat liver and skin. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 4763–4769.
- [19] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 45, 51–88.
- [20] Hussey, A. J., Kerr, L. A., Cronshaw, A. D., Harrison, D. J., *et al.*, Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle. Evidence for the existence of heterodimers. *Biochem. J.* 1991, 273, 323–332.
- [21] Chaudiere, J., Wilhelmsen, E. C., Tappel, A. L., Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 1043–1050.
- [22] Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., *et al.*, Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinog.* 2006, 45, 164–174.
- [23] Veeriah, S., Hofmann, T., Glei, M., Dietrich, H., *et al.*, 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.* 2007, 55, 2892–2900.
- [24] Long, L. H., Clement, M. V., Halliwell, B., Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 273, 50–53.
- [25] Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H., Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000, 486, 10–13.
- [26] Akagawa, M., Shigemitsu, T., Suyama, K., Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, 67, 2632–2640.
- [27] Hiramoto, K., Kida, T., Kikugawa, K., Increased urinary hydrogen peroxide levels caused by coffee drinking. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 1467–1471.
- [28] Long, L. H., Halliwell, B., Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic. Res.* 2000, 32, 463–467.
- [29] Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H., Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: Analytical data of the corresponding juices. *Eur. Food Res. Technol.* 2000, 211, 291–297.
- [30] Knoll, N., Ruhe, C., Veeriah, S., Sauer, J., *et al.*, Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol. Sci.* 2005, 86, 27–35.
- [31] Huebner, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., *et al.*, Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnol. J.* 2008, 3, 234–243.
- [32] Kahle, K., Kraus, M., Richling, E., Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 797–806.
- [33] Richter, M., Jurek, D., Wrba, F., Kaserer, K., *et al.*, Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns *in vitro*. *Eur. J. Cancer* 2002, 38, 1937–1945.
- [34] Knoll, N., Weise, A., Claussen, U., Sendt, W., *et al.*, 2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions. *Mutat. Res.* 2006, 594, 10–19.
- [35] Klenow, S., Pool-Zobel, B. L., Glei, M., Influence of inorganic and organic iron compounds on parameters of cell growth and survival in human colon cells. *Toxicol. In Vitro* 2009, 23, 400–407.

- [36] Collins, A. R., The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004, 26, 249–261.
- [37] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., *et al.*, Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000, 35, 206–221.
- [38] Jaeger, J., Sorensen, K., Wolff, S. P., Peroxide accumulation in detergents. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1994, 29, 77–81.
- [39] Klenow, S., Glei, M., Haber, B., Owen, R., *et al.*, Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 1389–1397.
- [40] Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., *et al.*, Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 24–33.
- [41] van der Sluis, A. A., Dekker, M., van Boekel, M. A., Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1073–1080.
- [42] Friedman, M., Jurgens, H. S., Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2101–2110.
- [43] Holzschuh, M. H., Silva, D. M., Schapoval, E. E., Bassani, V. L., Thermal and photo stability of phenolic constituents of an *Achyrocline satureioides* spray-dried powder. *Pharmazie* 2007, 62, 902–906.
- [44] Srivastava, A., Akoh, C. C., Yi, W., Fischer, J., *et al.*, Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 2705–2713.
- [45] Spanos, G. A., Wrolstad, R. E., Heatherbell, D. A., Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 1572–1579.
- [46] Montoro, P., Tuberoso, C. I., Piacente, S., Perrone, A., *et al.*, Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1614–1619.
- [47] Myhrstad, M. C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R., *et al.*, Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 32, 386–393.
- [48] Moskaug, J. O., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., Blomhoff, R., Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 277S–283S.
- [49] Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G., Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002, 18, 872–879.
- [50] Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 2003, 333, 19–39.
- [51] Glei, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C., *et al.*, Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutr. Cancer* 2006, 56, 182–192.
- [52] Petermann, A., Miene, C., Schulz-Raffelt, G., Palige, K., *et al.*, GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, *in this issue*, DOI: 10.1002/mnfr.200900110.
- [53] Wojdylo, A., Oszmianski, J., Laskowski, P., Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6520–6530.
- [54] Fridrich, D., Kern, M., Pahlke, G., Volz, N., *et al.*, Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 594–601.
- [55] Kaindl, U., Eyberg, I., Rohr-Udilova, N., Heinzle, C., *et al.*, The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 1320–1326.
- [56] Loo, G., Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14, 64–73.
- [57] Kader, F., Irmouli, M., Zitouni, N., Nicolas, J. P., *et al.*, Degradation of cyanidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. Determination of the stoichiometry and characterization of the degradation products. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4625–4630.
- [58] Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Richling, E., Colonic availability of apple polyphenols—a study in ileostomy subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 1143–1150.

3.4. Publikation IV: Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microflora on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97).

Miene Claudia, Weise Anja, Gleis Michael

Nutrition and Cancer. Eingereicht am 11. Juni 2010.

Ein Großteil der aufgenommenen Polyphenole erreicht aufgrund geringer Absorptionsraten den Dickdarm, wo sie einer sofortigen mikrobiellen Metabolisierung unterliegen. Ziel der Studie war es, die Modulation der *GSTT2* und der *COX-2* durch ausgewählte Polyphenolmetabolite (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (ES) und 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (PS), den Abbauprodukten von Quercetin und Kaffee- bzw. Chlorogensäure) zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ES als auch PS die *GSTT2*-Genexpression signifikant induzieren. Als Beleg für eine gesteigerte *GSTT2*-Aktivität konnten auch CumOOH-induzierte DNA-Schäden durch vorherige Inkubation mit den Metaboliten reduziert werden. Demgegenüber wurde die *COX-2*-Expression in LT97 Zellen auf Gen- und Proteinebene signifikant gehemmt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit reinen Polyphenolen spiegelt das Arbeiten mit den Polyphenolmetaboliten die physiologische Situation im Kolon besser wider. Die Untersuchungen belegen erstmalig potentielle chemopräventive Effekte dieser Metabolite. Sie wiesen insgesamt vergleichbare Eigenschaften wie einzelne Polyphenole oder komplexe Mischungen von diesen auf.

Eigenanteil:

- Zellkultur
- Planung und Organisation der Comet Assays
- Planung und Durchführung aller Gen- (*real-time qRT-PCR*) und Proteinexpressionsuntersuchungen (Western Blots)
- Statistische Auswertung, Darstellung und Interpretation der Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes

1 **Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on**
2 **expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97)**

3

4 ¹Claudia Miene *, ²Anja Weise, ¹Michael Glei

5

6 ¹Institute for Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Friedrich-Schiller-University
7 Jena, Dornburger Straße 24, 07743 Jena, Germany

8 ²Institute of Human Genetics and Anthropology, Friedrich-Schiller-University Jena,
9 Kollegiengasse 10, 07743 Jena, Germany (Anja.Weise@mti.uni-jena.de)

10

11

12 *** corresponding author**

13 Dipl. troph. Claudia Miene

14 Tel: + 49 3641 949685

15 Fax: + 49 3641 949672

16 E-mail: claudia.miene@googlemail.com

17

18

19 **Key words:** chemoprevention; COX-2; GSTT2; polyphenol metabolites

20 **Abstract**

21 Polyphenols may play an important role in colon cancer prevention. After entering the colon,
22 they are subjected to metabolism by the human gut microbiota. Therefore, the aim of the study
23 was to determine the effect of selected metabolites on modulation of enzymes involved in
24 detoxication and inflammation, next to the impact on cell number and DNA damage in human
25 adenoma cells LT97.

26 LT97 cells were incubated with 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (ES) and 3-(3,4-
27 dihydroxyphenyl)-propionic acid (PS), metabolites of quercetin and chlorogenic acid/caffeic
28 acid, respectively. The effect on cell number was analyzed using DAPI assay. Modulation of
29 GSTT2 and COX-2 was measured by real-time PCR and Western blot. Comet assay was
30 performed to assess the impact on DNA damage caused by the GSTT2 substrate cumene
31 hydroperoxide (CumOOH).

32 Polyphenol metabolites did not affect cell number, but significantly up-regulated *GSTT2*
33 expression and decreased *COX-2*. The later was confirmed *via* Western blot. CumOOH-induced
34 DNA damage was significantly reduced compared to control.

35 The metabolites are not cytotoxic. An up-regulation of *GSTT2* and down-regulation of *COX-2*
36 could possibly contribute to the chemopreventive potential of polyphenols after degradation in
37 the gut. Working with polyphenol metabolites is an important prerequisite to better understand
38 the *in vivo* effects of pure polyphenols.

39 Introduction

40

41 For colorectal cancer, the second leading cause of cancer death world-wide, there is a limited
42 evidence for prevention by diet rich in fruits and vegetables. Amongst others, this could be due
43 to chemopreventive potential of secondary plant products, namely flavonoids and
44 hydroxycinnamates. Only a limited amount of ingested polyphenolic compounds are absorbed in
45 the small intestine and are subjected to distinct phase II metabolisms, i.e. methylation, sulphate-
46 and glucuronide conjugation [1]. Over 95% of the total ingested polyphenols passes to the
47 colon [2]. However, studies with ileostomy patients have pointed out that after apple juice intake
48 0 – 33% of the administered dose of polyphenols reached the end of the small intestine, and
49 hence also the colon [3]. After entering the colon, polyphenols undergo extensive metabolism by
50 the enzymes of the human gut microbiota [4, 5].

51 Quercetin, the major flavonol in various fruits, vegetables and beverages, usually occurs as
52 glycosides [6]. Thus, the first step of colonic degradation is the deglycosylation by β -
53 glucosidases of human tissues [7] and bacteria such as *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus*
54 *casseliflavus* [8] and *Bacteroides* sp. [9]. Next to others, especially *Eubacterium ramulus* [10]
55 and *Clostridium orbiscindens* [11] are known to further metabolize the aglycons to 3,4-
56 dihydroxyphenylacetic acid (ES) by reduction of double bonds and ring contractions.

57 Chlorogenic acid, an ester of caffeic acid with quinic acid is a representative hydroxycinnamic
58 acid especially present in coffee, and many fruits and vegetables [12]. In the human gut, the ester
59 bond is cleaved and the resulting free caffeic acid is reduced at the aliphatic double bond to
60 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid (PS) by microbiota. Depending on duration of
61 fermentation with faecal slurry, further metabolites are detectable such as 3-(3-hydroxyphenyl)-
62 propionic acid or 3-phenylpropionic acid [13].

63 The interest in fermented products formed in the large intestine, e.g., the short-chain fatty acids
64 (SCFA) as products of bacterial metabolism mainly of indigestible carbohydrates or the
65 metabolites of polyphenols, and their role in colon carcinogenesis start growing rapidly because
66 they reflect the physiological conditions more precisely than working with pure dietary fibre or
67 polyphenols *in vitro*. To assess the chemopreventive potential of flavonoids in the human
68 gastrointestinal tract and to explain the actual biological properties, studies with bacterial
69 metabolites are obligatory.

70 Since apple polyphenol extracts induced expression of genes involved in phase II
71 (e.g. *glutathione S-transferase T2*, *GSTT2*) [14] and the plant flavonoid fisetin is reported to
72 inhibit the phase I enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) [15] in human colon cells, it will be of

73 interest whether fermented gut products of the main hydroxycinnamates and flavonoids from
74 fruits and vegetables show similar effects.

75 Glutathione S-transferases, in general, catalyze the conjugation of electrophiles with glutathione
76 to more hydrophilic and less reactive derivatives [16]. The specific function of GSTT2 enzymes
77 in humans is not completely clear so far. Nevertheless, it is known that GSTT2 exhibit
78 peroxidase activity [17]. Thus, it may be involved in protecting cells against oxidative stress
79 generated during peroxidation of lipids and arachidonic acid. This could be supported by the
80 identified substrates for rat theta class GST [18, 19]. For one, there is the synthetic cumene
81 hydroperoxide (CumOOH), which is also a pronounced substrate for human GSTT2 [18], and for
82 another the endogenous 15-hydroxyperoxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid (15-HpETE). The
83 hydroperoxide 15-HpETE is generated during conversion of arachidonic acid catalyzed by 15-
84 lipoxygenase. It is known that rat GSTT2 is involved in reduction to its hydroxyl derivative 15-
85 hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid (15-HETE) [20] (Figure 1).

86 Further derivatives of the arachidonic acid could be classified in three different classes of
87 inflammatory mediators, namely prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes [21]. The first
88 step of their formation is catalyzed by the key enzymes cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1 and
89 COX-2), where arachidonic acid is converted into prostaglandin G₂ and then metabolized to a
90 series of postanoids (reviewed in [21]) (Figure 1). While COX-1 is ubiquitous and constitutively
91 expressed in most tissues to keep up physiological functions, COX-2 is generally absent in
92 normal cells [22]. However, COX-2 is rapidly induced by pro-inflammatory stimuli and growth
93 factors (reviewed in [23]). Furthermore, it is often selectively overexpressed in ~ 40% of colon
94 adenomas and ~ 80% of colon tumours [24], suggesting an association between COX-2-
95 dependent inflammatory processes and colorectal cancer [25]. Harris *et al.* summarized the
96 results of case control studies, which clearly implicate a significant colon cancer risk reduction
97 by the use of selective COX-2 inhibitors [26].

98 So far, less is known about chemopreventive properties of polyphenol metabolites formed in the
99 human gut. In view of the interest in COX-2 inhibitors and inductors of detoxifying enzymes as
100 colon cancer preventive agents, it was the objective of this study to investigate the effect of ES
101 and PS in physiological concentrations on gene and protein expression of GSTT2 and COX-2 in
102 LT97 colon adenoma cells as well as possible functional consequences of modified cellular
103 levels of these enzymes. To characterize the stability of the applied cell line LT97 during
104 continuous cell culture and to estimate the adequacy for *in vitro* investigations we have re-
105 analyzed the karyotype using 24-colour fluorescence in situ hybridisation (FISH), first at all.

106

107 **Material and methods**

108

109 *Cell culture and reagents*

110 The human colorectal adenoma cell line LT97 represents an early stage of tumor development
111 (kind gift from Professor B. Marian, Institute for Cancer Research, University of Vienna,
112 Austria). The cell line was established from colon microadenoma from a patient with hereditary
113 familial polyposis and has an almost normal karyotype [27]. LT97 cells were maintained in
114 MCDB culture medium with 2% fetal calf serum and supplements according to Klenow *et al.*
115 [28]. The two polyphenol metabolites ES and PS were purchased from Fluka, Deisenhofen,
116 Germany. Applied concentrations for the *in vitro* experiments were chosen according to the
117 detected physiological range of aromatic compounds in human faecal water [5]. The different
118 concentrations of ES and PS used in the present study are deduced from data obtained from a
119 human intervention study with cloudy apple juice, in which PS could be detected in much higher
120 concentration in faecal water of the male volunteers than ES [29].

121

122 *Karyotype analysis of LT97 cells (24-colour FISH)*

123 LT97 cells were arrested with Colcemid (demecolcine in PBS, Biochrom AG, Berlin, Germany),
124 treated with hypotonic solution and fixated with methanol/glacial acetic acid (3:1) according to
125 standard protocols [30]. Afterwards, metaphase suspension was dropped on glass slides and pre-
126 treated with pepsin to remove cytoplasm proteins. Further steps, namely 24-colour FISH
127 including chromosome-labelling with 5 fluorochromes or ligands and counter staining with
128 4'-6-diamino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) was done as described before [31].
129 Evaluation with an Axioplan 2 imaging fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany)
130 equipped with "ISIS3" digital FISH imaging system (Meta-Systems, Altlussheim, Germany)
131 using a PCO VC45 CCD camera with on-chip integration (PCO, Kehl, Germany) were
132 accomplished as described and cited by Schaeferhenrich *et al.* [32]. All in all, 11 – 12
133 metaphases of each passage of the cell line (passage 12 and 13) were evaluated to determine one
134 composite karyotype (cp).

135

136 *Determination of LT97 cell growth*

137 To exclude cytotoxic effects in LT97 cells and to define concentrations within a physiological
138 range for following experiments, the impact of ES and PS on cell number was determined in
139 96 well microtiter plates using the 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) assay. Therefore, LT97
140 cells were grown up to a confluence of approximately 40%, exposed to 0 – 18 μ M ES or

141 0 – 90 μ M PS and maintained in culture for 24 h, 48 h and 72 h. Cell number analysis was
142 carried out according to the principle as previously described [33]. For each sample and control,
143 the fluorescence of DAPI-stained DNA, which reflects the cell number, was measured
144 (excitation 360 nm/ emission 465 nm, TECAN Spectrafluor GmbH, Grailsheim, Germany).

145

146 *Gene expression analysis using real-time PCR*

147 To investigate the influence of polyphenol metabolites on modulation of *GSTT2* and *COX-2* gene
148 expression, LT97 cells at subconfluent stages were incubated with ES and PS in concentrations
149 ranging from 2.5 μ M to 10 μ M and 5 μ M to 25 μ M, respectively, for 12 h, 24 h and 48 h. After
150 harvesting the cells, RNA was isolated using the Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Hilden,
151 Germany) and RNA quality was characterized by determination of the RNA Integrity Number
152 (RIN) using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, United States). Only RNA with RIN
153 \geq 8.5 was used for the described experiments. First-strand cDNA synthesis from 2.5 μ g RNA
154 was performed by Super ScriptTMII Reverse Transcriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
155 Germany) using poly-(dT) primers and *GSTT2* and *COX-2* gene expression was evaluated by
156 quantitative real-time PCR using SYBR Green[®] as DNA stain (iCycler IQ[®], Bio-Rad GmbH
157 München, Germany) as described by Veeriah *et al.* [34]. The relative mRNA modulation is
158 expressed as fold difference to the medium treated controls normalized to the housekeeping gene
159 *GAPDH*.

160

161 *Protein expression analysis using Western blot*

162 To verify the reduction of *COX-2* gene expression data on protein level, LT97 cells were
163 incubated with ES and PS in effective doses (5 μ M, 10 μ M and 15 μ M, 25 μ M, respectively) for
164 24 h and 48 h. Untreated cells (medium control) were included in each experiment. After
165 treatment, cells were harvested and washed with PBS. Cell viability and cell number were
166 determined with CASY cell counter (CASY[®]-TT, innovates AG Reutlingen, Germany), before
167 cells (approximately 30 – 45 x 10⁶) were lysed in freshly prepared extraction buffer (20 mM
168 Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P40, 1 mM
169 dithiothreitol, 1 mM sodium-orthovanadate, 1x Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini,
170 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)). The homogenate was centrifuged (~16.000 g,
171 60 min, 4°C) and an aliquot of the resulting supernatant was first used for determination of
172 protein concentration according to the colorimetric method of Bradford [35] with bovine serum
173 albumin as standard protein.

174 Cell lysates (50 µg protein per lane), denatured at 95°C for 5 min in sample buffer (250 mM
175 Tris-HCl, 10% SDS, 50% glycerol, 0.1% bromphenol blue, 0.5 M dithiothreitol), were size-
176 fractionated in 12% (w/v) SDS-polyacrylamide gel (200 V, 45 min) prior to transfer to
177 nitrocellulose at 100 V for 60 min (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Membranes were
178 then blocked with 3% milk protein for 1 h at room temperature before they were incubated
179 overnight with diluted antibodies (rabbit anti-COX-2: 1:250, Cell Signaling Technology,
180 Frankfurt, Germany). As loading control, a mouse anti-β-actin antibody (1:100.000, Sigma-
181 Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) was applied in parallel. The specificity of the
182 COX-2-antibody was determined by using a recombinant protein of human COX-2 (Biozol,
183 Eching, Germany) and checking the molecular weight via biotinylated protein ladder
184 (Biotinylated Protein Ladder Detection Pack, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany).
185 After washing, the blots were probed with respective secondary antibodies (polyclonal goat anti-
186 rabbit immunoglobulins or polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins, DAKO Denmark
187 A/S, Glostrup, Denmark) conjugated with horseradish peroxidase (1:800) for 1 h at room
188 temperature. A further wash step followed prior the visualisation of specific protein bands by
189 enhanced chemiluminescence (PIERCE ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher
190 Scientific, Bonn, Germany) was performed. Densitometric quantification was realized with
191 “Fluor STM Multi Imager” and the software “Quantity One 4.0” (BioRad, München, Germany).
192 Relative protein expression levels were normalized to the loading control β-actin.

193

194 *Challenge with CumOOH using comet assay*

195 Further it was of interest whether the modulation of *GSTT2* mRNA can also be reflected on
196 activity level of the corresponding enzyme. Due to the unavailability of a specific assay for
197 *GSTT2* activity, the enzyme activity was indirectly measured by investigating the ability of
198 incubated cells to inhibit DNA damage.

199 Therefore, LT97 cells were incubated with ES and PS for 12 h in concentrations (2.5 µM and
200 5 µM, respectively) that induced *GSTT2* gene expression. After cell harvest, they were damaged
201 with the pronounced *GSTT2* substrate CumOOH [36, 18] (0 – 150 µM) for 15 min at 37°C prior
202 to embedding them on glass slides. The damage conditions will allow enzymatic activity of
203 *GSTT2*. Neither the incubation with the metabolites nor the damage with the genotoxic
204 CumOOH affected the cell viability. The comet assay was carried out under conditions described
205 earlier by Tice *et al.* and Gleib *et al.* [37, 38]. DNA damage was microscopically quantified using a
206 ZEISS Axiovert 25 microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) and an image analyzing
207 system of Perceptive Instruments (Suffolk, UK, www.perceptive.co.uk). 3 x 20 cells were scored

208 per experiment and the mean of tail intensity (TI; percentage of fluorescence in the tail) was
209 calculated in percentage relative to the control treated with the highest CumOOH concentration
210 (150 μ M) for normalization.

211

212 *Statistical evaluation*

213 Statistical analysis was performed using the GraphPad[®] Prism software Version 5.0 (GraphPad[®]
214 Software Inc., San Diego, USA). All experiments were repeated independently at least three
215 times unless indicated otherwise. Means and standard deviation (SD) were calculated.
216 Differences between medium control and treatments with polyphenol metabolites were
217 calculated using one-way ANOVA including Bonferroni's multiple comparison test. Impact of
218 metabolite treatment on protection against CumOOH-induced DNA damage was tested using
219 two-way ANOVA including Bonferroni's multiple comparison test. Differences with p values
220 < 0.05 were considered significant.

221

222 Results

223

224 *The karyotype of LT97 cells remained stable*

225 In comparison with former results of Schaeferhenrich *et al.* [32], the chromosome analysis with
226 24-colour FISH revealed that the karyotype of LT97 cells is largely consistent during continuous
227 cell culture over years. The cell clones showed the same structural aberrations as previously
228 indicated. Translocations between chromosomes 7 and 17 as well as between 1 and 18 are still
229 present. Additionally, small extra-chromosomal DNA fragments – double minutes (dmin) – were
230 detectable. These double minutes are typically observed in transformed cells [39]. According to
231 ISCN 2009 [40] the karyotype can be described as follows:

232 passage 12: 46~48,XX,+der(1)t(1;18),+der(7)t(7;17),-18,+dmin[cp12]

233 passage 13: 38~47,XX,+der(1)t(1;18),+der(7)t(7;17),-18,+1~2dmin[cp11].

234

235 *ES and PS were not cytotoxic*

236 Even at high concentrations, ES and PS had no impact on number of cells. Within all tested time
237 points (24 h – 72 h) and concentrations (0 – 18 μ M ES or 0 – 90 μ M PS) of the metabolites no
238 cytotoxic effects could be measured in LT97 cells (Figure 2). Thus, concentrations of ES and PS
239 were selected for further *in vitro* experiments, only based on data obtained from a human apple
240 juice intervention study [29] and the already published faecal water contents [5].

241

242 *ES and PS up-regulated GSTT2 and decreased COX-2 gene expression*

243 Focussing on *GSTT2* and *COX-2* gene expression, there was an influence of the polyphenol
244 metabolites ES and PS in LT97 cells (Figure 3). Both test compounds (ES 2.5 μ M and PS 5 μ M)
245 enhanced *GSTT2* mRNA expression after 12 h incubation (each with 1.7 fold). Furthermore, PS
246 15 μ M also up-regulated *GSTT2* expression levels after 48 h treatment (fold change 1.8)
247 (Figure 3A). Looking at further time points, ES and PS caused a slight, but mostly insignificant
248 decrease. Thus, neither a dose- nor a time-dependent effect could be generally detected.

249 In contrast, *COX-2* mRNA was reduced by incubation with ES in most of the tested
250 physiological concentrations for 12 h, 24 h and 48 h (up to 0.5 fold). A treatment with PS caused
251 a similar effect. Especially, 24 h and 48 h PS incubation decreased *COX-2* expression, whereas a
252 12 h incubation time had almost no effect (Figure 3B).

253

254

255

256 *ES and PS also reduced COX-2 protein expression*

257 Densitometric evaluation of the x-ray films revealed a time- and compound-dependent impact of
258 ES and PS on modulation of COX-2 proteins. Contrary to the gene expression results, the 24 h
259 incubation with these test compounds could not significantly alter COX-2 protein level
260 (Figure 4A). Merely for 25 μ M PS, a decrease was indicated, but without statistical significance
261 (fold change of 0.67). However, a significant decline was observed by ES as well as PS after
262 48 h. Both test compounds modulated the COX-2 protein level in LT97 cells in a concentration-
263 dependent manner (Figure 4B).

264

265 *Genotoxicity of CumOOH was modulated by ES and PS*

266 To verify the *GSTT2* gene expression results, the comet assay with CumOOH was carried out to
267 evaluate the enzyme activity of GSTT2. In general, CumOOH was significantly genotoxic in
268 LT97 cells in a dose dependent manner (black bars, Figure 5). As depicted in Figure 5, pre-
269 treatment with ES and PS at concentrations, which are known to induce *GSTT2* gene expression,
270 reduced CumOOH-induced DNA damage compared to medium treated controls after 12 h
271 incubation. In the mean of all tested concentrations of ES and PS, DNA damage could be
272 diminished by 11% and by 25%, respectively. The effect reached significance after damage with
273 18.8 μ M CumOOH for ES (-16%) and 150 μ M CumOOH for PS (-27%).

274 Discussion

275

276 Colon cancer, caused frequently by the typical diet and lifestyle in Western countries, is one
277 of the most common malignant alterations in the world. A continuous exposure of the
278 epithelial cells in the human gut to compounds of dietary, microbial or metabolic origin may
279 act as a potential risk factor. In contrast, phenolic compounds are known to exhibit
280 chemopreventive capacity by affecting all stages of carcinogenesis.

281 Nevertheless, effects resulted from working with pure polyphenols or extracted mixtures in
282 cell culture are difficult to evaluate. The polyphenols undergo a wide range of different
283 metabolism and degradation processes during the passage through the human gut [41, 5].
284 Thus, the applied concentrations and compositions used for experiments are often not
285 consistent with the physiological situation in the colon. Therefore, the need of a comparative
286 investigation with polyphenol metabolites will be supported, not least because this is an
287 important prerequisite to better understand the *in vivo* effects.

288 The karyotype of the colon adenoma cell line LT97 proved to be stable during continuous cell
289 culture for years [32]. Hence, the adequacy of these cells for *in vitro* investigations could be
290 approved. LT97 cells are especially suited for investigations focussing putative
291 chemopreventive effects.

292 Fruits contain a mixture of quite different polyphenols [42]. Taking the quantities into
293 account, quercetin and chlorogenic acid are often the most common ones. ES and PS are the
294 corresponding metabolites produced by the colonic microbiota. For each experiment,
295 physiological concentrations of the two polyphenol metabolites ES and PS were selected
296 according to the data obtained from a human apple juice intervention [29] and the already
297 published faecal water contents [5].

298 Since polyphenol mixtures isolated from fruit juices and its fermented gut products are known
299 for their strong antiproliferative potential in colon adenoma and carcinoma cells [43, 33], both
300 metabolites were also tested for these properties. However, ES and PS had no impact on LT97
301 cell number, even at non-physiological high concentrations. This result is not surprising, since
302 also single polyphenols hardly showed any or at most marginal growth inhibitory effects [34].
303 Therefore, additive and synergistic effects of the polyphenols or additional, biological active
304 constituents in the mixtures must be responsible for the observed declines in cell number.
305 Moreover, degradation processes by the intestinal microflora caused loss of the characteristic
306 polyphenolic structure and hence formation of SCFA derivatives. For those, except for

307 butyrate, only a slight effect on cell number has been described in colon tumour (HT29) and
308 normal epithelial cells (FHC) [44].

309 The inhibition of phase I drug-metabolizing enzymes and the induction of phase II enzyme
310 activity, is one mechanism to modulate toxicity of endogenous and exogenous compounds.

311 Polyphenols are considered to increase the activity of phase II enzymes, like GSTs and UDP
312 glucuronosyltransferases [14]. Jang *et al.* observed that *GSTT2* promoter polymorphisms are

313 associated with colorectal cancer risk in the Korean population and thus, emphasize *GSTT2*
314 as a potential chemopreventive target [45]. For a polyphenol extract isolated from apple juice,

315 the induction of *GSTT2* gene expression in human colon adenoma (LT97) and carcinoma cells
316 (HT29) was already shown [34, 14]. Also SCFA, especially butyrate, enhanced *GSTT2* gene

317 expression in human primary colon cells [46]. These observed effects could be verified with
318 ES and PS after 12 h incubation of the LT97 cells. Nevertheless, no dose- and time-response

319 relationship of both metabolites could be determined. Therefore, they seem to only have
320 inducing capacities in a narrow time frame. Indeed, a missing dose-response is not

321 inconvenient. Schaefer *et al.* reported a reduction of tert-butylhydroperoxide (TBH)-induced
322 ROS level and a modulation of menadione-induced DNA damage by apple polyphenol

323 extracts reconstituted mixtures and single polyphenols in HT29 or Caco-2 cells. These effects
324 were not linear linked to the concentrations of the test compounds [47, 48]. Also phenolic

325 degradation products, *e.g.*, ES, 3-hydroxyphenyl acetic acid and 3-(4-hydroxyphenyl)-
326 propionic acid, modulated TBH-induced ROS level independent of the application rate [49].

327 According to the missing of a specific, commercial available human anti-*GSTT2* antibody
328 and the closely connected failure in interpretation and evaluation, the results could not be

329 verified at protein level (data not shown). But elevated levels of *GSTT2* are causally linked
330 with protection against genotoxic stress [36]. Therefore, it was additionally of interest,

331 whether the up-regulation of *GSTT2* results in reduced DNA damage generated by the
332 pronounced substrate CumOOH [36, 18]. Using the comet assay method, it was found that

333 pre-treatment with ES and PS at concentrations, which induced *GSTT2* gene expression,
334 reduced CumOOH-induced DNA damage compared to medium treated controls. These results

335 are comparable with those obtained from an *in vitro* study with an apple polyphenol extract,
336 which also decreased genotoxicity of CumOOH in LT97 cells [50]. The direct connection

337 between this genotoxicity on the one hand and *GSTT2* activity on the other hand was
338 demonstrated by Petermann *et al.* [36]. Hence, this substrate was suitable for the analysis of

339 functional consequences resulting from modulation of *GSTT2* gene expression. Nevertheless,
340 further enzymes, such as GSTA1 and GSTK1, are involved in CumOOH detoxification

341 processes [16]. Therefore, it cannot be excluded that these enzymes also contributed to the
342 antigenotoxic effects of ES and PS. The mechanism behind the transcriptional modulation of
343 *GSTT2* expression is not yet identified. Most of the protective detoxification and antioxidant
344 genes are regulated *via* the Nrf2/antioxidant-response element (ARE) pathway [51]. However,
345 working with HT29 cells containing a *GSTT2* promoter construct and Nrf2-inducing
346 compounds, this pronounced mechanism for regulation could not be validated [36, 52]. Thus,
347 further investigations for detailed information are necessary.

348 Simultaneously to the modulation of phase II biotransformation, several *in vitro* studies have
349 demonstrated that certain polyphenols or appropriate natural mixtures possess inhibitory
350 effects on cytochrome P450 gene expression and enzyme activity [53, 54]. A further phase I
351 enzyme COX-2 mediates prostaglandin synthesis and thus may play a key role in colon
352 carcinogenesis. A direct inhibition of COX-2 activity and hence inflammatory processes by
353 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may reduce the risk for colon cancer
354 development [55]. In the present study ES and PS showed pronounced COX-2 inhibitory
355 effects. Both, COX-2 mRNA and protein levels, detected with real-time PCR and Western
356 blot, respectively, were altered in a similar direction. However, COX-2 protein was mainly
357 reduced after 48 h incubation, but hardly at 24 h. This could be explained by the fact that
358 protein synthesis occurs deferred to transcriptional mechanisms. Our results concerning COX-
359 2 decrement enlarge studies by Karlsson *et al.*, in which human faecal water samples
360 containing phenolic degradation compounds (*e.g.*, phenylacetic acid, phenylpropionic acid,
361 cinnamic acid derivatives) decreased the COX-2 protein level after stimulation of HT29 cells
362 with TNF- α . Thus, next to NSAIDs, natural compounds in the diet and whose degradation
363 products could also represent putative COX-2 inhibitors. This fact is supported by Huss *et al.*,
364 who screened different plant constituents for their COX-2 inhibitory properties [56]. Similar
365 results were reported for quercetin and chlorogenic acid *in vitro* and *in vivo* [57, 58, 59].

366 Plummer *et al.* could clarify one possible molecular mechanism explaining how
367 chemopreventive agents can act as COX-2 inhibitors [60]. It was shown that curcumin
368 interfered in the NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
369 pathway by diminishing activity of IKK (inhibitor kappa B kinase) and thus, expression of the
370 target genes. Inhibition of kinases or proteasome function involved in this pathway may also
371 be important mechanisms by which especially SCFA mediate their anti-inflammatory effects
372 [61]. To specify direct targets of our test compounds altering COX-2 expression, further
373 investigations are necessary.

374 In conclusion, polyphenol metabolites have shown a comparable chemopreventive mode of
375 action to single or complex mixtures of polyphenols, or SCFA. This means that they are able
376 to modulate cellular mechanisms connected to biotransformation, namely induction of
377 detoxification enzymes, and reduction of activity of enzymes related to inflammatory
378 processes. Thus, the conversion of normal or benign altered cells to carcinoma cells during
379 colon carcinogenesis could be attenuated by the intake of fruits and vegetables linked with the
380 ingestion of polyphenols and the generation of their degradation products.

381 **Acknowledgements and Notes**

382 The authors acknowledge grant funding from the *Bundesministerium für Bildung und*
383 *Forschung* [FKZ 01EA503], Germany, and they thank Prof. Brigitte Marian, Institute of
384 Cancer Research, University of Vienna, Austria for the generous gift of LT97 adenoma cells.
385 Furthermore, we are grateful to PD Dr. Thomas Liehr for kind provision of reagents and FISH
386 probes to realize karyotyping of the LT97 cells.

387

388 The authors have no conflicts of interest. This article represents original work and has not
389 been submitted to any other journals and if accepted for *Nutrition and Cancer* it will not
390 be published elsewhere.

391

392 References

393

394 [1] Scalbert, A., Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J*
395 *Nutr*, 130, 2073S-2085S, 2000

396 [2] Clifford, M. N.: Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for
397 health. *Planta Med.* 70, 1103-1114, 2004

398 [3] Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Richling, E.: Colonic availability of apple
399 polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Mol. Nutr Food Res* , 49, 1143-
400 1150, 2005

401 [4] Blaut, M., Schoefer, L., Braune, A.: Transformation of flavonoids by intestinal
402 microorganisms. *Int. J Vitam. Nutr Res* , 73, 79-87, 2003

403 [5] Jenner, A. M., Rafter, J., Halliwell, B.: Human fecal water content of phenolics: the
404 extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic. Biol. Med.* 38,
405 763-772, 2005

406 [6] Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., Newmark, H. L.: Inhibition of
407 carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev Nutr* , 21, 381-
408 406, 2001

409 [7] Nemeth, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R. et al.: Deglycosylation by
410 small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the
411 absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J*
412 *Nutr* , 42, 29-42, 2003

413 [8] Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., Blaut, M.: Anaerobic transformation of
414 quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch.*
415 *Microbiol.* 171, 81-91, 1999

416 [9] Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H., Winter, J.: Hydrolysis of dietary flavonoid
417 glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem. J* , 248,
418 953-956, 1987

- 419 [10] Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M.: Degradation of quercetin and
420 luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5558-5567,
421 2001
- 422 [11] Schoefer, L., Mohan, R., Schwiertz, A., Braune, A., Blaut, M.: Anaerobic degradation
423 of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69,
424 5849-5854, 2003
- 425 [12] Clifford, M. N.: Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and
426 dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 79, 362-372, 1999
- 427 [13] Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S. et al.:
428 Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial
429 fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 212-225, 2004
- 430 [14] Veeriah, S., Miene, C., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S. et al.: Apple
431 polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological
432 defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int. J Cancer* , 122,
433 2647-2655, 2008
- 434 [15] Suh, Y., Afaq, F., Johnson, J. J., Mukhtar, H.: A plant flavonoid fisetin induces
435 apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-
436 kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis* , 30, 300-307, 2009
- 437 [16] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R.: Glutathione transferases. *Annu. Rev*
438 *Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88, 2005
- 439 [17] Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G.: Phospholipid
440 hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione
441 transferases. *Biochem. J* , 332 (Pt 1), 97-100, 1998
- 442 [18] Tan, K. L., Board, P. G.: Purification and characterization of a recombinant human
443 Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem. J* , 315 (Pt 3), 727-
444 732, 1996
- 445 [19] Hussey, A. J., Hayes, J. D.: Characterization of a human class-Theta glutathione S-
446 transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem. J* , 286 (Pt
447 3), 929-935, 1992

- 448 [20] Hiratsuka, A., Nishijima, T., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T.: Rat liver theta-class
449 glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: their chromatographic,
450 electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal. Biochem.*
451 *252*, 229-237, 1997
- 452 [21] Hyde, C. A., Missailidis, S.: Inhibition of arachidonic acid metabolism and its
453 implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int.*
454 *Immunopharmacol.* *9*, 701-715, 2009
- 455 [22] Dannenberg, A. J., Lippman, S. M., Mann, J. R., Subbaramaiah, K., DuBois, R. N.:
456 Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic
457 targets for chemoprevention. *J Clin Oncol.* *23*, 254-266, 2005
- 458 [23] Smith, W. L., Garavito, R. M., DeWitt, D. L.: Prostaglandin endoperoxide H
459 synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol. Chem.* *271*, 33157-33160, 1996
- 460 [24] Sinicrope, F. A., Gill, S.: Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer*
461 *Metastasis Rev* , *23*, 63-75, 2004
- 462 [25] Balkwill, F., Charles, K. A., Mantovani, A.: Smoldering and polarized inflammation
463 in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* , *7*, 211-217,
464 2005
- 465 [26] Harris, R. E., Beebe-Donk, J., Alshafie, G. A.: Cancer chemoprevention by
466 cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell.*
467 *Biochem.* *42*, 193-212, 2007
- 468 [27] Richter, M., Jurek, D., Wrba, F., Kaserer, K., Wurzer, G. et al.: Cells obtained from
469 colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro.
470 *Eur. J Cancer* , *38*, 1937-1945, 2002
- 471 [28] Klenow, S., Pool-Zobel, B. L., Gleib, M.: Influence of inorganic and organic iron
472 compounds on parameters of cell growth and survival in human colon cells.
473 *Toxicology in Vitro* , *23*, 400-407, 2009
- 474 [29] Daumann, H.: Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetes-assoziierte Risikofaktoren
475 für Dickdarmkrebs und das Polyphenolprofil bei gesunden Probanden.
476 *Dissertationsschrift Technische Universität München* , 2009

- 477 [30] Wiegant, J., Raap, A. K.: Basic preparative techniques for fluorescence in situ
478 hybridization. *Curr. Protoc. Cytom. Chapter 8*, 2001
- 479 [31] Senger, G., Chudoba, I., Plesch, A.: Multicolor-FISH-the identification of
480 chromosome abberations by 24 colors. *Bioforum* , 9, 499-503, 1998
- 481 [32] Schaeferhenrich, A., Beyer-Sehlmeyer, G., Festag, G., Kuechler, A., Haag, N. et al.:
482 Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-
483 hydroxy-2-nonenal. *Mutat. Res* , 526, 19-32, 2003
- 484 [33] Veeriah, S., Hofmann, T., Glei, M., Dietrich, H., Will, F. et al.: Apple polyphenols
485 and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines
486 derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J Agric. Food*
487 *Chem.* 55, 2892-2900, 2007
- 488 [34] Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H. et al.: Apple
489 flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate
490 expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol.*
491 *Carcinog.* 45, 164-174, 2006
- 492 [35] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
493 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.*
494 *Biochem.* 72, 248-254, 1976
- 495 [36] Petermann, A., Miene, C., Schulz-Raffelt, G., Palige, K., Hölzer, J. et al.: GSTT2, a
496 phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells
497 against genotoxic damage. *Mol. Nutr Food Res* , 53, 1245-1253, 2009
- 498 [37] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A. et al.: Single cell
499 gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.
500 *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221, 2000
- 501 [38] Glei, M., Hofmann, T., Kuster, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G. et al.: Both wheat
502 (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation
503 products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-
504 hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J Agric. Food Chem.* 54, 2088-2095,
505 2006

- 506 [39] Barker, P. E.: Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 5, 81-
507 94, 1982
- 508 [40] Schaffer, L. G., Slovak, M. L., Campbell, L. J. e.: ISCN 2009: An international
509 System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Karger, Basel* , 2009
- 510 [41] Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M., Aura, A. M.: Factors affecting the
511 conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-
512 chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *Eur. J Nutr* , 47, 442-
513 452, 2008
- 514 [42] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L.: Polyphenols: food
515 sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* , 79, 727-747, 2004
- 516 [43] Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L., Heber, D.: Total cranberry extract versus
517 its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against
518 human tumor cell lines. *J Agric. Food Chem.* 52, 2512-2517, 2004
- 519 [44] Comalada, M., Bailon, E., de, H. O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J. et al.: The effects of
520 short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on
521 the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol.* 132, 487-497, 2006
- 522 [45] Jang, S. G., Kim, I. J., Kang, H. C., Park, H. W., Ahn, S. A. et al.: GSTT2 promoter
523 polymorphisms and colorectal cancer risk. *BMC. Cancer* , 7, 2007
- 524 [46] Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S. et al.:
525 Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products
526 formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat. Res* ,
527 682, 39-53, 2009
- 528 [47] Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Janzowski, C.: Modulation of oxidative cell
529 damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human
530 colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 413-417, 2006
- 531 [48] Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F. et al.: Polyphenolic
532 apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in
533 human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 24-33, 2006

- 534 [49] Bellion, P., Hofmann, T., Pool-Zobel, B. L., Will, F., Dietrich, H. et al.: Antioxidant
535 effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation
536 products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *J. Agric. Food Chem.*
537 *56*, 6310-6317, 2008
- 538 [50] Miene, C., Klenow, S., Veeriah, S., Richling, E., Glei, M.: Impact of apple
539 polyphenols on GSTT2 gene expression, subsequent protection of DNA and
540 modulation of proliferation using LT97 human colon adenoma cells. *Mol. Nutr*
541 *Food Res* , *53*, 1254-1262, 2009
- 542 [51] Lee, J. M., Johnson, J. A.: An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular
543 defense mechanism. *J Biochem. Mol. Biol.* *37*, 139-143, 2004
- 544 [52] Gerhauser, C., Klimo, K., Hummer, W., Holzer, J., Petermann, A. et al.: Identification
545 of 3-hydroxy-beta-damascone and related carotenoid-derived aroma
546 compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated phase 2 response with
547 concomitant anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res.* *53*, 1237-1244,
548 2009
- 549 [53] Pohl, C., Will, F., Dietrich, H., Schrenk, D.: Cytochrome P450 1A1 expression and
550 activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple
551 polyphenols. *J Agric. Food Chem.* *54*, 10262-10268, 2006
- 552 [54] Schwarz, D., Roots, I.: In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of
553 metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochem. Biophys.*
554 *Res Commun.* *303*, 902-907, 2003
- 555 [55] Rosenberg, L., Palmer, J. R., Zauber, A. G., Warshauer, M. E., Stolley, P. D. et al.: A
556 hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of
557 large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* , *83*, 355-358, 1991
- 558 [56] Huss, U., Ringbom, T., Perera, P., Bohlin, L., Vasange, M.: Screening of ubiquitous
559 plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based
560 assay. *J Nat Prod.* *65*, 1517-1521, 2002
- 561 [57] O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M. et al.:
562 Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2)
563 transcription. *Mutat. Res* , *551*, 245-254, 2004

- 564 [58] Shan, J., Fu, J., Zhao, Z., Kong, X., Huang, H. et al.: Chlorogenic acid inhibits
565 lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells
566 through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *Int.*
567 *Immunopharmacol.* 9, 1042-1048, 2009
- 568 [59] Warren, C. A., Paulhill, K. J., Davidson, L. A., Lupton, J. R., Taddeo, S. S. et al.:
569 Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing
570 inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr* ,
571 *139*, 101-105, 2009
- 572 [60] Plummer, S. M., Holloway, K. A., Manson, M. M., Munks, R. J., Kaptein, A. et al.:
573 Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the
574 chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation
575 via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* , 18, 6013-6020, 1999
- 576 [61] Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., Vidal, A.: Anti-inflammatory properties of
577 the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to
578 inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 13, 2826-2832, 2007
- 579
- 580

581 **Figure legends**

582

583 **Fig. 1.** Overview of selected pathways of arachidonic acid metabolism catalyzed by drug-
 584 metabolizing enzymes COX-2 and GSTT2 (created according to [20, 21]).

585 15-HETE, 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid; 15-HpETE, 15-hydroxyperoxy-5,8,11,13-
 586 eicosatetraenoic acid ; PGG2, prostaglandin G2; PGH2, prostaglandin H2; rGSTT2, rat glutathione S-
 587 transferase T2

588

589 **Fig. 2.** Modulation of LT97 cell number after 24 h, 48 h and 72 h incubation with ES (0 –
 590 18 μ M) and PS (0 – 90 μ M). Values are expressed as relative number of LT97 cells in % of
 591 untreated medium control (cell number = 100%) and represented as mean \pm standard
 592 deviation (n=3).

593

594 **Fig. 3.** Impact of treatment with ES (2.5 – 10 μ M, left panel) and PS (5 – 25 μ M, right panel)
 595 for 12 h, 24 h and 48 h on *GSTT2* (A) and *COX-2* (B) gene expression. Data is expressed as
 596 fold difference to the medium treated controls normalized to housekeeping gene *GAPDH* and
 597 represented as mean + standard deviation (n=3). Effects were analyzed by one-way ANOVA,
 598 including Bonferroni's post test. Significant results were labeled with asterisks: * $p < 0.05$,
 599 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

600

601 **Fig. 4.** Modulation of COX-2 protein expression by ES (5 μ M and 10 μ M) and PS (15 μ M
 602 and 25 μ M) in LT97 cells after 24 h (A) and 48 h (B), analyzed with Western blot. Data is
 603 expressed as fold difference to the medium treated controls normalized to housekeeping
 604 protein β -actin and represented as mean + standard deviation (n=3). One representative blot
 605 for each time point is depicted below the summarized statistical evaluation. Significant
 606 differences to medium control were calculated by one-way ANOVA, including Bonferroni's
 607 post test. Significant results were labeled with asterisks: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

608

609 **Fig. 5.** Levels of DNA damage in LT97 cells induced by 0 – 150 μ M CumOOH (15 min,
 610 30 $^{\circ}$ C, n=4) after 12 h pre-incubation with 2.5 μ M ES (A) or 5 μ M PS (B) measured with the
 611 alkaline version of the comet assay. Statistical analysis to untreated medium control was
 612 performed using two-way ANOVA, including Bonferroni's post test. Significant results are
 613 represented as mean + standard deviation and labeled with asterisks: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 1

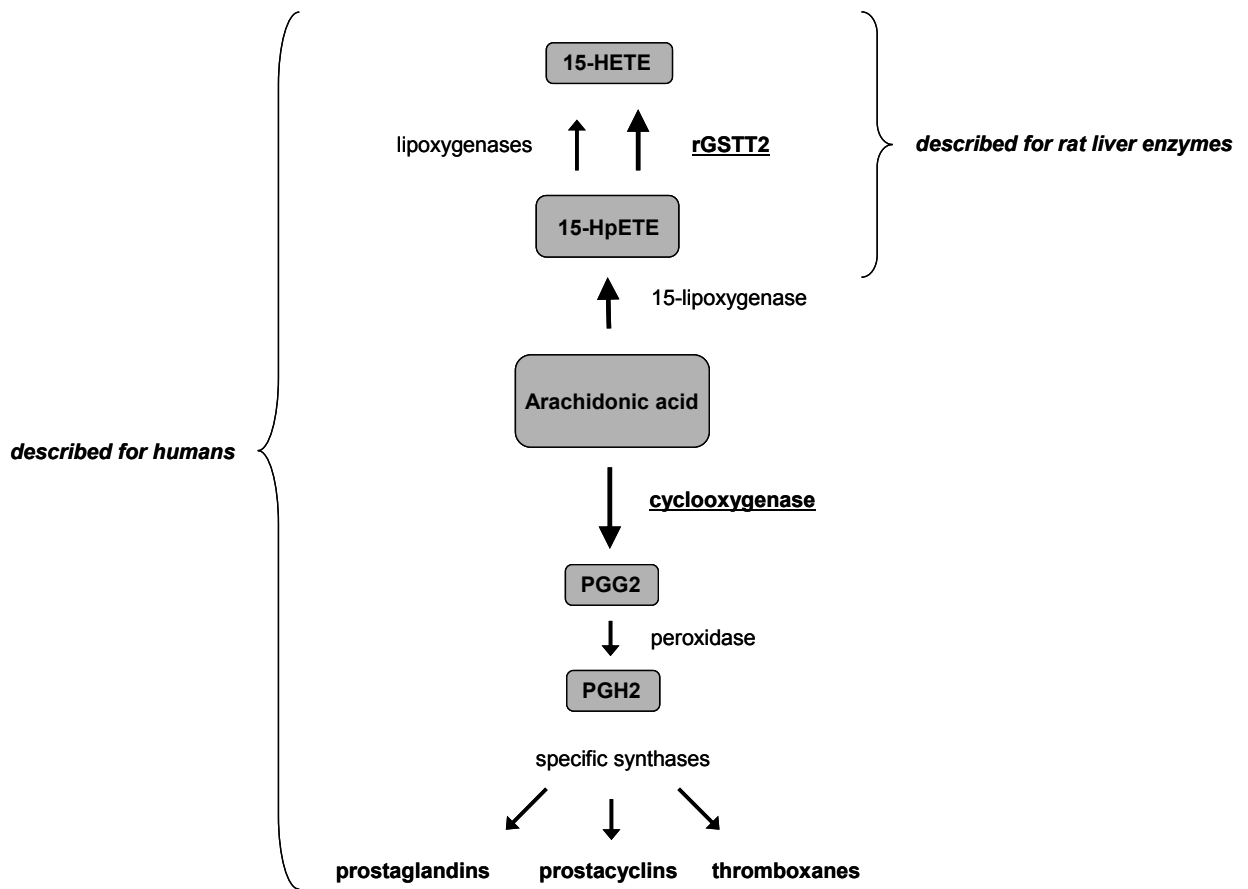


Figure 2

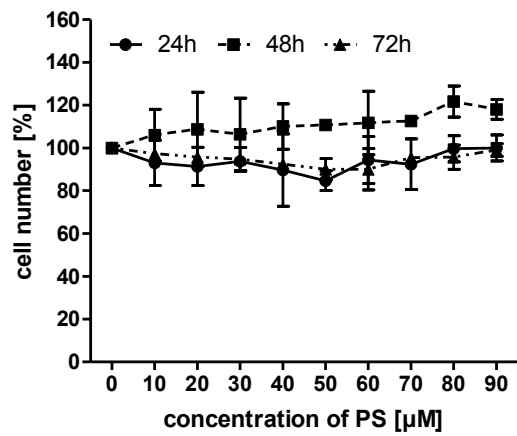
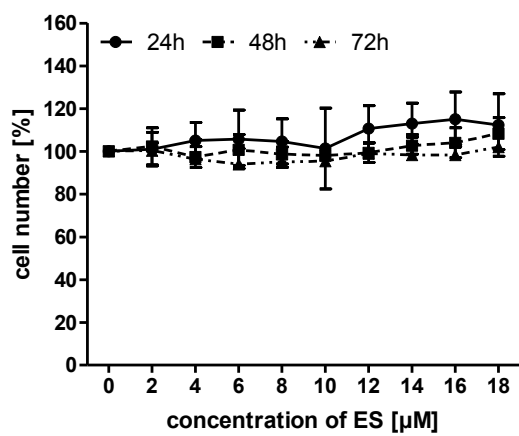
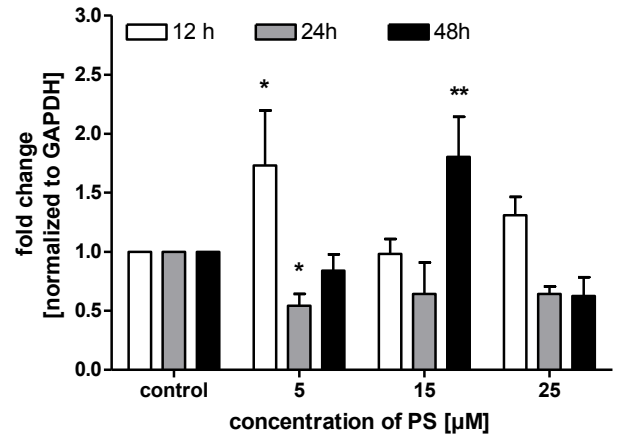
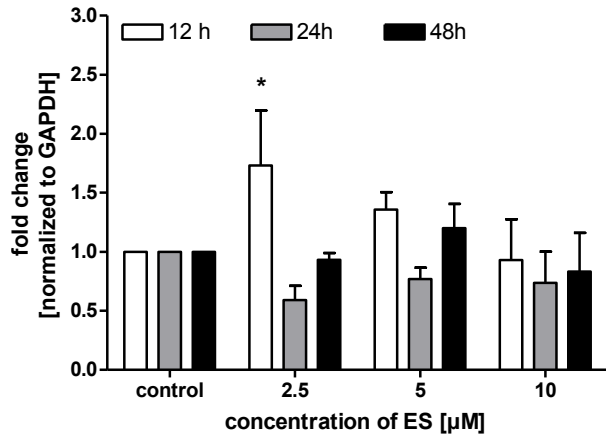


Figure 3

A



B

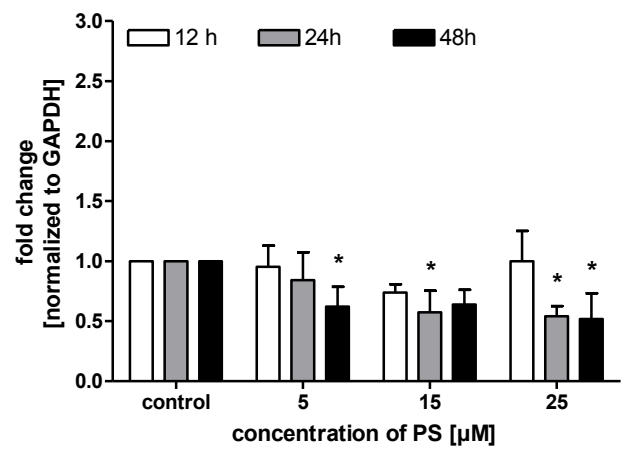
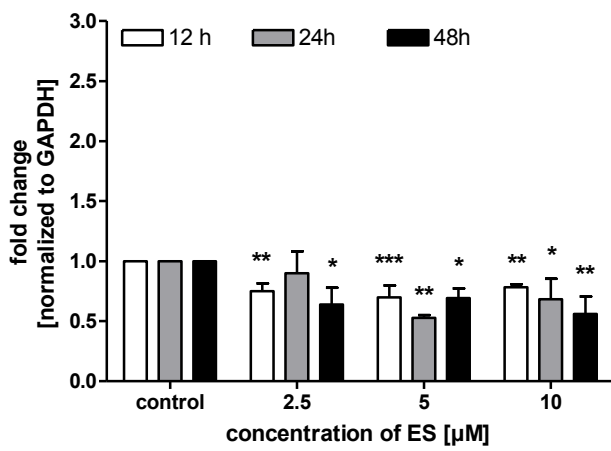
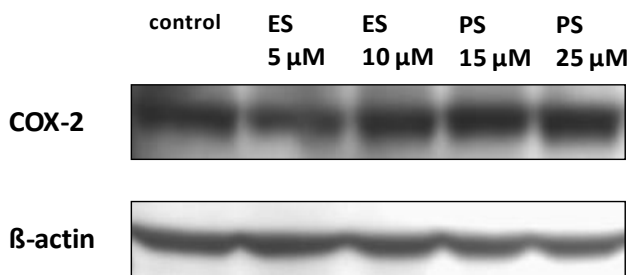
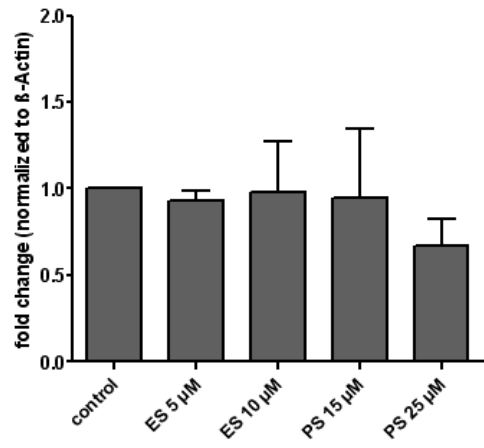


Figure 4

A



B

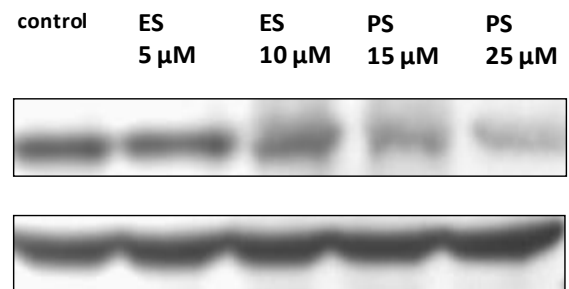
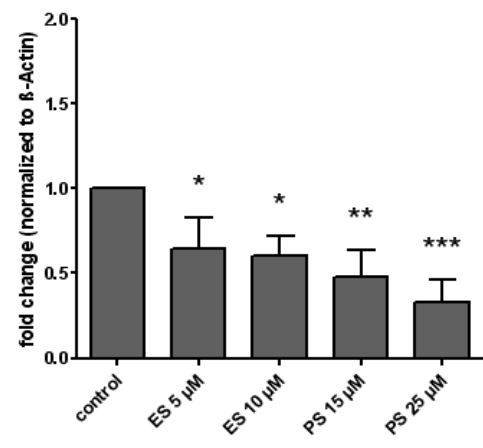
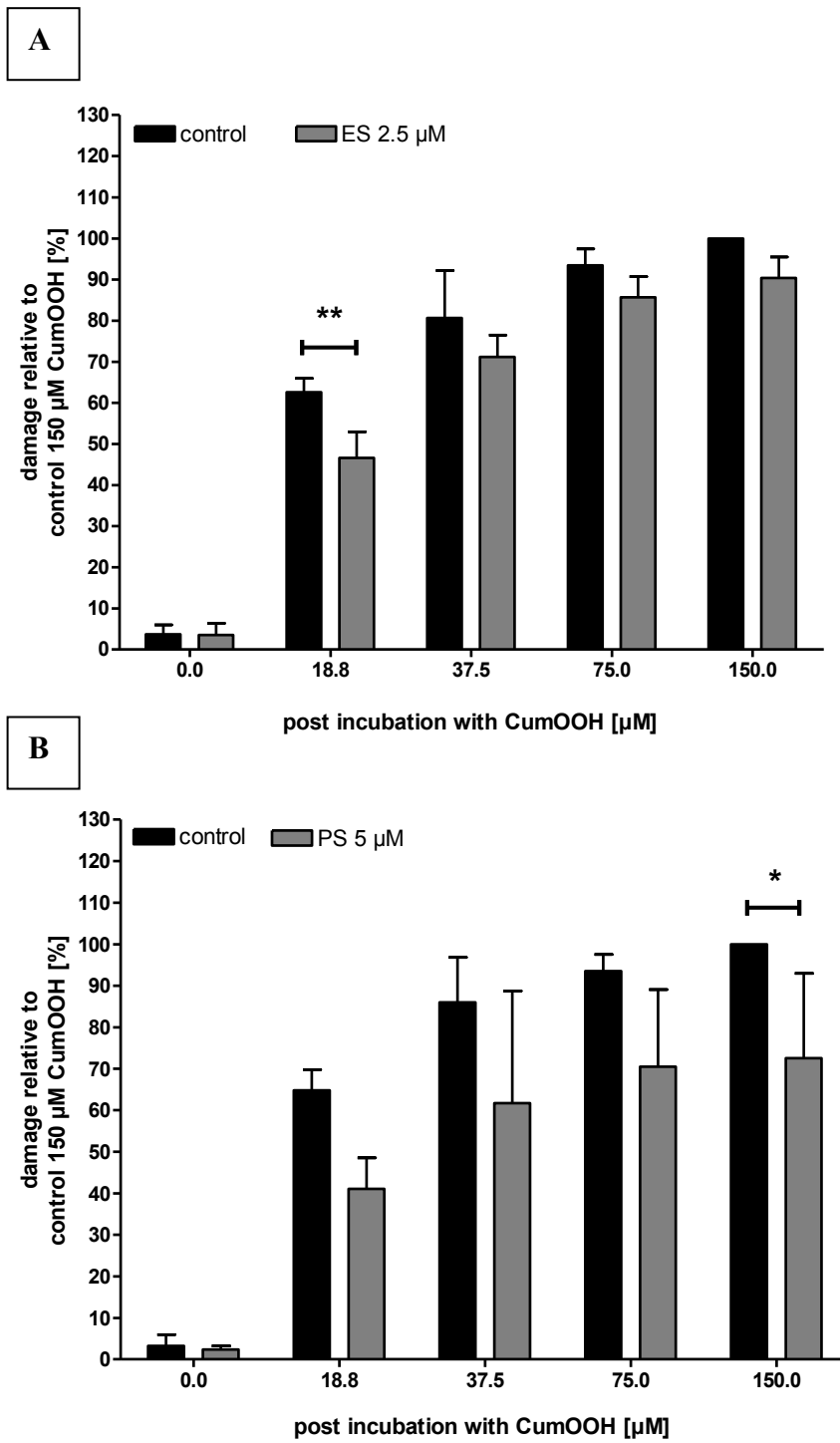


Figure 5



4 ZUSÄTZLICHE ERGEBNISSE

4.1 Chemopräventives Potential von Apfelsafttrub

4.1.1 *In vitro*-Fermentation (batch culture) der Trubfraktion eines Apfelsaftes

Der Ultrafiltrationstrub eines Apfelsaftes (31,5 % Zuckerbausteine, 17,7 % Aminosäuren, 15,4 % Fett, 1,7 % Asche, 5,3 % Procyanidine, Pektin) wurde von Projektpartnern (Geisenheim; Prof. Dr. Helmut Dietrich) mittels 300kDa-Membrankassetten in einer Sartoflow-Anlage gewonnen und zur Verfügung gestellt. Um diesen in der Zellkultur einsetzen zu können, musste eine Simulation der gesamten Magen-Darm-Passage, unter Einstellung der für den jeweiligen Abschnitt typischen physiologischen Bedingungen (pH-Wert, Inkubationszeit, Temperatur, Gasatmosphäre), erfolgen^[193] (Abb. 6).

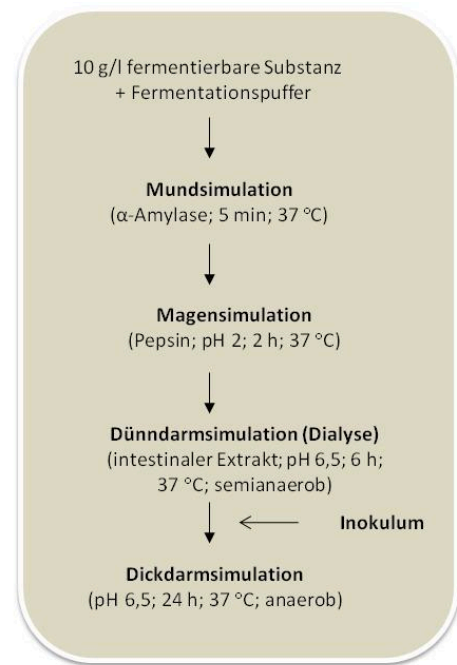


Abb. 6: Verlauf der *in vitro* Simulation der humanen Magen-Darm-Passage

Mit dem Fäzes-Inokulum (Fäzesmischprobe von 3 gesunden Spendern) wurden die für die Fermentation notwendigen intestinalen Mikroorganismen zugeführt. Neben der Fermentation der Trubfraktion wurde parallel eine Leerkontrolle ohne Testsubstanz (Blank) mitgeführt, um mögliche Effekte durch Puffer, Enzyme oder Fäzes ausschließen zu können.

Die Analytik der SCFA in den Fermentationsüberständen Blank und Trub (FÜ Blank/FÜ Trub) erfolgte mittels Gaschromatographie durch Netzwerkpartner in Karlsruhe (Prof. Dr. Doris Marko). Eine signifikante Zunahme an Butyrat und Acetat im FÜ Trub gegenüber dem FÜ Blank weist, verbunden mit einer Senkung des pH-Wertes, auf eine bakterielle Stoffwechselaktivität hin. Die Entstehung von bakteriellen Metaboliten aus Polyphenolen konnte mittels HPLC-DAD (Hochleistungsflüssigchromatographie in Kopplung mit einem Diodenarray-Detektor) und LC-MS (Flüssigchromatographie in Kopplung mit der Massenspektrometrie) allerdings nicht nachgewiesen werden (Analytik in Unterstützung durch Netzwerkpartner in Kaiserslautern, Juniorprof. Dr. Elke Richling).

4.1.2 Genexpressionsänderungen nach Inkubation mit Fermentationsüberstand Trub

Nach der Inkubation der LT97 Zellen mit FÜ Blank/FÜ Trub (subtoxische Konzentrationen 1,25 % und 2,5 % v/v in Zellkulturmedium, analysiert in Voruntersuchungen mittels DAPI-Assay) wurde der Einfluss auf die Expression ausgewählter Gene mittels *real-time qRT-PCR* untersucht, welche durch Apfelpolyphenolextrakte und/oder mikrobielle Abbauprodukte moduliert wurden. Bei den untersuchten Genen des Phase I und II Metabolismus handelte es sich um *GSTT2*, *GSTP1*, *UGT1A1* und *COX2*. Im Vergleich zum FÜ Blank wurde die Expression keines der genannten Gene durch FÜ Trub signifikant verändert (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.1.3 Einfluss des Fermentationsüberstandes Trub auf die Apoptoserate von LT97 Zellen

Zur Detektion proapoptotischer Prozesse wurden LT97 Zellen mit FÜ Blank/FÜ Trub in den zellwachstumsmodulierenden Konzentrationen 5 % und 10 % (v/v in Zellkulturmedium) für 24 h und 48 h inkubiert, geerntet und nach Färbung mit Annexin V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) im Durchflusszytometer analysiert. Ein Marker für apoptotische Prozesse in der Zelle ist die durch Aufhebung der Membransymmetrie verursachte Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran. Die Bindung von Annexin V-FITC an Phosphatidylserin kann dabei nach Anregung (Laser: 488 nm) fluorimetrisch detektiert werden.

Wie in Abb. 7 ersichtlich, konnten sowohl FÜ Blank als auch FÜ Trub die Apoptose induzieren (Detektion der frühapoptotischen Zellen). Allerdings wurde die Apoptoserate durch FÜ Trub gegenüber FÜ Blank nicht zusätzlich gesteigert. Lediglich die mitgeführte Positivkontrolle Butyrat (10 mM) induzierte, verglichen mit der Mediumkontrolle, signifikant die Apoptose nach beiden getesteten Zeitpunkten.

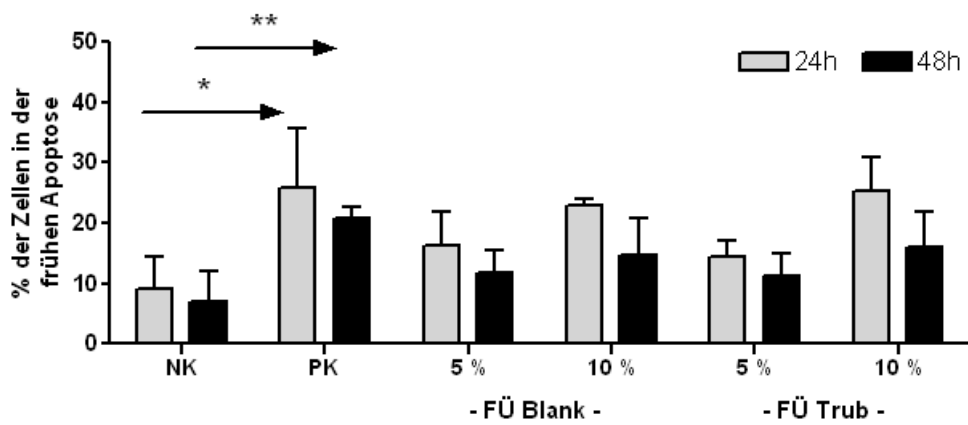


Abb. 7: Einfluss Fermentationsüberstände Blank/Trub auf die Apoptoserate in LT97 Zellen (FÜ 5 % und 10 %, 24 h und 48 h, NK=Negativkontrolle Medium, PK=Positivkontrolle Butyrat 10 mM, Durchflusszytometrie; n=4, MW+SD, ungepaarter t-Test, * p<0,05; ** p<0,01)

4.2. Humane Apfelsaftinterventionsstudien mit gesundem und adipösem Probandenkollektiv

4.2.1 Design der beiden Interventionsstudien

Um den Einfluss einer Apfelsaftintervention zu untersuchen, wurde eine randomisierte, placebokontrollierte Studie im Paralleldesign mit gesunden, normalgewichtigen Probanden durchgeführt. Da Adipositas und die oftmals damit verbundene ungesunde Ernährungsweise als Risikofaktoren für die Entwicklung von Dickdarmkrebs angesehen werden, wurde die Apfelsaftinterventionsstudie mit übergewichtigen bzw. zum größten Teil adipösen Probanden wiederholt. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren: a) Diabetes mellitus, Tumore, chronisch-entzündliche, immunologische und infektiöse Erkrankungen, Lebensmittelallergien sowie Bluthochdruck; b) Medikamenten- und Alkoholabusus, Aufnahme lipidsenkender Medikamente und die Einnahme von Antibiotika innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn; c) Supplementation von Nahrungsergänzungsmitteln, eine vegane oder alternative Ernährungsweise; d) Rauchen und exzessive sportliche Betätigung. Die Kalkulation des Stichprobenumfangs erfolgte mittels statistischer Power-Abschätzung (Power 0,9; Signifikanzniveau 0,01) unter Berücksichtigung der Methodenvariabilität und der Interventionseffekte mit Lebensmitteln aus früheren Studien. Das Probandenkollektiv (Tab. 2) der Studien mit Gesunden bzw. Adipösen (geplant und durchgeführt an der TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan bzw. an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe) wurde nach einer einwöchigen Depletionsphase mit polyphenolarmer Ernährung in eine Kontroll- und eine Apfelsaftgruppe eingeteilt.

Tab. 2: Zusammensetzung der Probandenkollektive der humanen Apfelsaftinterventionsstudien mit Gesunden bzw. Adipösen

Parameter	gesund	übergewichtig/adipös
<i>Geschlecht</i>	männlich	männlich
<i>BMI</i>	~ 23 kg/m ²	~ 31 kg/m ²
<i>Personenanzahl</i>	58	68
Gruppe Apfelsaft	30	38
Gruppe Kontrollgetränk	28	30
<i>Anzahl Fäzesspender</i>	22	21
Gruppe Apfelsaft	12	12
Gruppe Kontrollgetränk	10	9

In der sich anschließenden Interventionsphase konsumierte die Apfelsaftgruppe täglich 750 ml eines naturtrüben Apfelsaftes, während die Kontrollgruppe das gleiche Volumen eines isokalorischen, Vitamin C-adjustierten Kontrollgetränks (ohne Polyphenole und ohne Trubpartikel) zu sich nahm (Zusammensetzung der Getränke siehe Anhang Tab. 3 und Tab. 4). Am Ende der Depletions- und nach der Interventionsphase wurde bei allen Probanden Blut entnommen (Abb. 8). Über einen Zeitraum von 48 h sammelte ein Teil der Probanden zusätzlich Stuhl (Tab. 2). Eine standardisierte Kost während der Stuhlsammlung sollte interindividuelle Unterschiede im Ernährungsverhalten minimieren. Der Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel wurde über den gesamten Studienzeitraum nur eingeschränkt zugelassen (Ernährungsleitfaden siehe Anhang Tab. 5).


















Woche 1			Woche 2 - 5				
Depletionsphase (eine Woche)			Interventionsphase (vier Wochen)				
Tag 1 - 5	Tag 6	Tag 7	Tag 1	Tag 2 - 26	Tag 27	Tag 28	Tag 29
							
							
							

Abb. 8: Übersichtsschema zum Studiendesign der fünföchigen Apfelsaftinterventionsstudien mit gesundem bzw. adipösem Probandenkollektiv

( Verzicht auf Äpfel und Apfelprodukte,  Intervention mit Apfelsaft oder Kontrollgetränk,  standardisierte Kost,  Sammlung 48 h Stuhl,  Blutentnahme)

Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurden die Stuhlproben bzw. das daraus gewonnene FW (1:1 w/v in PBS) der Probanden herangezogen. Dabei wurde das FW eines Probanden aus dem gesunden Kollektiv aufgrund einer zu geringen FW-Ausbeute von allen Untersuchungen ausgeschlossen.

4.2.2 Einfluss der Apfelsaftintervention auf das genotoxische und antigenotoxische Potential von humanem Fäzeswasser gesunder Probanden

Die FW der einzelnen Probanden aus Kontroll- und Apfelsaftgruppe (n=22 Probanden) wurden, hinsichtlich ihres Potentials DNA-Schäden zu induzieren und antigenotoxisch zu wirken, an LT97 Zellen getestet. Unter Antigenotoxizität versteht man die Fähigkeit

von Substanzen, vor genotoxischen Effekten zu schützen. Als Resultat ist ein niedrigeres Niveau resultierender DNA-Schäden im Vergleich zur Kontrolle messbar. Dafür wurden die Zellen für 30 min mit 50 % FW (v/v in PBS) inkubiert bzw. parallel mit 75 μM CumOOH bei 37 °C koinkubiert. Sowohl die Inkubationsdauer als auch die Konzentrationen der eingesetzten Testsubstanzen wurden in einem Vorversuch ermittelt. Beide Faktoren hatten dabei keinen Einfluss auf die Zellzahl oder die Vitalität der Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Bestimmung und Auswertung der induzierten Strangbrüche erfolgte mittels alkalischem Comet Assay.

Die FW der einzelnen Probandengruppen vor und nach Interventionsphase zeigten im Mittel verglichen zur Positivkontrolle (75 μM CumOOH) signifikant geringere genotoxische Eigenschaften. Das Potential der FW zur Induktion von DNA-Schäden in LT97 Zellen ist durchschnittlich als gering einzustufen, da die detektierten Schweifintensitäten zu denen der mitgeführten PBS-Kontrolle nicht signifikant verschieden waren. Insgesamt konnten darüber hinaus keine Unterschiede zwischen den Interventionsphasen (vor und nach) sowie den Interventionsgruppen (Apfelsaft oder Kontrollgetränk) festgestellt werden (Abb. 9). Ein Einfluss der 4-wöchigen Apfelsaftintervention bei normalgewichtigen Probanden auf die Genotoxizität des FW kann daher ausgeschlossen werden.

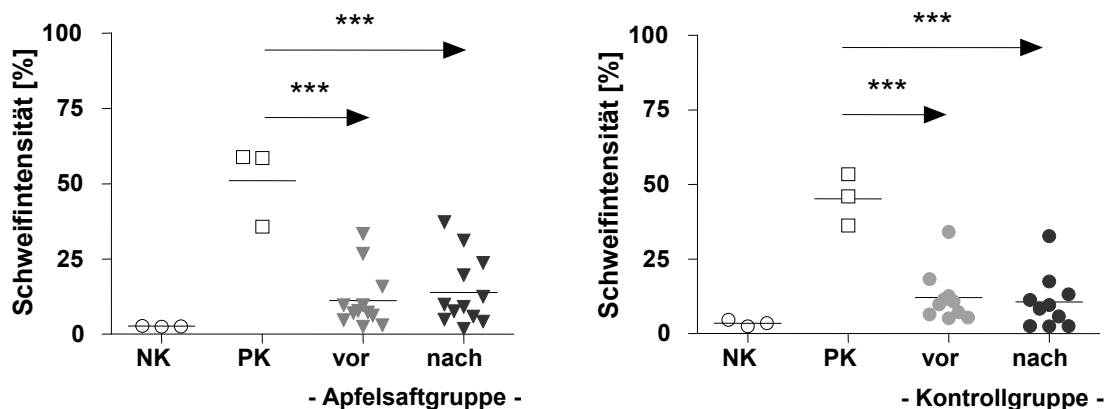


Abb. 9: Genotoxisches Potential der Fäzeswässer vor und nach der Interventionsphase mit trübem Apfelsaft oder isokalorischem Kontrollgetränk in LT97 Zellen (FW 50 %, NK=Negativkontrolle PBS, PK=Positivkontrolle 75 μM CumOOH, Comet Assay; n=22 gesunde Probanden, ungepaarter t-Test, *** p<0,001)

Die FW aus keiner der beiden Interventionsgruppen (Apfelsaft und Kontrollgetränk) waren in der Lage CumOOH-induzierte DNA-Schäden während der parallel angesetzten Kurzzeitinkubation zu reduzieren (Abb. 10). Das bedeutet, dass direkte Abfangreaktionen durch Polyphenole bzw. Polyphenolmetabolite im FW nach Apfelsaftintervention keine besondere Rolle spielen.

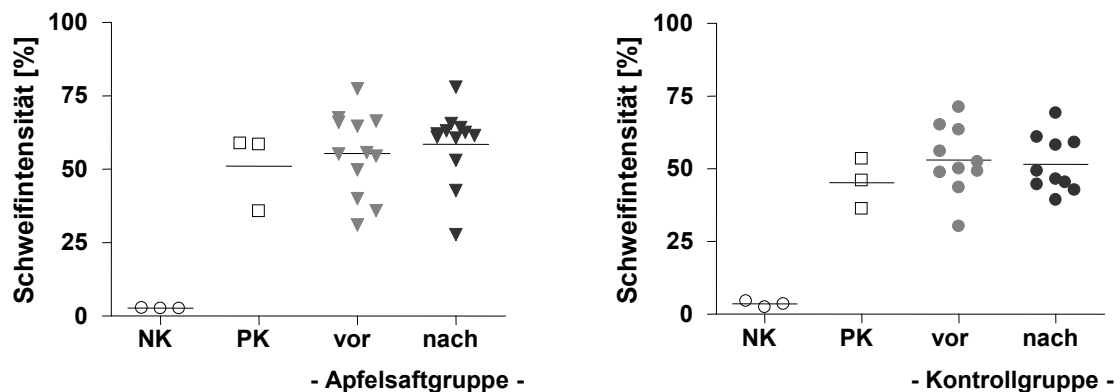


Abb. 10: Antigenotoxisches Potential der Fäzeswässer vor und nach der Interventionsphase mit trübem Apfelsaft oder isokalorischem Kontrollgetränk in LT97 Zellen (FW 50 % + 75 μ M CumOOH, 30 min, NK=Negativkontrolle PBS, PK=Positivkontrolle 75 μ M CumOOH, Comet Assay; n=22 gesunde Probanden)

4.2.3 Einfluss der Fäzeswässer aus der Apfelsaftintervention bei Gesunden auf die Genexpression von *GSTT2* und auf CumOOH-induzierte DNA-Schäden

In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl der aus Apfelsaft isolierte AE als auch mikrobielle Abbauprodukte der Polyphenole in der Lage sind, das Phase II-Gen *GSTT2* in LT97 Zellen zu induzieren und CumOOH-bedingte DNA-Schäden zu reduzieren. Daher galt es zu ermitteln, ob auch FW nach der Apfelsaftintervention aufgrund seiner gegenüber der Kontrollgruppe veränderten Zusammensetzung ähnliche Effekte hervorrufen kann. In Voruntersuchungen wurden verschiedene Konzentrationsbereiche und Inkubationszeiten getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Folgenden wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 % (v/v in Zellkulturmedium) der jeweiligen FW bei 37 °C inkubiert und anschließend für Genexpressionsanalysen mittels *real-time qRT-PCR* und für Untersuchungen zu funktionellen Konsequenzen mittels Comet Assays genutzt.

Die *GSTT2*-Genexpression konnte im Mittel durch die nach Apfelsaftintervention gewonnenen FW nicht moduliert werden. Das ermittelte Expressionsniveau war mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar (Abb. 11). Des Weiteren konnten die CumOOH-

induzierten DNA-Schäden (75 μ M, 30 min) in LT97 Zellen durch vorherige Inkubation mit den FW (24 h) nicht reduziert werden. Auch hier traten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Apfelsaftgruppe auf (Abb. 12). Da es sich bei CumOOH u. a. um ein Substrat der GSTT2 handelt, bestätigen die Beobachtungen im Comet Assay die Befunde der Genexpressionsanalyse.

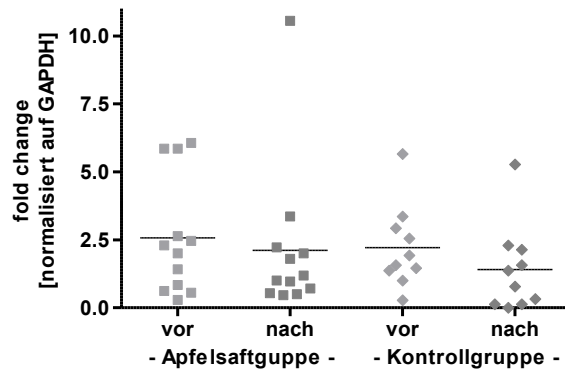


Abb. 11: Einfluss der Fäzeswässer vor und nach der Interventionsphase mit trübem Apfelsaft oder isokalorischem Kontrollgetränk auf die *GSTT2*-Genexpression in LT97 Zellen (FW 2,5 %, 24 h, *real-time qRT-PCR*; n=22 gesunde Probanden)

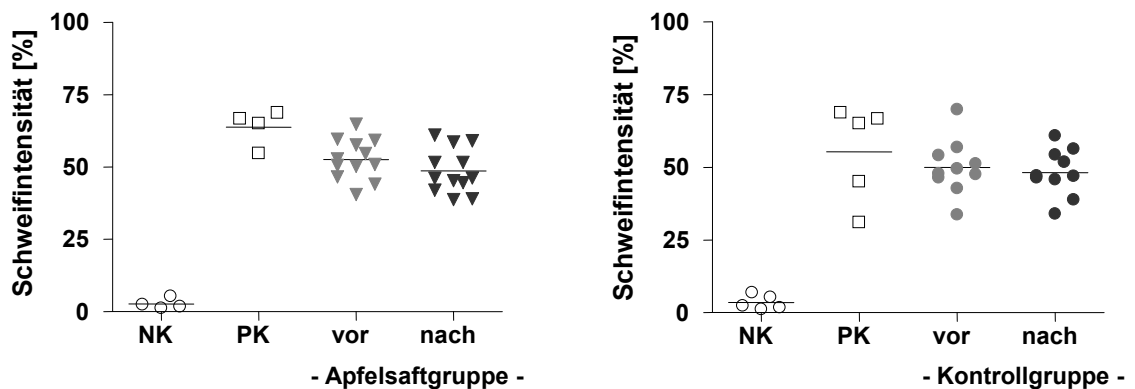


Abb. 12: Antigenotoxisches Potential der Fäzeswässer vor und nach der Interventionsphase mit trübem Apfelsaft oder isokalorischem Kontrollgetränk in LT97 Zellen (FW 2,5 % (24 h); 75 μ M CumOOH (30 min), NK=Negativkontrolle PBS, PK=Positivkontrolle 75 μ M CumOOH, Comet Assay; n=22 gesunde Probanden)

4.2.4 Einfluss der Fäzeswässer aus der Apfelsaftintervention bei Gesunden auf die Apoptoserate von LT97 Zellen

Um zu überprüfen, ob eine Apfelsaftintervention im Vergleich zur Kontrollgruppe Einfluss auf die Apoptoserate nehmen kann, wurden LT97 Zellen mit jeweils 5 % und 10 % der FW v/v in Zellkulturmedium (Wahl der Konzentrationen im zellwachstumsmodulierenden Bereich) für 24 h und 48 h inkubiert. Nach Ablauf der

Inkubationszeiten konnten mikroskopisch sowohl zellmorphologische Veränderungen als auch eine Zunahme von Zellen im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Diese Beobachtungen waren in Kontroll- und Apfelsaftgruppe gleichermaßen ersichtlich. Die Auswertung der Untersuchungen im Durchflusszytometer machte frühapoptotische Vorgänge in den Zellen deutlich, wobei keine zusätzliche Steigerung in der Apfelsaftgruppe zu verzeichnen war (Abb. 13).

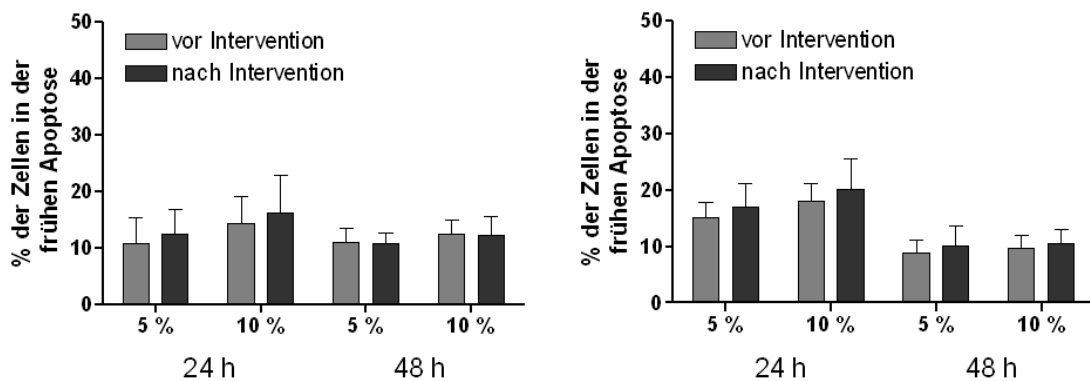


Abb. 13: Einfluss der Fäzeswässer vor und nach der Interventionsphase mit trübem Apfelsaft (links) oder isokalorischem Kontrollgetränk (rechts) auf die Apoptoserate in LT97 Zellen (FW 5 % und 10 %, 24 h und 48 h, Comet Assay; n=22 gesunde Probanden)

4.2.5 Einfluss der Apfelsaftintervention auf das genotoxische Potential von humanem Fäzeswasser adipöser Probanden im Vergleich zu Gesunden

Entsprechend der Untersuchungen mit dem Probenmaterial der gesunden Probanden wurden FW der Adipösen aus Apfelsaft- und Kontrollgruppe (n=21 Probanden) hinsichtlich ihrer Genotoxizität in LT97 Zellen getestet. Die Versuchsbedingungen wurden analog zum Screening der gesunden Probanden gewählt (50 % FW v/v in PBS, 30 min Inkubation bei 37 °C). Weder die Inkubationszeit, noch die FW-Konzentration beeinflussten die Zellzahl oder die Vitalität der Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Es zeigte sich, dass die FW der Übergewichtigen bzw. Adipösen im Vergleich zu denen der normalgewichtigen Gesunden signifikant mehr DNA-Schäden in LT97 Zellen induzierten. Hingegen hatte die Apfelsaftintervention keinen Einfluss auf die Genotoxizität der untersuchten FW-Proben (Abb. 14).

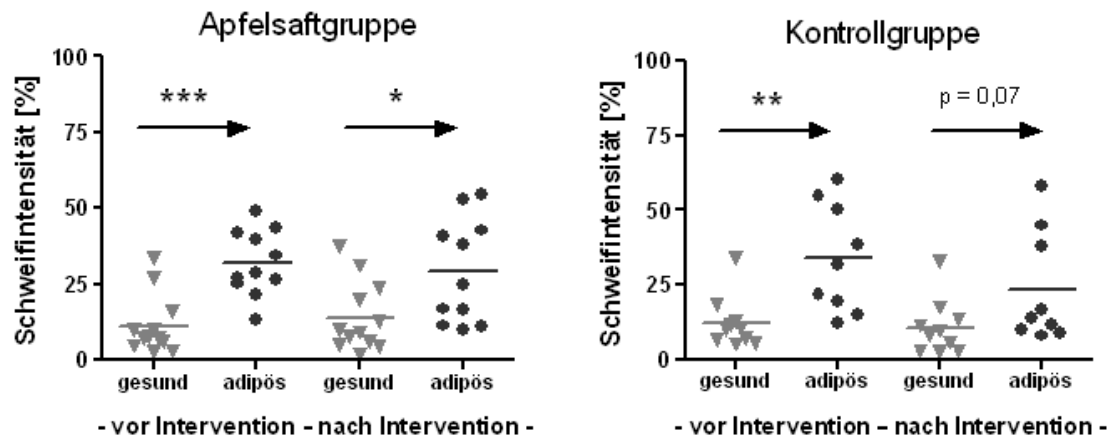


Abb. 14: Vergleich der Genotoxizität der Fäzeswässer (gesund und adipös) vor und nach der Interventionsphase mit trübem Apfelsaft oder isokalorischem Kontrollgetränk in LT97 Zellen (FW 50 %, Comet Assay; n=22 gesunde Probanden, n=21 adipöse Probanden, ungepaarter t-Test, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

5 DISKUSSION

5.1 LT97 Kolonadenomzellen als Modellsystem zur Untersuchung chemopräventiver Effekte im Kolon

Schätzungen zufolge sind 70 % aller Kolonkrebserkrankungen auf einen schlechten Lebensstil, vor allem begründet in einer ungesunden Ernährungsweise, zurückzuführen^[11]. Deshalb ist es von besonderer Bedeutung, Substanzen und Mechanismen zu finden, die einer möglichen Entartung der Zellen entgegenwirken können. Zur Charakterisierung und Identifizierung chemopräventiver Effekte von Nahrungsmittelinhaltsstoffen werden im Rahmen der Grundlagenforschung häufig *in vitro*-Modelle genutzt. Im Gegensatz zu Tier- und Humanstudien haben diese preiswerten Modelle den Vorteil, dass Versuchsbedingungen einfach validierbar, zeit- und dosisabhängige Versuchsdurchläufe wiederholt möglich sind und zugrundeliegende Wirkmechanismen aufgeklärt werden können.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen zu den Effekten von Apfelpolyphenolen und ihren mikrobiellen Abbauprodukten (**Publikation I**, **Publikation III**, **Publikation IV** sowie alle **zusätzlichen Ergebnisse**) erfolgten vorrangig in LT97 Kolonadenomzellen, welche bisher in nur wenigen Studien als Modell Anwendung fanden. LT97 Zellen wurden aus kolorektalen Mikroadenomen isoliert. Sie weisen einen Verlust beider Allele des Tumorsuppressorgens *APC* und ein mutiertes *K-ras*-Onkogen auf, wohingegen *p53* normal exprimiert wird^[194]. Da sie ein präneoplastisches Stadium der Kolonkarzinogenese repräsentieren, eignen sie sich optimal für Untersuchungen zur Primär- und Sekundärprävention von Kolonkrebs.

Eine Ausnahme bildeten die Untersuchungen zum Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen der GSTT2-Enzymaktivität und der Genotoxizität von CumOOH (**Publikation II**). Hier wurden aus Gründen der Praktikabilität HT29 Zellen eingesetzt, da in dieser Zelllinie eine stabile Transfektion und damit reproduktive Ergebnisse erzielt werden konnten. Im Vergleich zu den LT97 Zellen weist das dafür verwendete Zellmodell aufgrund seines höheren Malignitätsgrades zusätzlich ein genetisch verändertes *p53*-Tumorsuppressorgen auf^[195].

Die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse sind nur eingeschränkt auf einen komplexen Organismus übertragbar, da vor allem systemische Einflüsse nicht erfasst werden können. Deshalb bedürfen sie immer einer Verifizierung in einem *in vivo*-Modell.

Dennoch sind *in vitro*-Untersuchungen und damit auch die Aufklärung von Wirkmechanismen spezifischer Testsubstanzen wichtige Bestandteile der Grundlagenforschung. Sie dienen z. B. der Eingrenzung, Fokussierung und Präzisierung der Planung und Durchführung von Tierversuchen und Humanstudien.

5.2 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die Modulation von Entgiftungsenzymen

Ein möglicher Mechanismus der Chemoprävention von Dickdarmkrebs ist die Induktion von Entgiftungsenzymen in den Kolonozyten. Durch den damit verbundenen erhöhten Schutz vor reaktiven, kanzerogenen Verbindungen kann das Risiko, an Kolonkrebs zu erkranken, reduziert werden ^[196]. Für Polyphenole (z. B. Chrysin, Quercetin, Polyphenole aus schwarzem Tee) wurden diesbezüglich bereits *in vitro*, aber auch *in vivo* im Rattenmodell induzierende Fähigkeiten beschrieben ^[197,198]. Darüber hinaus konnten *in vivo* auch für Apfelpolyphenole antikanzerogene Eigenschaften nachgewiesen werden ^[185,186,187]. Zugrundeliegende Mechanismen sind bisher allerdings nicht spezifiziert worden. Die Auswertung der Array-Analysen im Rahmen der eigenen Untersuchungen (SuperArray[®], PIQOR[™]-Array) macht deutlich, dass Apfelpolyphenole (AE) in der Lage sind, eine Reihe von Genen in LT97 Zellen zu modulieren. Diese Gene lassen sich verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen: (a) Fremdstoffmetabolismus, (b) Tumorsuppression (z. B. Proteintyrosinphosphatase *Dep-1*), (c) Zellzykluskontrolle (z. B. *Cyclinabhängiger Kinaseinhibitor 1A*), (d) Stress- und Signaltransduktion (z. B. *Glutathionperoxidase 2*) sowie (e) Apoptose (*Caspase 10*). Von den 87 auf beiden Array-Plattformen gespotteten Genen wurden insbesondere diejenigen (25 Gene im SuperArray[®], 19 Gene im PIQOR[™]-Array) durch AE induziert, die in Schlüsselprozesse des Phase II-Metabolismus involviert sind. Dazu zählen u. a. Phase II-Gene der UGT- und GST-Familien, welche nachfolgend für detailliertere Analysen ausgewählt wurden. Die Verifizierung der in den Arrays modulierten Isoformen beider Familien (*UGT1A1*, *UGT2B7*, *GSTA4*, *GSTP1*, *GSTT2*) erfolgte mittels *real-time qRT-PCR*. Zudem konnte die Gesamtaktivität der UGTs signifikant und die der GSTs tendenziell durch AE gesteigert werden (**Publikation I**). Hervorzuheben ist die Modulation der UGT1A1 als wichtigstes Isoenzym zur Entgiftung des endogen gebildeten Bilirubins ^[199]. Daneben weist es eine hohe Affinität zum heterozyklischen Amin *N*-Acetoxy-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]-

pyridin (PhIP) ^[200,201], einem in Tierstudien nachgewiesenen Tumorigen in Kolon und Brustdrüse ^[202], auf. Die UGT2B7 ist wie die Mehrheit der Isoformen der UGT2B-Familie an der Glucuronidierung und somit Entgiftung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Phenolen, Gallensäuren, Opioiden, aber auch von Steroiden beteiligt ^[203,204].

Ferner können dem AE als *blocking agent*, über die Induktion der GSTs, präventive Eigenschaften zugeschrieben werden. So ist beispielsweise die GSTP1 in die Detoxifizierung von Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE), einem reaktiven DNA-Adduktbildner, involviert ^[205,109]. Genotoxische, sekundäre Elektrophile aus Lipidperoxidationsprozessen wie das 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) unterliegen u. a. durch GSTA4 einer metabolischen Entgiftung ^[206].

Untersuchungen zur Regulation der GSTT2 spielen in der vorliegenden Arbeit eine besondere Rolle. Für dieses Enzym sind bisher nur wenige physiologische Substrate bekannt. Jedoch verweisen Untersuchungen an Ratten auf eine hohe Substratspezifität gegenüber Hydroperoxiden des Lipid- und einigen Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels ^[118]. rGSTT2 und hGSTT2 weisen allerdings eine bis zu 80 %ige Sequenzhomologie auf. Folgend lässt sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit darauf schließen, dass auch im Menschen die GSTT2 an der Reduktion von Peroxid-induziertem Stress in den Zellen maßgeblich beteiligt ist.

Letztendlich verweisen diese Ergebnisse auf eine gesteigerte Entgiftungskapazität der Kolonzellen durch Apfelpolyphenole. Diese Erhöhung könnte als primäre Präventionsmaßnahme der Entstehung eines malignen Tumors entgegenwirken ^[74].

Eine Vielzahl von Genen, die in die Entgiftung und Inaktivierung von Karzinogenen involviert sind, besitzen Sequenzen in ihrer Promotor-Region, die direkt oder indirekt u. a. über Flavonoide reguliert werden können ^[207]. Im NagermodeLL konnte nachgewiesen werden, dass sich in den Promotorsequenzen von UGTs und GSTs sogenannte *antioxidant responsive elements/electrophile responsive elements* (ARE/EpRE) befinden ^[208,209,210]. Über den in Abb. 15 gezeigten *nuclear factor-E2-related factor 2* (Nrf2)-ARE-Signaltransduktionsweg kann die Expression von Phase II-Enzymen und damit die zelluläre Abwehr durch Polyphenole gesteuert werden.

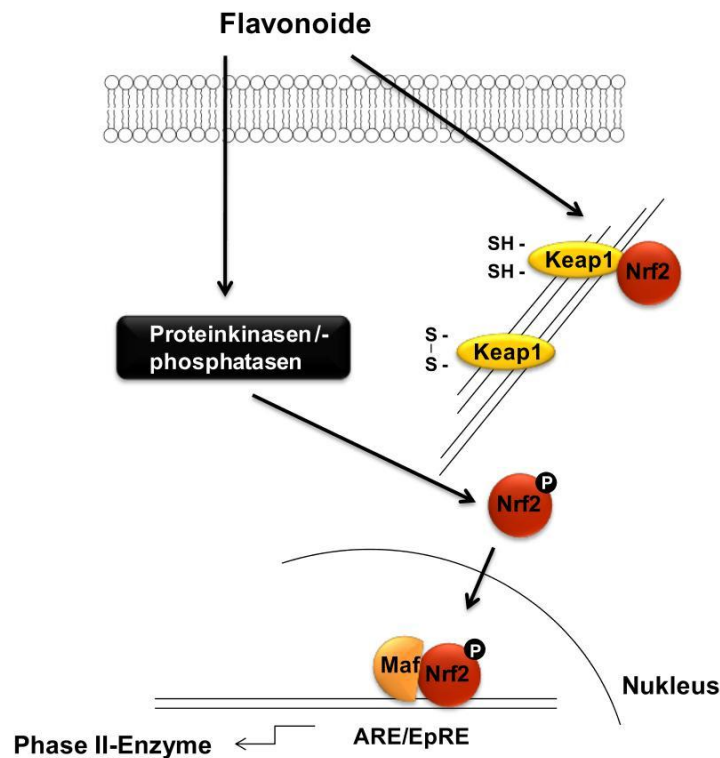


Abb. 15: Schematische Darstellung der Induktion von Phase II-Genen durch Flavonoide über den Nrf2-ARE-Signaltransduktionsweg (Modell nach ^[207])

ARE antioxidant responsive element; EpRE electrophile responsive element; Keap1 kelch-like ECH-associated protein 1; Maf v maf-musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog; Nrf2 nuclear factor-E2-related factor 2

Das *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) verhindert über die Heterodimerisierung mit dem Nrf2 dessen Translokation in den Nukleus ^[211]. Flavonoide sind in der Lage, die Bindung zwischen Nrf2 und Keap1 zu lösen. Außerdem ist die Aktivierung von Kinasen (z. B. MAP-Kinase) und damit verbunden die Stabilisierung der Nrf2-Proteine durch Phosphorylierung möglicherweise auf Polyphenole zurückzuführen ^[212]. Phosphoryliertes Nrf2 kann in den Nukleus translozieren und nach Bindung an das ARE/EpRE innerhalb der Promotor-Region die Expression von Phase II-Enzymen sowie antioxidativen Proteinen induzieren ^[213].

Mittels Luziferase Reporter-Gen-Assays in transient modifizierten HT29 Zellen (enthalten ein *pNQO1-ARE*-Reporter-Konstrukt zur Bestimmung der Nrf2-Aktivität) konnten *Nrf2*-stimulierende Substanzen im Apfelsaft wie beispielsweise der Aromastoff 3-Hydroxy- β -Damascon identifiziert werden. Allerdings wiesen diese Komponenten kein *GSTT2*-Promotor-induzierendes Potential auf. Demzufolge spricht der Befund dafür, dass der *GSTT2*-Promotor kein funktionelles ARE-Element enthält (^[214],

Publikation II). Dies deutet im Gegensatz zum aufgezeigten Signaltransduktionsweg auf eine abweichende Regulation der Expression von *GSTT2* hin. In Anbetracht der Tatsache, dass spezifisch für die Modulation der *GSTT2* in humanen Zellen bislang keine Mechanismen beschrieben wurden, sollten weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung des zugrundeliegenden Signalweges erwogen werden.

Nach Untersuchungen von Yueh *et al.* ist für das Isoenzym UGT1A1 ein weiterer Induktionsmechanismus denkbar. Tetrachlordibenzodioxin, Benzo(a)pyren, aber auch Flavonoide (z. B. β -Naphthoflavon) repräsentieren Liganden des *aryl hydrocarbon receptors* (Ah-Rezeptor) und sind erwiesenermaßen imstande, die Expression von *UGT1A1* zu modulieren ^[215,216]. Der Ah-Rezeptor ist ein induzierbarer, ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der in Abwesenheit von Liganden als inaktiver Multiproteinkomplex im Zytosol der Zelle vorliegt. Die Bindung eines Liganden führt zur Konformationsänderung des Rezeptors, in dessen Folge sich die Translokation des Rezeptor-Ligandenkomplexes in den Zellkern anschließt. Im Nukleus kommt es nach Dissoziation zur Heterodimerisierung des Rezeptors mit einem *Ah receptor nuclear translocator protein* (Arnt). Der entstandene Komplex agiert durch Bindung an das *xenobiotic responsive element* (XRE) in der Promotorregion der Gene als transkriptioneller Aktivator ^[207]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Rezeptor-Ligand-Arnt-Komplex durch die Veränderung der Chromatinstruktur zu einer verbesserten Promotorzugänglichkeit, zur Aktivierung des Promotors und schließlich zur Transkription benachbarter Gene führt ^[217].

Auch weitere Rezeptoren wie der *constitutive active/androstane receptor*, der *pregnane X receptor*, der *glucocorticoid receptor* und der *steroid xenobiotic receptor* regulieren in Abhängigkeit der Substrate die *UGT1A1*-Expression ^[218,215]. Die Ansteuerung der letztgenannten Rezeptoren durch Polyphenole ist allerdings bisher kaum belegt.

5.3 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die Modulation von induzierten DNA-Schäden

SNPs in der Promotorregion von *GSTT2* und das daraus resultierende reduzierte Expressionsniveau an *GSTT2* sind mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko assoziiert ^[125]. Demzufolge sind die Induktion dieses Gens sowie die Aktivitätssteigerung des korrespondierenden Enzyms in der Chemoprävention von Bedeutung. Eine Erhöhung des *GSTT2*-Spiegels durch Inkubation mit AE konnte sowohl in HT29 Zellen ^[219] als

auch in LT97 Zellen (**Publikation I**) gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Induktion der *GSTT2*-Promotoraktivität durch AE mittels Luziferase Reportergen-Assays in transfizierten HT29 Zellen (enthalten ein Reporter-Konstrukt mit dem Promotor des *GSTT2*-Gens) nachgewiesen (**Publikation II**). Folgerichtig galt es zu ermitteln, ob diese Expressionssteigerung auch zu einem erhöhten Schutz gegenüber induziertem Stress führt, was auf eine erhöhte enzymatische Aktivität hindeuten würde. Da die GST-Isoenzyme der Theta-Klasse keine Affinität zu 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol aufweisen, kann der herkömmliche Assay nach Habig *et al.* ^[220] die *GSTT2*-Aktivität nicht erfassen. Aus diesem Grund wurden die funktionellen Konsequenzen einer veränderten *GSTT2*-Expression durch AE über die Bestimmung des antigenotoxischen Potentials mittels Comet Assays ermittelt. Das synthetische, genotoxische Hydroperoxid CumOOH wurde als Substrat für *GSTT2* in Ratten, aber auch in humanen Leberzellen beschrieben ^[118,221,119]. Ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität von *GSTT2* in humanen Kolonzellen und der Entgiftung von CumOOH konnte in genetisch modifizierten HT29 Zellen erbracht werden (**Publikation II**). Es zeigte sich, dass *GSTT2*-überexprimierende Zellen weniger CumOOH-bedingte DNA-Schäden aufweisen, wohingegen die Empfindlichkeit bei *GSTT2*-Depletion deutlich erhöht war. Damit ist die *GSTT2* vermutlich kausal am Schutz vor Hydroperoxid-induziertem Stress in humanen Kolonozyten beteiligt.

Dieser Nachweis der direkten Korrelation zwischen der *GSTT2*-Aktivität und der Genotoxizität von CumOOH bildet die Grundlage für Untersuchungen zum Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die Modulation von induzierten DNA-Schäden. Es wurde gezeigt, dass in HT29 Zellen das Schädigungspotential von CumOOH durch AE signifikant reduziert werden kann (**Publikation II**). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Induktion der *GSTT2*-Expression durch die Apfelpolyphenole Schutz gegenüber endogen gebildeten oder exogenen, genotoxischen Substanzen gewährleistet und möglicherweise als Biomarker der Chemoprävention im Kolon genutzt werden kann.

Allerdings darf das Ergebnis in den stark transformierten HT29 Zellen nicht überinterpretiert werden. Zum einen werden diese Zellen vielfach als Modell für epitheliale Kolonozyten in Untersuchungen zu chemopräventiven Effekten und zur Aufklärung mechanistischer Wirkungen eingesetzt. Zum anderen kann eine Aktivitätssteigerung von Entgiftungsenzymen in derart entarteten Zellen auch negativ

bewertet werden. Die funktionelle Induktion von Enzymen der Biotransformation in Krebszellen könnte *in vivo* eine verminderte Ansprechbarkeit auf chemotherapeutische Medikamente – eine *multidrug resistance* – zur Folge haben ^[222]. Einbußen bezüglich der Wirkung von Zytostatika und damit der Verhinderung apoptotischer Prozesse durch Ausbleiben von DNA-Schäden können nicht ausgeschlossen werden. Ungeachtet dessen mussten die Untersuchungen aufgrund der besseren Praktikabilität zunächst in HT29 Zellen durchgeführt werden. Bedingt durch ihre kurze Generationszeit und einfache Kultivierbarkeit bieten diese Zellen bessere Bedingungen für gentechnische Modifikationen durch Transfektion, welche die Voraussetzung für den Nachweis der Enzym-Substrat-Interaktionen waren (**Publikation II**).

In Bezug auf den Transformationsgrad und dem damit verbundenen veränderten Wachstums- und Metastasierungsverhalten lassen sich LT97 Zellen eher mit gesunden Kolonepithelzellen vergleichen. Auch in diesen Zellen konnte nach Vorinkubation mit AE eine signifikant verminderte Genotoxizität von CumOOH festgestellt werden. Des Weiteren wurden auch H₂O₂-induzierte DNA-Schäden durch die Apfelpolyphenole reduziert (**Publikation III**). Dieses Ergebnis belegt Erkenntnisse ähnlicher *in vitro*-Versuche mit polyphenolreichen Apfelextrakten in Kolontumorzellen ^[223]. Ileostomie-Proben, gewonnen zwei Stunden nach Aufnahme von einem Liter trübem Apfelsaft, wiesen ebenfalls antigenotoxische Effekte gegenüber H₂O₂ in LT97 Zellen auf ^[224]. Zudem konnten in einer Studie von Schaefer *et al.* die genotoxischen Aktivitäten von Menadion, einem Substrat des Phase II-Enzyms NADPH-Quinon-Oxidoreduktase, durch AE in Caco-2 Zellen vermindert werden ^[225]. Damit wird deutlich, dass Apfelpolyphenole neben GSTT2 noch weitere Enzyme induzieren, die in die Biotransformation und die Abwehr von oxidativem Stress involviert sind. Dies wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass CumOOH neben GSTT2 in geringerem Maße auch von Glutathionperoxidasen, GSTA2-2, GSTK1-1 sowie GSTs der Mu-Klasse metabolisiert werden kann ^[226,109,227].

Alles in allem konnte also gezeigt werden, dass Apfelpolyphenole Kolonzellen über die Induktion von detoxifizierenden Enzymsystemen vor oxidativem oder genotoxischem Stress schützen können. Im Zuge dessen scheint insbesondere die Steigerung der GSTT2-Aktivität ein wichtiger Mechanismus der Chemoprävention durch AE zu sein.

5.4 Abhängigkeit der chemopräventiven Effekte von Alter/ Lagerung und der Zusammensetzung der komplexen Testsubstanzen

Bedingt durch die Vielzahl an unterschiedlichen Untersuchungen mit dem AE wurde die Charge 02 (AE[A]), produziert aus der Apfelernte des Jahres 2002, aufgebraucht. Um weiterführende Analysen durchführen zu können, wurde eine neue Charge desselben Erntejahres und derselben Produktionslinie nachgefordert (AE[B]). Um das chemopräventive Potential des AE[B] untersuchen und mit dem des AE[A] vergleichen zu können, wurden ausgewählte Versuche analog zu den vorhergehenden wiederholt. Dabei zeigte sich, dass der nachgeforderte AE[B] in LT97 Zellen weder die *GSTT2*-Expression induzieren, noch CumOOH-induzierte DNA-Schäden reduzieren konnte (**Publikation III**). Nachträgliche Recherchen ergaben, dass der AE[B] bereits mehrere Jahre bei Raumtemperatur lagerte. Eine parallel dazu durchgeführte Analyse der Polyphenolzusammensetzung des Extraktes sollte Aufschluss über mögliche Ursachen für den Aktivitätsverlust des AE[B] geben. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, dass dessen Gesamtpolyphenolgehalt gegenüber der verbrauchten, stets kühl gelagerten Charge AE[A] um mehr als die Hälfte reduziert war. Die Einbußen betrafen hauptsächlich die Polyphenolsubklassen der Flavanole, der Dihydrochalkone und der Flavonole. Demgegenüber wurden zusätzlich Aglykone wie Quercetin oder Phloretin detektiert, was auf mögliche Degradierungsprozesse zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse anderer Gruppen. So zeigten Spanos *et al.* eine Abnahme an Polyphenolen, v. a. an Procyanidinen und Quercetin-Glycosiden, in Apfelsaftkonzentraten nach einer Lagerung von neun Monaten bei 25 °C ^[228]. Die zunehmende Instabilität von Flavonoiden während längerer Lagerzeiten konnte auch von Montoro *et al.* belegt werden. Eine stabile Polyphenolzusammensetzung und damit eine unveränderte, antioxidative Kapazität blieben lediglich über einen Zeitraum von drei Monaten vollständig erhalten ^[229]. Die zur Veränderung der Zusammensetzung beitragenden Faktoren sind vielseitig. Es ist erwiesen, dass exogene Faktoren wie Sauerstoff, UV-Licht, Temperatur- und pH-Wert-Änderungen Einfluss auf Polyphenole nehmen und Degradierungsprozesse sowie damit einhergehende, veränderte biologische Aktivitäten bedingen ^[230,231,232,233].

Mit einer synthetischen Polyphenolmischung (SPM) analog der Konzentrationen des effektiven AE[A] sollten die chemopräventiven Effekte hinsichtlich der *GSTT2* auf Genexpressions- und funktioneller Ebene verifiziert werden. Allerdings konnten diesbezüglich für SPM in LT97 Zellen keine Effekte nachgewiesen werden. Das kann

zum einen daran liegen, dass lediglich ein Teil der detektierten Polyphenole im AE[A] (Gesamtpolyphenolgehalt: 480,4 mg/g) kommerziell erhältlich und damit in SPM (Gesamtpolyphenolgehalt: 264,7 mg/g) enthalten waren. Die Existenz relevanter, aktiver Komponenten in SPM kann darüber ausgeschlossen werden. In Folge dessen können die phenolischen Verbindungen, die nicht in SPM enthalten waren, für die Effekte des AE[A] verantwortlich gemacht werden. Zum anderen war zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen die Zusammensetzung der aus Apfelsaft isolierten AE nicht vollständig aufgeklärt. Spätere Analysen durch Huemmer *et al.* wiesen zusätzlich einen hohen Anteil an hochmolekularen Procyanidinen (oligomer, polymer) nach ^[234]. Diese, ebenfalls nicht käuflich zu erwerbenden Verbindungen, sind gegenüber exogenen Faktoren stark anfällig und damit extrem instabil ^[228]. Demzufolge ist davon auszugehen, dass den Procyanidinen sowie den Dihydrochalkonen, die in AE[B] und im SPM vermindert vorhanden bzw. nicht enthalten waren, eine wesentliche Rolle bei den beschriebenen, chemopräventiven Wirkungen zugeschrieben werden kann. Darüber hinaus können möglicherweise auch synergistische Effekte des komplexen Polyphenolgemisches von Bedeutung sein, die durch das Fehlen einzelner Komponenten mit SPM oder AE[B] nicht erfasst werden.

Trotz der fehlenden GSTT2-induzierenden Effekte wies AE[B], im Vergleich zu SPM und AE[A], eine höhere antiproliferative Kapazität in LT97 Zellen auf (**Publikation III**). Da der Einfluss von SPM und AE[A] diesbezüglich vergleichbar war, können mögliche Degradierungs- und Oxidationsprodukte der Polyphenole in AE[B] dafür verantwortlich gemacht werden. Vor allem den auf Deglycosylierungsreaktionen zurückzuführenden Aglykonen (Quercetin und Phloretin) kann der zusätzliche Effekt auf die Zellzahl zugeschrieben werden. Veeriah *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass diese Aglykone die Zellzahl von HT29 reduzieren, wenn auch nicht so effektiv wie der Gesamt-AE ^[219].

Insgesamt machen die vorliegenden Daten deutlich, dass Untersuchungen mit instabilen, isolierten Nahrungsbestandteilen gut geplant und möglichst zügig durchgeführt werden sollten. Die polyphenolischen Komponenten müssen währenddessen optimal gelagert werden, um jegliche Abbauprozesse und damit verbundene Veränderungen in der Zusammensetzung zu minimieren.

5.5 Chemopräventive Effekte ausgewählter Polyphenolmetabolite

Ein Großteil der Polyphenole erreicht aufgrund allgemein geringer Resorptionsraten im Dünndarm und des Rücktransportes metabolisierter Komponenten über den biliären Stoffwechselweg den Dickdarm ^[143]. Dort unterliegen sie einer raschen mikrobiellen Umsetzung ^[156,165]. Die Kolonozyten sind daher über die Fäzesmatrix auch den Polyphenolmetaboliten ausgesetzt. Damit gewährleistet das Arbeiten mit relevanten Metaboliten eine bessere Annäherung an die *in vivo*-Situation im Menschen. Um das chemopräventive Potential von Abbauprodukten genauer abschätzen zu können, wurden vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Modulation der Genexpression und Aktivität von *GSTT2* durch die Polyphenolmetabolite ES und PS durchgeführt (**Publikation IV**). Es handelt sich dabei um einfache Phenolsäuren, die über eine Reihe von bakteriell katalysierten Abbaureaktionen wie Deglycosylierungen, Reduktionen von Doppelbindungen und Spaltungen von Ringsystemen entstehen. Es zeigte sich, dass beide Metabolite in physiologischen Konzentrationen (angelehnt an Gehalte im FW gesunder Probanden nach 4-wöchiger Aufnahme von trübem Apfelsaft ^[235]) die Expression von *GSTT2* sowie die *GSTT2*-Aktivität in LT97 Zellen signifikant induzierten. Damit besitzen die Darmfermentationsprodukte ES und PS diesbezüglich in den Kolonozyten ein nahezu identisches, chemopräventives Potential wie die unmetabolisierten Polyphenole im AE (**Publikation I**). Des Weiteren sind die Ergebnisse mit denen der kurzkettigen Fettsäure Butyrat vergleichbar. Pool-Zobel *et al.* zeigten eine signifikante Steigerung der *GSTT2*-Genexpression durch Butyrat in den LT97 Adenomzellen ^[236]. Außerdem verweisen Studien von Sauer *et al.* auf *GSTT2*-induzierende Wirkungen dieser Fettsäure in primären, gesunden Kolonepithelzellen ^[237].

Bei der Betrachtung von protektiven Mechanismen der Chemoprävention spielt neben der Induktion des Phase II-Metabolismus auch die Repression von Phase I-Enzymen eine entscheidende Rolle. Deshalb wurde in dieser Arbeit insbesondere die Aktivität der COX-2, als Mediator inflammatorischer Prozesse und damit potentieller Induktor von Zelltransformationen ^[92], untersucht. Die Gruppe um Oshima *et al.* konnte im *APC^{Δ716}-knockout* Mausmodell zeigen, dass die Gabe eines selektiven COX-2-Inhibitors eine starke Abnahme von Anzahl und Größe der durch die Mutation im *APC*-Gen hervorgerufenen Adenome bewirkt. Generell ist die Einnahme von COX-2-selektiven

Inhibitoren, aber auch von klassischen NSAIDs mit einer Reduktion des Kolonkrebsrisikos verbunden ^[94,238]. Den unmetabolisierten Polyphenolen wie Chlorogensäure und Quercetin wurden in der Literatur nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* COX-2-regulierende Fähigkeiten zugeschrieben ^[239,240,241]. Auch ES und PS wiesen in den eigenen Untersuchungen an LT97 Zellen, zu allen getesteten Zeitpunkten und in physiologischen Konzentrationen, COX-2-inhibierende Eigenschaften auf. Dies konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, analysiert mittels *real-time qRT-PCR* und Western Blot, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stützen die Studien von Karlsson *et al.* ^[242] in denen gezeigt werden konnte, dass humane FW, welche nachgewiesene Mengen an phenolischen Abbauprodukten (z. B. Phenylessig-, Phenylpropionsäuren und Chinasäurederivate) enthielten, die TNF α -induzierte COX-2-Proteinkonzentration in HT29 Zellen signifikant vermindern. Folglich könnte die Aufnahme von polyphenolreichem Obst oder Gemüse und daraus hergestellten Säften durchaus auf natürliche, nicht-medikamentöse Weise Schutz vor inflammatorischen Prozessen im Darm und auch weitreichender vor Zellentartungen bieten.

Die Expression einer Vielzahl von Enzymen, die an der Modulierung einer Immunantwort und an Entzündungsprozessen beteiligt sind (z. B. die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase), wird über den *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B)-Signaltransduktionsweg (Abb. 16) reguliert ^[243]. Ebenso scheint die COX-2 in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors NF κ B exprimiert zu werden ^[84].

Zu den Stimuli dieses Signaltransduktionweges zählen proinflammatorische Zytokine (z. B. TNF α , Interleukin-1), virale und bakterielle Antigene (z. B. Lipopolysaccharide), aber auch exogene Noxen (z. B. UV-Strahlung) ^[244]. Diese Faktoren bewirken die Aktivitätssteigerung von Kinasen, die über Phosphorylierungsreaktionen weitere Schritte des Signaltransduktionweges einleiten. Folgend kommt es zur Aktivierung des I κ B (*inhibitor kappa B*)-Kinase-Komplexes (IKK, *inhibitor kappa B kinase*), der wiederum für die Phosphorylierung und damit auch Markierung für die Ubiquitylierung des Inhibitorproteins I κ B im Komplex mit NF κ B verantwortlich ist. Ubiquityliertes I κ B wird im Proteasom abgebaut. Der darüber aktivierte Transkriptionsfaktor NF κ B kann in den Kern translozieren und seine transkriptionsregulierende Funktion an Zielgenen ausüben ^[245].

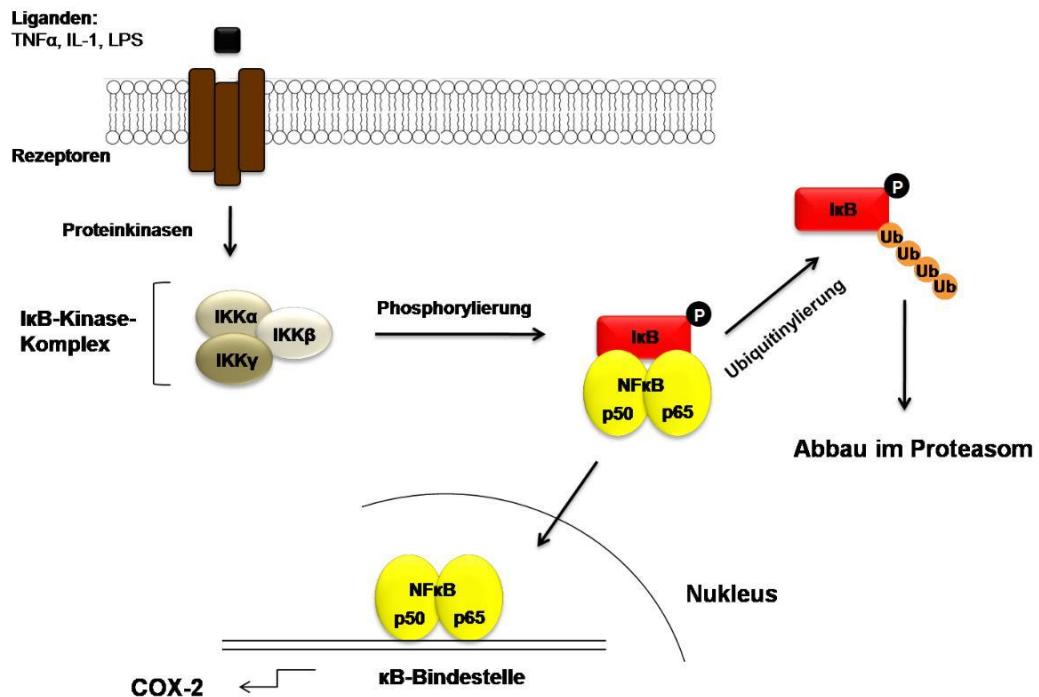


Abb. 16: Schematische Darstellung der Induktion der *COX-2*-Genexpression über den NF κ B-Signaltransduktionsweg (Modell nach ^[245])

COX-2 Cyclooxygenase-2; I κ B inhibitor kappa B; IKK inhibitor kappa B kinase; IL-1 Interleukin-1; LPS Lipopolysaccharid; NF κ B nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; p50/p65 50 kDa/65 kDa-Untereinheiten von NF κ B; TNF tumor necrosis factor; Ub Ubiquitinreste

Ein gesteigertes COX-2-Transkriptionsniveau in den Zellen lässt sich durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe und deren mikrobielle Abbauprodukte reduzieren. So zeigten Untersuchungen von Plummer *et al.*, dass Curcumin die IKK-Aktivität in Kolonzellen inhibieren kann ^[246]. Für kurzkettige Fettsäuren wurden Einflüsse auf die Proteasom- und Kinaseaktivitäten beschrieben ^[247]. Ebenso inhibierten Apfelextrakte signifikant die Proteasomtätigkeiten in MCF-7 Brustkrebszellen ^[248]. Über diese Angriffspunkte können sowohl die Expression von COX-2 als auch abhängige entzündliche Prozesse vermindert werden. Ob und inwieweit Polyphenolmetabolite in die beschriebenen Mechanismen eingreifen können, bedarf zusätzlicher Studien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die detektierten chemopräventiven Effekte der Polyphenolmetabolite mit denen der unmetabolisierten Polyphenole im AE vergleichbar waren. Die Nutzung von relevanten Metaboliten in physiologischen Konzentrationen reflektiert dabei die *in vivo*-Situation im humanen Kolon wesentlich besser. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen zu potentiell protektiven Eigenschaften von Polyphenolen im Kolon noch stärker berücksichtigt werden.

5.6 Chemopräventive Effekte der fermentierten Trubfraktion eines Apfelsaftes

Der Trubfraktion des Apfelsaftes kann möglicherweise eine besondere Rolle in der Prävention von Kolonkrebs zugeschrieben werden, da die stärksten antigenotoxischen, proliferationshemmenden sowie ACF-minimierenden Effekte im Tiermodell Ratte nach Gabe von trübem Apfelsaft zu verzeichnen waren ^[185,186]. Dies kann auf den gegenüber klaren Säften wesentlich höheren Anteil an Polyphenolen zurückzuführen sein ^[178]. Der trübe Apfelsaft zeichnet sich insbesondere durch einen beträchtlichen Gehalt an oligomeren und polymeren, aber auch an monomeren Procyanidinen aus ^[234]. Bereits geringe Mengen einer Procyanidin-Fraktion konnten die Bildung von AOM-induzierten ACF in Ratten minimieren ^[187]. Ein weiterer, grundlegender Bestandteil der Apfeltrubfraktion ist das Pektin ^[249], welches in hohen Konzentrationen in den Zellwänden des Apfels zu finden ist ^[250]. In naturtrüben Apfelsäften betragen die durchschnittlichen Pektinkonzentrationen teilweise über 1000 mg/l, gemessen am Gehalt der Galakturonsäurederivate ^[251]. Mit dem Entfernen der unlöslichen Bestandteile bei der Herstellung von klaren Säften (z. B. durch Zentrifugationsschritte) wird auch der Gehalt an Pektinen stark vermindert ^[252]. Pektine sind pflanzliche Polysaccharide, die aus glycosidisch miteinander verbundenen α -D-Galacturonsäuremonomeren sowie α -L-Rhamnoseeinheiten aufgebaut sind. Sie gehören zur Gruppe der löslichen Ballaststoffe und unterliegen damit erst im Dickdarm einer Metabolisierung durch die intestinale Mikroflora. Dabei werden kurzkettige Fettsäuren gebildet ^[253], unter denen vor allem dem Butyrat ein chemopräventives Potential in der Kolonkarzinogenese zugeschrieben wird (zusammengefasst durch ^[254]). In einer Untersuchung von Rao *et al.* bewirkte eine mehrwöchige Applikation von 10 % Pektin eine signifikante Reduktion der Anzahl und Größe an ACF in AOM-behandelten Ratten ^[255]. In weiteren tierexperimentellen Studien führte die Gabe von 6 % Pektin über einen Zeitraum von 9 Tagen zu einer Reduktion der epithelialen Hyperproliferation ^[256]. Die Applikation von 20 % Pektin beginnend 3 Wochen vor der AOM/DMH-Behandlung unterdrückte signifikant die Entstehung von ACF und Tumoren ^[257]. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die *in vivo*-Effekte von trübem Apfelsaft, zumindest partiell, durch die Procyanidine und durch das Pektin bedingt sein könnten.

Für den durch *in vitro*-Fermentation generierten Fermentationsüberstand einer Apfelsafttrubfraktion (FÜ Trub) konnten in den gewählten Konzentrationen und Zeiten

im Vergleich zur mitgeführten Leerkontrolle ohne Testsubstanz (FÜ Blank) keine signifikant erhöhten chemopräventiven Effekte in LT97 Zellen detektiert werden. So wurden durch FÜ Trub weder die durch AE und/oder Polyphenolmetabolite modulierten Phase I und Phase II-Gene (z. B. *COX-2*, *GSTT2*) verändert (Mechanismus der Primärprävention), noch konnte eine Wirkung auf die Sekundärprävention von Kolonkrebs durch Induktion apoptotischer Prozesse nachgewiesen werden (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 7**). Grund hierfür könnte die geringe Konzentration an FÜ (subtoxische Konzentrationen ermittelt über DAPI-Assay) in den Untersuchungen sein. Der Konzentrationsbereich musste aber an das Zellkulturmodell angepasst werden, um optimale Versuchsbedingungen ohne Verfälschungen zu gewährleisten. Generell konnten im FÜ Trub, verglichen zum FÜ Blank, signifikant höhere Konzentrationen an Butyrat ($4,4 \pm 0,4 \text{ mM} \rightarrow 6,9 \pm 0,1 \text{ mM}$, $p < 0,001$) und Acetat ($11,6 \pm 2,3 \text{ mM} \rightarrow 18,9 \pm 1,5 \text{ mM}$, $p < 0,01$) nachgewiesen werden. Doch lagen die tatsächlich eingesetzten Konzentrationen an Butyrat in den 10- bis 80-fachen Verdünnungen der FÜ mit Zellkulturmedium deutlich unter 1 mM. Pool-Zobel *et al.* berichteten, dass 2 mM Butyrat den Fremdstoffmetabolismus in LT97 Zellen modulieren und die Phase II-Gene *GSTT2* und *GSTP1* induzieren konnte ^[236]. Darüber hinaus untersuchte die Gruppe um Roy *et al.* den Einfluss von Butyrat auf die Induktion apoptotischer Prozesse in Caco-2 Kolonadenokarzinomzellen. Um dabei einen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate zu garantieren, mussten Butyratkonzentrationen von 2,5 bis 10 mM verwendet werden ^[258]. Diese Erkenntnis konnte in den eigenen Versuchen durch die mitgeführte Positivkontrolle Butyrat 10 mM in LT97 Zellen bestätigt werden (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 7**). Demnach scheinen die mit den FÜ eingesetzten Konzentrationen an Butyrat außerhalb des effektiven, aber auch des physiologischen Bereiches im Dickdarm (absolute Konzentrationen in humanem Fäzes: 11 – 25 mM Butyrat, zusammengefasst durch ^[254]) zu liegen. Darüber hinaus konnten in den FÜ keine Polyphenole/Metabolite nachgewiesen werden, obwohl vor allem Procyanidine durch die Trubfraktion in das System der simulierten, gastrointestinalen Passage eingebracht wurden. In einem Vorversuch wurde die Eignung der *in vitro*-Fermentationsmethode für die Testsubstanz Apfelsafttrub überprüft. Zu diesem Zweck erfolgte die Simulation der gastrointestinalen Passage bis einschließlich Dünndarm. Die anschließende Analyse des Retentates („Dünndarminhalt“) ergab nachweisbare Mengen an Polyphenolen, die damit auch der *in vitro*-Fermentation und spezifisch dem

mikrobiellen Abbau zur Verfügung standen. Folglich müssten in den FÜ Trub auch phenolische Fermentationsprodukte nachzuweisen sein. Dies war aber nicht der Fall. Um die wässrige Phase für die Zellkulturversuche zu extrahieren, sind bei der Aufarbeitung der FÜ mehrere Zentrifugationsschritte notwendig. Insofern könnte ein Großteil der Polyphenole bzw. Metabolite in das Fäzespellet übergegangen und damit nicht mehr oder nur in sehr geringen Mengen unterhalb der Detektionsgrenze in den FÜ enthalten sein. Auf diese Weise ließen sich auch die fehlenden chemopräventiven Effekte erklären.

Schlussendlich muss die Eignung der *in vitro*-Fermentationsmethode zur Probenaufbereitung der Apfelsafttrubfraktion für Zellkulturversuche in Frage gestellt werden. Aufgrund der Unlöslichkeit der Trubpartikel in allen für *in vitro*-Untersuchungen gängigen Lösungsmittel und Zellkulturmedien kann die gewählte Herangehensweise jedoch nicht kritisiert werden. Dies wäre nicht zuletzt auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass das Arbeiten mit „physiologisch“ metabolisierten Verbindungen die Aussagekraft der Ergebnisse zur Abschätzung des kolonprotektiven Potentials verbessert.

5.7 Einfluss einer Apfelsaftintervention auf chemopräventive Effekte des Biomarkers Fäzeswasser

In den *in vitro*-Untersuchungen waren sowohl AE, isoliert aus einer Mischung von sortenreinen Apfelsäften, als auch die beiden getesteten Polyphenolmetabolite ES und PS in der Lage, die Expression von *GSTT2* in humanen Kolonozyten zu induzieren. Auch reduzierten die genannten Testsubstanzen die durch CumOOH induzierten DNA-Schäden in den Zellen (**Publikation I, II, III, IV**). Allerdings konnte unter Verwendung des FÜ Trub nach *in vitro*-Verdau kein Hinweis darauf gegeben werden, ob auch die *in vivo* gebildeten Polyphenolmetabolite/SCFA nach Aufnahme von trübem Apfelsaft vergleichbare Effekte aufweisen können. Antworten hierzu sollte die Auswertung der humanen Apfelsaftinterventionsstudien unter Nutzung des Biomarkers FW geben (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 9**). LT97 Zellen wurden dafür zunächst mit den FW von gesunden, männlichen Probanden ($BMI \sim 23,3 \pm 1,2 \text{ kg/m}^2$), gewonnen aus Stuhlproben vor und nach der vierwöchigen Intervention mit trübem Apfelsaft bzw. Kontrollgetränk, analog zu allen bisher durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen inkubiert (*ex vivo*). In den FW der Probanden nach Apfelsaftintervention, nicht aber vor

Apfelsaftaufnahme oder in der Kontrollgruppe, konnten die Polyphenole Phloretin ($0,53 \pm 0,16 \mu\text{M}$) und Epicatechin ($0,67 \pm 0,31 \mu\text{M}$) vorwiegend in Form von Phase II-Konjugaten (Glucuronide, Sulfate) nachgewiesen werden. Daneben wurden auch einfache Phenolsäuren detektiert, die als Biomarker einer Polyphenolaufnahme gelten^[165]. Insbesondere für die apfelrelevanten Metabolite ES ($1,3 \mu\text{M} \rightarrow 8,3 \mu\text{M}$), PS ($7,1 \mu\text{M} \rightarrow 20,1 \mu\text{M}$) und 4-Hydroxyphenylelessigsäure ($25,9 \mu\text{M} \rightarrow 56,5 \mu\text{M}$) waren nach Apfelsaftintervention teilweise signifikant erhöhte Konzentrationen im FW nachweisbar, wobei die Werte intra- und interindividuell stark variierten^[235]. Wie *in vitro* mit Reinsubstanzen bereits gezeigt, könnte diese Mischung aus mikrobiellen Abbauprodukten chemopräventive Effekte *in vivo* bedingen. Demgegenüber konnte nach Intervention mit trübem Apfelsaft in den FW keine Zunahme der SCFA (Acetat, Propionat, Butyrat) detektiert werden, was auf eine eher geringe zusätzliche Aufnahme von Ballaststoffen (z. B. Pektin) durch den Apfelsafttrub schließen lässt.

Die FW der gesunden Probanden beider Gruppen wiesen in den getesteten Konzentrationen keine zytotoxischen und keine genotoxischen Eigenschaften in LT97 Zellen auf. Jedoch war nach gemeinsamer Kurzzeitinkubation mit CumOOH auch keine Abnahme der induzierten DNA-Schäden nachzuweisen (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 9, Abb. 10**). Dies deutet darauf hin, dass keine direkten Abfangreaktionen durch die FW-Inhaltsstoffe stattfanden. Die generell für Polyphenole beschriebenen antioxidativen Eigenschaften^[259] konnten demzufolge für die in den FW enthaltenen Apfelpolyphenole bzw. Metabolite nicht bestätigt werden. Darüber hinaus konnte in einem 24 h-Langzeitversuch mit einer FW-Konzentration von 2,5 % (subtoxische Konzentration ermittelt im DAPI-Assay) für keine der Gruppen eine *GSTT2*-induzierende Wirkung oder eine Verminderung der CumOOH-induzierten Schäden in LT97 Zellen gezeigt werden (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 11, Abb. 12**).

Neben der Untersuchung primärpräventiver Mechanismen sollte ebenso die Sekundärprävention Beachtung finden. Kern *et al.* konnten über den Nachweis der Induktion der Caspase 3, der DNA-Fragmentierung sowie der Spaltung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) durch AE auch apoptotische Wirkungen von Polyphenolen in HT29 Kolonzellen beschreiben^[260]. Vergleichbares wurde für die Aglykone Quercetin und Phloretin nachgewiesen. Vor allem Phloretin aktivierte in HT29 Zellen sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Signalweg der Apoptose, was durch die veränderte Permeabilität der Mitochondrienmembran und die Modulation von

Caspasetätigkeiten belegt wurde ^[261]. Hingegen konnten nach Apfelsaftintervention keine zusätzlichen Apoptose-fördernden Eigenschaften der FW (wachstumsmodulierende Konzentrationen von 5 % und 10 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe in LT97 Zellen ermittelt werden (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 13**).

Somit war es unter Verwendung des Biomarkers FW nicht möglich die *in vitro* gefundenen Effekte auf die *ex vivo*-Situation zu übertragen. Allerdings sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass auch hier die FW-Konzentration (2,5 % bis 10 %) einen limitierenden Einfluss auf die Effekte haben könnte. *In vivo* sind die Kolonozyten nahezu 100 % der Fäzesmatrix ausgesetzt, was bedeutet, dass potentiell kanzerogene Verbindungen, aber auch protektive Komponenten wie kurzkettige Fettsäuren oder Polyphenolmetabolite in weitaus höheren Konzentrationen ihre Wirkung entfalten können. Befinden sich beispielsweise in 100 % Fäzes/FW physiologisch 25 µM PS (effektive Konzentration *in vitro*) und können zellkulturbedingt nur 2,5 % FW für die Untersuchungen zur Modulation der Genexpression gewählt werden, so waren die LT97 Zellen lediglich 0,625 µM PS über einen definierten Zeitraum ausgesetzt. Ungeachtet dessen mussten die *in vitro*-Untersuchungen im gewählten FW-Konzentrationsbereich stattfinden, da ein Einfluss zytotoxischer Effekt von FW-Inhaltsstoffen (wie Gallensäuren, Ammoniak) für die Endpunktbestimmung (z. B. GSTT2-Aktivität) ausgeschlossen werden sollte. Diese geringen Konzentrationen spiegeln jedoch nicht die tatsächlichen Verhältnisse im Kolon wider, was die Bewertung der Zellkulturversuche *ex vivo* schwierig macht.

Fehlende chemopräventive Effekte bzw. fehlende Unterschiede zwischen den Ergebnissen in Apfelsaft- und Kontrollgruppe diesbezüglich können indes auch auf das Studiendesign zurückzuführen sein. Zum einen wurde der Genuss polyphenolhaltiger Lebensmittel (wie z. B. Kaffee, Tee, Wein, Obst, Gemüse) während der Interventionsphasen eingeschränkt erlaubt (1 Tasse/1 Glas/1 Portion pro Tag, siehe Anhang Tab. 5), was zu einer Verfälschung der Fäzesparameter und damit auch der Ergebnisse führen könnte. Unter Gewährleistung einer gesunden und ausgewogenen Ernährung über einen Studienzeitraum von fünf Wochen kann allerdings die Aufnahme von Polyphenolen, aufgrund ihrer ubiquitären Verteilung in pflanzlichen Lebensmitteln, nie vollständig ausgeschlossen werden.

Zum anderen kann das Paralleldesign der Studie mögliche Effekte verschleiern. Die interindividuellen Unterschiede innerhalb eines Probandenkollektives kommen in

Humanstudien stark zum Tragen und erschweren die Auswertung und die Zuordnung der detektierten Effekte zu bestimmten Interventionsmaßnahmen. Die Wahl zweier unabhängiger Gruppen für die Kontrollgetränk- und die Apfelsaftgabe begrenzt damit noch zusätzlich die Vergleichbarkeit und Interpretation der Ergebnisse der humanen Interventionsstudie. Mit einer randomisierten, placebo-kontrollierten Studie im Cross-over-Design könnte dieser nicht zu unterschätzende Faktor der Individualität jedes Probanden eingeschränkt und die Aussagekraft möglicherweise verbessert werden.

Als Einschränkung ist darüber hinaus der Stichprobenumfang der Studie einzustufen. Mit einer Anzahl von etwa 30 Personen pro Interventionsgruppe, die sich innerhalb der Fäzesspender auf teilweise weniger als 12 Probanden reduzierte, ist es schwierig statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen, die letztlich auf die breite Bevölkerung übertragen werden sollen.

Zahlreiche epidemiologische Studien verweisen auf einen Zusammenhang zwischen Adipositas (Body Mass Index (BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) und einem erhöhten Dickdarmkrebsrisiko (zusammengefasst durch ^[262]). Diese Assoziation besteht vor allem bei Männern und weniger bei Frauen ^[263]. Demgegenüber sind für beide Geschlechter sowohl der Bauchumfang als auch das Verhältnis Taille zu Hüfte von Bedeutung. Daraus lässt sich ableiten, dass die Fettverteilung und insbesondere das Vorhandensein von abdominalem Fett eine Rolle spielen ^[264]. Die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen sind noch weitestgehend unklar. Adipöses Gewebe sekretiert selbst eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (die sogenannten Adipokine wie Interleukin-6, TNF α), welche über die Induktion systemischer Entzündungsreaktionen das Krebsrisiko erhöhen können ^[265]. Durch Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe werden diese zudem zu Hauptproduzenten entzündlicher Zytokine (TNF α , Interleukin-1). Des Weiteren ist Leptin, ein in Adipozyten gebildetes Hormon, möglicherweise in der Lage die Expression von NF κ B zu induzieren, was eine gesteigerte Zellproliferation, eine verminderte Apoptosefähigkeit und wiederum die Bildung proinflammatorischer Mediatoren zur Folge haben kann ^[266,267].

Die eigenen Untersuchungen geben Hinweise auf einen weiteren Mechanismus für die Entstehung von Kolonkrebs. So waren die FW der adipösen Probanden signifikant

genotoxischer als die der gesunden Probanden aus den Apfelsaftinterventionsstudien (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 14**). Der BMI korreliert positiv mit systemischem, oxidativen Stress^[268]. Dieser oxidative Stress lässt sich im Rahmen der *western style diet*, einer typischen Ursache für Adipositas, nachweisen^[269] und führt im Fäzes des Menschen zur vermehrten Bildung und Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)^[270]. Damit lässt sich ein erhöhtes genotoxisches Potential von FW nach Aufnahme einer fett- und fleischreichen Kost gegenüber einer gesünderen, ballaststoffreichen Ernährung begründen^[271]. Bei einem erhöhten Fettverzehr steigt beispielsweise die Wahrscheinlichkeit der Entstehung genetischer Veränderungen durch Lipidperoxidationsprodukte^[272]. Über Lipidperoxidationsprozesse können reaktive Verbindungen (z. B. 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyd) entstehen, die wiederum die Bildung exozyklischer DNA-Addukte fördern^[273].

Ursachen sind allerdings nicht ausschließlich in der vermehrten Produktion von ROS zu suchen. Durch einen hohen Fettanteil in der Nahrung werden verstärkt primäre Gallensäuren über die Galle in den Darm sekretiert, welche durch die Intestinalflora (v. a. durch Anaerobier) über Dekonjugations- und Oxidationsschritte zu sekundären Gallensäuren umgewandelt werden können^[274,275]. Es konnte gezeigt werden, dass die fäkale Exkretion sekundärer Gallensäuren und damit einhergehendem gesteigerten Kolonkrebsrisiko in Bevölkerungsgruppen mit industrialisierter Ernährungsweise (z. B. Amerikaner) signifikant höher ist, als in Gruppen mit geringem Risiko für Dickdarmkrebs (z. B. Chinesen, Japaner) (zusammengefasst durch^[276]). Die sekundären Gallensäuren (wie Desoxycholsäure, Lithocholsäure) sind hydrophober als ihre Vorläufer, können deshalb besser absorbiert werden und entfalten so metabolische und toxische (zytotoxische und genotoxische) Wirkungen^[277]. Insbesondere die Desoxycholsäure ist als Promotor für die Entstehung von kolorektalen Tumoren einzustufen, da sie mit der Aktivierung von Signaltransduktionswegen (u. a. MAP-Kinase-Kaskade, NFκB-Signalweg) in Verbindung gebracht wird^[278,279,280].

Auch verschiedene Formen der Lebensmittelzubereitung fördern die Bildung kanzerogener Verbindungen. So können Erhitzungsprozesse für die Entstehung von heterozyklischen aromatischen Aminen sowie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen verantwortlich gemacht werden^[4].

Die Beteiligung der Darmflora bzw. bestimmter bakterieller Spezies an der Entwicklung kolorektaler Krebserkrankungen wurde bereits in verschiedenen *in vivo*-Studien

bestätigt (zusammengefasst durch ^[281]). Einige Bakterienspezies sind aufgrund ihrer spezifischen Enzymausstattung (z. B. β -Glukuronidasen, Azo- und Nitroreduktasen) in der Lage, toxische und kanzerogene Verbindungen zu synthetisieren. Alimentär aufgenommenes Nitrat (Trinkwasser, Gemüse) wird durch die Aktivität der mikrobiellen Nitrat-Reduktase im Kolon zu Nitrit reduziert ^[281]. Nitrit kann wiederum intestinal (v. a. im Magen) zur Bildung von kanzerogenen N-Nitrosoverbindungen (Nitrosamine) führen. Nitrosamine kommen außerdem direkt in einigen Lebensmitteln wie geräucherten/gepökelten Fleisch- und Wurstwaren sowie Käse vor. Auch diese Substanzklasse ist mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko assoziiert ^[282].

Ungeachtet dessen kann nicht nur ein „Zuviel“ an risikobehafteten Lebensmitteln, sondern auch ein „Zuwenig“ an protektiven Verbindungen die Genotoxizität von FW und das Ausmaß der Folgen beeinflussen. Am Beispiel der Ballaststoffe kann die Bedeutung einer gesunden Ernährungsweise für die Darmgesundheit kurz veranschaulicht werden. Ballaststoffe entfalten ihre krebsprotektive Wirkung über verschiedene Mechanismen. Zum einen sind sie in der Lage, karzinogene Substanzen im Darm zu binden, wodurch die Kontaktzeit dieser Verbindungen mit dem Darmepithel deutlich verkürzt wird. Zum anderen werden die Ballaststoffe selbst durch die intestinale Mikroflora zu chemopräventiv wirksamen SCFA fermentiert. Diese Fermentationsprodukte nehmen zudem Einfluss auf den pH-Wert im Kolon, der wiederum für die Zusammensetzung des intestinalen Bakterienprofils und für die Löslichkeit der Gallensäuren verantwortlich ist ^[283,284,285].

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass über den gesamten Zeitraum beider Interventionsstudien (normalgewichtige, gesunde und adipöse Probanden) keine ausführlichen Ernährungsprotokolle geführt wurden. Es wurde lediglich die Aufnahme der eingeschränkt erlaubten, polyphenolreichen Lebensmittel (z. B. Tee, Kaffee) dokumentiert. Außerdem erfolgte keine Analyse und Quantifizierung von potentiell kanzerogenen Verbindungen in den FW. Vor diesem Hintergrund gestaltet sich die Ursachenfindung für die erhöhten Genotoxizitäten der FW adipöser Probanden und die genaue Zuweisung als schwierig. Deshalb beruhen alle hier aufgeführten, möglichen Gründe lediglich auf Mutmaßungen.

Zu beachten bleibt, dass die vierwöchige Intervention mit Apfelsaft keinen positiven Einfluss auf die Genotoxizität der FW adipöser Probanden hatte (**zusätzliche Ergebnisse, Abb. 14**). Demnach reicht die Menge an aufgenommenen Polyphenolen

über die tägliche Zufuhr von 750 ml trübem Apfelsaft bei ansonsten unveränderter Kost nicht aus, um eine mögliche Anhäufung von ROS zu minimieren oder die Bildung kanzerogener Verbindungen zu verhindern. *In vivo*-Untersuchungen mit adipösen Ratten verweisen ebenfalls auf das Fehlen chemopräventiver Effekte nach Intervention mit trübem Apfelsaft ^[286]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-behandelte Ratten) konnten DNA-Schäden, ACF-Anzahl und -größe sowie die Proliferationsrate der Kolonepithelzellen durch die Aufnahme von Apfelsaft nicht moduliert werden. Unter Berücksichtigung dieser Studie und der mangelnden Aussagekraft der Ergebnisse aus der Humanstudie mit gesunden Probanden, bedingt durch bereits diskutierte Faktoren, wurden keine weiterführenden Untersuchungen zum chemopräventiven Potential einer Apfelsaftintervention bei Adipösen durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Biomarker FW aufgrund seiner Effektivitätslimitierenden Eigenschaften in Zellkulturversuchen zur Ermittlung chemopräventiver Wirkungen einer regelmäßigen Apfelsaftaufnahme nicht uneingeschränkt geeignet scheint. Lediglich Unterschiede im genotoxischen Potential der FW gesunder und adipöser Probanden konnten detektiert werden. Dies könnte auf die variable Zusammensetzung (karzinogene/oxidativ wirksame bzw. protektive Verbindungen) der FW zurückzuführen sein, welche jeweils von individuellen Ernährungsgewohnheiten abhängig ist. In zukünftigen Arbeiten könnte eine genauere Analyse der FW-Inhaltsstoffe bzw. die Erstellung und Auswertung von Ernährungsprotokollen zu einer Optimierung der Ergebnisinterpretation beitragen.

5.8 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Aufklärung möglicher chemopräventiver Effekte von Apfelpolyphenolen und ausgewählten Darmfermentationsprodukten in humanen Kolonzellen. Besondere Berücksichtigung fand dabei die Modulation des Phase II-Enzyms GSTT2. Aus den durchgeführten Untersuchungen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Apfelpolyphenolextrakte (AE) steigern die Expression von Phase II-Genen der Familien UGT und GST und induzieren deren Gesamtenzymaktivitäten im gewählten Zellmodell LT97, woraus sich erhöhte Entgiftungskapazitäten der Zellen ableiten lassen.
- Da Funktionseinschränkungen von GSTT2 mit einem erhöhten Dickdarmkrebsrisiko assoziiert sind, ist die durch AE induzierte Expressionssteigerung als ein wichtiger, chemopräventiver Effekt anzusehen.
- Zwischen der Enzymaktivität von GSTT2 und der Genotoxizität des synthetischen Hydroperoxids CumOOH besteht ein direkter Zusammenhang. Dies belegen Versuche mit *GSTT2*-modifizierten HT29 Zellen (*GSTT2*-überexprimierende und *GSTT2*-knockdown Zellen).
- AE reduziert CumOOH-induzierte DNA-Schäden in den LT97 Zellen, was auf einen erhöhten Schutz der Kolonozyten gegenüber potentiellen Kanzerogenen wie beispielsweise den Peroxiden des Lipid- und einigen Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels hindeutet.
- Apfelpolyphenole sind gegenüber exogenen Faktoren (z. B. Temperatur) sehr reaktionsanfällig und instabil. Die resultierenden Abbauprozesse und dadurch bedingten Veränderungen in der Polyphenolzusammensetzung sind mit dem Verlust des chemopräventiven Potentials verbunden.
- Eine entsprechend der Polyphenolkonzentration und -zusammensetzung des AE rekonstituierte, synthetische Polyphenolmischung hat keinen Einfluss auf die *GSTT2*-Genexpression und die CumOOH-Genotoxizität. Somit liegt der Schluss nahe, dass bisher nicht identifizierte bzw. nicht kommerziell erhältliche und daher nicht in der synthetischen Mischung enthaltene, bioaktive Komponenten des AE für die Effekte verantwortlich sind.
- Die mikrobiellen Abbauprodukte von Quercetin und Kaffee- bzw. Chlorogensäure (ES und PS) besitzen in LT97 Zellen, bezüglich der Induktion

der Genexpression von *GSTT2* und dem Schutz vor CumOOH, ein den unmetabolisierten Polyphenolen im AE vergleichbares chemopräventives Potential.

- Die Induktion der *GSTT2*-Expression durch die Apfelpolyphenole oder ihre Metabolite kann im Rahmen von Interventionen möglicherweise als Biomarker der Chemoprävention im Kolon genutzt werden.
- Die Polyphenolmetabolite ES und PS senken die Expression von COX-2 auf Gen- und Proteinebene, was zu einer Verringerung von COX-2-abhängigen, inflammatorischen Prozessen führen kann.
- Die procyanidin- und pektinreiche Trubfraktion des Apfelsaftes zeigt nach einem simulierten *in vitro*-Verdau keine chemopräventiven Eigenschaften in LT97 Zellen.
- Ein täglicher Verzehr von trübem Apfelsaft (750 ml, 4 Wochen) hat keinen Einfluss auf das Potential von FW die *GSTT2*-Expression sowie die Apoptose in LT97 Zellen zu modulieren.
- Die FW adipöser Probanden weisen eine höhere Genotoxizität als die normalgewichtiger Probanden auf.
- FW ist als Biomarker zur Abschätzung individueller Lebens- und Ernährungsgewohnheiten sowie zur Risikomodulation von Kolonkrebs *ex vivo* nur bedingt geeignet und sollte weiterführend bewertet werden.

Die *in vitro*-Ergebnisse zum chemopräventiven Potential von Apfelpolyphenolen und den Metaboliten ES und PS geben vielfältige Hinweise darauf, dass die regelmäßige Aufnahme von Äpfeln bzw. Apfelprodukten einen wichtigen Beitrag zur Kolonkrebsprävention leisten können. Dabei könnte die Induktion von zellulären Entgiftungssystemen, besonders der *GSTT2*, die in diversen Tier- und Humanstudien gefundenen, krebsprotektiven Effekte einer Apfelaufnahme zumindest teilweise erklären. Dies beruht auf der Tatsache, dass eine gesteigerte, zelluläre Detoxifizierungskapazität häufig mit einem erhöhten Schutz vor genotoxischen oder oxidativen Angriffen einhergeht. Daneben stellen die Reduzierung der COX-2-Expression und die möglicherweise damit verbundene Verminderung COX-2-abhängiger, proinflammatorischer Prozesse ebenfalls einen Mechanismus der Primärprävention von Kolonkrebs durch Apfelinhaltsstoffe dar.

5.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die chemopräventiven Effekte von Apfelpolyphenolen und ausgewählten Darmfermentationsprodukten auf die Modulierung kolonkrebsassoziiierter Gene und der Aktivität resultierender Proteinprodukte in humanen Kolonozyten aufgezeigt. Für die Untersuchungen wurden LT97 Kolonadenomzellen und teilweise auch stark transformierte HT29 Kolonadenokarzinomzellen als Zellmodelle herangezogen. Im Vordergrund weiterer Experimente sollten daher vergleichende Untersuchungen mit gesunden, humanen Kolonepithelzellen aus Biopsieproben (*ex vivo*) stehen, da diese unter Berücksichtigung aller interindividuellen Variationen die tatsächliche *in vivo*-Situation eines gesunden Menschen und damit Ansatzpunkte primär chemoprotektiver Strategien besser reflektieren.

Des Weiteren erscheint es notwendig die Mechanistik der zugrundeliegenden Signaltransduktionswege, die zur Modifikation des Biotransformationsmetabolismus durch die getesteten Komponenten führt, abzuklären. In der Literatur sind bereits eine Reihe möglicher Mechanismen beschrieben, die es für das Beispiel Apfelinhaltsstoffe (Polyphenole und mikrobielle Abbauprodukte) zu übertragen gilt bzw. neue Wege zu identifizieren sind.

Nach wie vor interessiert die Frage, ob der Verzehr von Äpfeln oder Apfelprodukten aufgrund der Aufnahme erheblicher Mengen an Polyphenolen im Menschen ähnliche Wirkungen, wie *in vitro* oder auch in Rattenstudien gezeigt, hervorrufen kann. Zur Klärung sollten der Umfang und die Durchführung möglicher nachfolgender Humanstudien detailliert geplant werden. Denkbare Ansätze wären dabei die Gewinnung von Kolon-Biopsieproben während des Studienverlaufs oder als weniger invasive Methodik auch die Untersuchung von Surrogatgeweben wie beispielsweise den peripheren mononukleären Blutzellen. Um damit spezifische und genaue Aussagen treffen zu können, sollte zuvor die Eignung als Surrogat für das eigentliche Zielgewebe Kolon bewiesen sein.

Zur Abschätzung der Relevanz einer Apfel-induzierten GSTT2-Aktivität im Rahmen der Chemoprävention von Kolonkrebs *in vivo* wäre außerdem die Durchführung einer Interventionsstudie mit *GSTT2-knockout* Mäusen denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: In den industrialisierten Ländern mit vorherrschender *western style diet* sind maligne Veränderungen des Kolons eine der häufigsten Krebserkrankungen und -todesursachen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine Umstellung der Ernährungsweise das Risiko zu erkranken erheblich minimieren kann. 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 gering, so dass beträchtliche Konzentrationen das Kolon erreichen und dort einer mikrobiellen Metabolisierung unterliegen. Da die chemopräventive Bedeutung von Apfelpolyphenolen und phenolischen Abbauprodukten bisher nur unzureichend untersucht wurde, war dies Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zielstellung: Den Schwerpunkt bildete die Modulation von zellulären Entgiftungssystemen durch Apfelpolyphenole und ausgewählte Darmfermentationsprodukte in humanen Kolonzellen. Besondere Berücksichtigung fand dabei das Phase II-Enzym GSTT2. Daneben sollte der Einfluss genannter Testsubstanzen auf weitere Mechanismen der Chemoprävention wie die Induktion apoptotischer und die Reduktion entzündlicher Prozesse untersucht werden.

Methoden: Humane Kolonadenomzellen (LT97) wurden mit einem Apfelpolyphenolextrakt (AE) inkubiert und der Einfluss insbesondere auf die Expression von Biotransformationsgenen unter Verwendung zweier Array-Plattformen (SuperArray[®] und PIQOR[™]-Microarray) ermittelt. *Real-time* qRT-PCR-Analysen und Enzymaktivitätsmessungen wurden zur Verifizierung ausgewählter Ergebnisse (Glutathion S-Transferasen, GSTs; UDP-Glucuronosyltransferasen, UGTs) genutzt. Einen besonderen Schwerpunkt bildeten die Untersuchungen zur GSTT2. Die Beurteilung funktioneller Konsequenzen einer veränderten Genexpression von *GSTT2* durch AE, durch eine synthetische Polyphenolmischung (SPM, analog der Zusammensetzung des AE) oder durch die Polyphenolmetabolite 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (ES) und 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure (PS) erfolgte dabei über die Bestimmung des Potentials zur Reduktion induzierter DNA-Schäden. Zum Nachweis des kausalen Zusammenhangs zwischen der Enzymaktivität von GSTT2 und der Genotoxizität eines ausgewählten Substrates wurden genetisch modifizierte (*GSTT2*-überexprimierende bzw. *GSTT2*-knockdown) Kolonadeno-

karzinomzellen (HT29) verwendet. Die Wirkung von ES und PS auf die Modulation der proinflammatorischen Cyclooxygenase-2 (COX-2) wurde mittels *real-time qRT-PCR* und Western Blot analysiert. Unter Verwendung des Fermentationsüberstandes der Apfelsafttrubfraktion (FÜ Trub) nach *in vitro*-Verdau und den Fäzeswasser (FW)-Proben von humanen Probanden zweier Apfelsaftinterventionsstudien wurden Untersuchungen zum Einfluss auf die Expression ausgewählter Gene sowie Enzymaktivitäten, das genotoxische Potential und die Apoptoserate in LT97 Zellen durchgeführt.

Ergebnisse: AE steigerte signifikant die Expression von *GSTP1*, *GSTT2*, *GSTA4*, *UGT1A1* und *UGT2B7* sowie die Gesamtaktivität von GSTs und UGTs in LT97 Zellen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivität von GSTT2 und der Detoxifizierung des genotoxischen Cumenhydroperoxid (CumOOH) konnte belegt werden. Der AE reduzierte CumOOH-induzierte DNA-Schäden, was auf eine gesteigerte GSTT2-Aktivität zurückgeführt werden kann. Mit Lagerungsbedingungen einhergehende Abbauprozesse der Polyphenole im AE führten zum Verlust der chemopräventiven Eigenschaften. Für eine SPM konnten bezüglich der untersuchten Parameter keine Effekte nachgewiesen werden, was auf das Fehlen der effektiven Komponenten hindeutet. Im Hinblick auf die Regulation der GSTT2 in LT97 Zellen zeigten ES und PS vergleichbare Ergebnisse wie AE. Zudem reduzierten diese Metabolite die Expression von COX-2 auf mRNA- und Proteinebene. Sowohl die Untersuchungen mit dem Fermentationsüberstand Trub als auch mit den FW-Proben der Apfelsaftinterventionsstudien ergaben keine signifikanten Veränderungen der analysierten Einflussgrößen wie die Expression von Phase II-Enzymen (v. a. der GSTT2) und die Apoptoserate. Der einzige signifikante Unterschied der humanen Interventionsstudien war die gesteigerte Genotoxizität der FW adipöser Probanden gegenüber dem normalgewichtiger Gesunder.

Schlussfolgerungen: Die nachgewiesene Steigerung von Detoxifizierungsenzymen, insbesondere der GSTT2, durch AE oder durch die mikrobiellen Abbauprodukte könnte die Kolonzellen vor genotoxischem oder oxidativem Stress schützen und auf diese Weise Zellentartungen vorbeugen. Daneben stellen die Reduzierung der COX-2-Expression und die möglicherweise damit verbundene Verminderung COX-2-abhängiger, proinflammatorischer Prozesse ebenfalls einen Mechanismus der Primärprävention von Kolonkrebs durch Apfelinhaltsstoffe dar.

7 ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer is one of the most common forms of malignancy and cause of cancer deaths in the industrialized countries with a *western style diet*. However, the risk to suffer from this disease can be most likely reduced by a balanced diet. The consumption of fruits and vegetables is associated with a higher intake of bioactive compounds as polyphenols, known for their chemoprotective potential. Apples contain significant amounts of polyphenols and can therefore potentially reduce cancer risk. Most of the ingested polyphenols remain unresorbed and thus reach the colon. There, polyphenols are subject of intestinal metabolization by the human gut microbiota. The exact role of apple polyphenols and their metabolites in chemoprevention of colorectal cancer remains elusive.

Aim: The objective of the present study was to analyze the impact of apple polyphenols and selected intestinal fermentation products on the modulation of cellular detoxification systems, with particular emphasis on GSTT2. Besides, their influence on additional mechanisms of chemoprevention, such as induction of apoptosis and reduction of inflammatory processes was investigated.

Methods: Human colon adenoma cells (LT97) were incubated with subtoxic concentrations of an apple polyphenol extract (AE) and the impact on the expression of genes, particularly involved in biotransformation, was determined using two different array platforms (SuperArray[®] and PIQOR[™]-microarray). *Real-time qRT PCR* and enzyme activity analyses were performed to verify selected results affecting glutathione S-transferases (GST) and UDP-glucuronosyltransferases (UGT). A core subject was the analysis of *GSTT2*. Functional consequences of an impaired *GSTT2* expression by AE, by a synthetic polyphenol mixture (SPM, mimicking the composition of the AE), or by 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (ES) and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid (PS) were determined by examining their potential to reduce carcinogen-induced DNA damage. Genetically modified (*GSTT2*-overexpressing and *GSTT2*-knockdown) colon carcinoma cells (HT29) were used to find a causal link between enzyme activity of GSTT2 and the genotoxicity of a selected substrate. The modulation of proinflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) by ES and PS was measured using *real-time qRT-PCR* and Western blot. Furthermore, the impact of fermentation

supernatants of the cloudy fraction (fs cloud) and the fecal water samples of a human apple juice intervention study on expression of selected genes, their enzyme activities, the genotoxic potential as well as the proapoptotic potential was characterized in LT97 cells.

Results: AE increased the expression of *GSTP1*, *GSTT2*, *GSTA4*, *UGT1A1* and *UGT2B7* as well as the total enzyme activities of GSTs and UGTs, significantly. An enhanced *GSTT2* activity resulted in the protection from genotoxic effects by cumene hydroperoxide (CumOOH). AE reduced CumOOH-induced DNA damage, thus pointing to an upregulation of *GSTT2* activity. However, the effects of AE strongly depended on its specific composition, which was found to be modified by storage. The SPM did not show any comparable effects, which could be related to missing active compounds. The polyphenol metabolites ES and PS showed similar effects on the regulation of *GSTT2*, as the AE. Moreover, ES and PS reduced COX-2 expression on gene and protein level. A treatment of cells with fs cloud or fecal water samples after apple juice intervention did not result in a modulation of parameters linked to apoptosis and phase II gene expression. Only the genotoxic capacity of the fecal water from obese volunteers compared to healthy subjects were significantly elevated within human intervention studies.

Conclusions: The present study reveals an induction of detoxification enzymes (particularly *GSTT2*) by AE or the polyphenolic metabolites, which implicates a probable protection against genotoxic and oxidative stress and therefore a prevention of cell degeneration. A reduction of COX-2 and hence a decrease in COX-2 dependent inflammatory mechanisms may also be important in the primary prevention of colorectal cancer by apple ingredients.

ANHANG

Zusammensetzung der Studiengetränke

Der im Rahmen der Interventionsstudien verwendete trübe Apfelsaft wurde, mit Ausnahme des Tafelapfels *Topaz* (24 %), vorwiegend aus Mostapfelsorten (10 % *Bittenfelder*, 23 % *Bohnapfel*, 25 % *Seestermüher*, 18 % *Börtlinger Weinapfel*) hergestellt. Das Kontrollgetränk enthielt vergleichbare Konzentrationen an Zuckern, Mineralstoffen, Ascorbinsäure und an organischen Säuren, so dass Interventionseffekte auf die bioaktiven Komponenten im Apfelsaft (Polyphenole, Ballaststoffe) zurückzuführen sind.

Tab. 3: Zusammensetzung der Getränke aus den humanen Interventionsstudien (naturtrüber Apfelsaft und isokalorisches Kontrollgetränk)

(Projektpartner: Forschungsanstalt Geisenheim, Institut für Oenologie und Getränkeforschung)

Parameter	Einheit	Apfelsaft trüb	Kontrollgetränk
Glucose	g/l	21,2	21,0
Fructose	g/l	67	62,9
Saccharose	g/l	36,2	32,45
L-Äpfelsäure	g/l	9,8	5,9
Zitronensäure	g/l	0,1	2,6
Ascorbinsäure	mg/l	311	251,5
Kalium	mg/l	1217	1015
Calcium	mg/l	68	56,5
Magnesium	mg/l	57	61
Natrium	mg/l	7	n.n.
Kupfer	mg/l	n.n.	n.n.
Eisen	mg/l	0,5	n.n.
Zink	mg/l	0,3	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 4: Spezifische Polyphenolzusammensetzung des naturtrüben Apfelsaftes aus den humanen Interventionsstudien ^[286]

(Projektpartner: Forschungsanstalt Geisenheim, Institut für Oenologie und Getränkeforschung)

Phenol	Apfelsaft trüb [mg/l]
Procyanidin B1	8,5
Procyanidin B2	14,4
Procyanidin C1	3,9
(+)-Catechin	11,2
(-)-Epicatechin	15,5
Phloretin-2'-xyloglycosid	62,6
Phloretinglycosid unbekannt	7,3
Phloridzin	25,1
Chlorogensäure	149,9
Kryptochlorogensäure	12,0
Kaffeesäure	5,3
Cumaroylsäure	1,5
3-Cumaroyl-Chinasäure	2,6
4-Cumaroyl-Chinasäure	52,9
Cumarsäure	1,0
Quercetin-3-O-galactosid	1,2
Quercetin-3-O-glukosid	0,6
Quercetin-3-O-xylosid	0,6
Quercetin-3-O-arabinosid	0,8
Quercetin-3-O-rhamnosid	1,7
Summe	378,6

Das Polyphenolprofil wurde mittels RP18/HPLC/DAD bestimmt. Mit dieser Methode können höherpolymere Procyanidine nicht erfasst werden. Der Gehalt dieser Flavanole im Saft wurde nach Isolierung des Polyphenolextraktes von Huemmer *et. al.* ermittelt und beträgt 517 mg/g Extrakt ^[234].

Das isokalorische Kontrollgetränk enthielt dagegen keine Polyphenole und auch keine Trubpartikel, was die Zuordnung möglicher Effekte der Apfelsaftintervention zu den entsprechenden Inhaltsstoffen gewährleistet.

Einschränkung der Aufnahme von polyphenolreichen Lebensmitteln**Tab. 5:** Ernährungleitfaden für die Apfelsaftinterventionsstudien

Lebensmittel	erlaubte Menge pro Tag
nicht-alkoholische Getränke	
Kaffee	1 Tasse (0,3 l)
Kakao	1 Tasse (0,3 l)
Tee (schwarz/grün)	1 Tasse (0,3 l)
Obstsaft	nicht erlaubt
Gemüsesaft	nicht erlaubt
Apfelsaft	nicht erlaubt
alkoholische Getränke	
Rot-/Weißwein	1 Glas (0,2 l)
Bier	1 Glas (0,2 l)
Cidre (Apfelwein)	nicht erlaubt
Gemüse/Obst	
Gemüse	1 Portion = 1 Beilage
Obst	1 Portion = 1 Hand voll
Äpfel/Apfelprodukte	nicht erlaubt

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ponz de L.M. und Di G.C.; Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2001, **33** (4), 372 - 388.
2. Clevers H.; Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, **127** (3), 469 - 480.
3. Humphries A. und Wright N.A.; Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008, **8** (6), 415 - 424.
4. de Kok T.M. und van Maanen J.M.; Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat Res* 2000, **463** (1), 53 - 101.
5. Scheline R.R.; Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol Rev* 1973, **25** (4), 451 - 523.
6. Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Destatis); Todesursachenstatistik Deutschland. Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Destatis). 2008.
7. Dixon K. und Koprass E.; Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004, **14** (6), 441 - 448.
8. Balmain A.; Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 2001, **1** (1), 77 - 82.
9. Boveri T.; Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Gustav Fisher, Jena* 1914, 64 pages.
10. Knudson A.G.; Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002, **111** (1), 96 - 102.
11. Anand P., Kunnumakkara A.B., Sundaram C., Harikumar K.B., Tharakan S.T., Lai O.S., Sung B., und Aggarwal B.B.; Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008, **25** (9), 2097 - 2116.
12. Manson M.M.; Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med* 2003, **9** (1), 11 - 18.
13. Ponz de L.M. und Roncucci L.; The cause of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2000, **32** (5), 426 - 439.
14. WCRF/AICR; Food, Nutrition, Physical Activity, and Prevention of Cancer: a Global Perspective. 2007.
15. RKI G.d.e.K.i.D.e.V.; Krebs in Deutschland 2005-2006. Häufigkeiten und Trends. 2010, **7.Auflage**.
16. McGrath D.R. und Spigelman A.D.; Hereditary colorectal cancer: keeping it in the family--the bowel cancer story. *Intern Med J* 2002, **32** (7), 325 - 330.
17. Baba S.; Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer. *World J Surg* 1997, **21** (7), 678 - 687.

18. Goss K.H. und Groden J.; Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000, **18** (9), 1967 - 1979.
19. Nathke I.; APC at a glance. *J Cell Sci* 2004, **117** (Pt 21), 4873 - 4875.
20. Bisgaard M.L., Fenger K., Bulow S., Niebuhr E., und Mohr J.; Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994, **3** (2), 121 - 125.
21. Lynch H.T. und Smyrk T.; Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer* 1996, **78** (6), 1149 - 1167.
22. Ekblom A., Helmick C., Zack M., und Adami H.O.; Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990, **336** (8711), 357 - 359.
23. Eaden J.A., Abrams K.R., und Mayberry J.F.; The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001, **48** (4), 526 - 535.
24. Jess T., Gamborg M., Matzen P., Munkholm P., und Sorensen T.I.; Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2005, **100** (12), 2724 - 2729.
25. Jess T., Winther K.V., Munkholm P., Langholz E., und Binder V.; Intestinal and extra-intestinal cancer in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Aliment Pharmacol Ther* 2004, **19** (3), 287 - 293.
26. Seril D.N., Liao J., Yang G.Y., und Yang C.S.; Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 2003, **24** (3), 353 - 362.
27. Itzkowitz S.H. und Yio X.; Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **287** (1), G7 - 17.
28. Fearon E.R.; Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 1995, **768** 101 - 110.
29. Miyaki M., Iijima T., Konishi M., Sakai K., Ishii A., Yasuno M., Hishima T., Koike M., Shitara N., Iwama T., Utsunomiya J., Kuroki T., und Mori T.; Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999, **18** (20), 3098 - 3103.
30. Umetani N., Sasaki S., Watanabe T., Shinozaki M., Matsuda K., Ishigami H., Ueda E., und Muto T.; Genetic alterations in ulcerative colitis-associated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability. *Jpn J Cancer Res* 1999, **90** (10), 1081 - 1087.
31. Redston M.S., Papadopoulos N., Caldas C., Kinzler K.W., und Kern S.E.; Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 1995, **108** (2), 383 - 392.

32. Brentnall T.A., Crispin D.A., Rabinovitch P.S., Haggitt R.C., Rubin C.E., Stevens A.C., und Burmer G.C.; Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994, **107** (2), 369 - 378.
33. Burmer G.C., Rabinovitch P.S., Haggitt R.C., Crispin D.A., Brentnall T.A., Kolli V.R., Stevens A.C., und Rubin C.E.; Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 1992, **103** (5), 1602 - 1610.
34. Farber E.; The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 1984, **44** (10), 4217 - 4223.
35. Arends J.W.; Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 2000, **190** (4), 412 - 416.
36. Fearon E.R. und Vogelstein B.; A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, **61** (5), 759 - 767.
37. Fodde R.; The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002, **38** (7), 867 - 871.
38. Trosko J.E.; Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? *Mol Carcinog* 2001, **30** (3), 131 - 137.
39. Oliveira P.A., Colaco A., Chaves R., Guedes-Pinto H., De-La-Cruz P.L., und Lopes C.; Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* 2007, **79** (4), 593 - 616.
40. Hanahan D. und Weinberg R.A.; The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, **100** (1), 57 - 70.
41. Fearnhead N.S., Britton M.P., und Bodmer W.F.; The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001, **10** (7), 721 - 733.
42. Kinzler K.W., Nilbert M.C., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hamilton S.R., Hedge P., Markham A., und .; Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991, **251** (4999), 1366 - 1370.
43. Jass J.R., Whitehall V.L., Young J., und Leggett B.A.; Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002, **123** (3), 862 - 876.
44. Kinzler K.W. und Vogelstein B.; Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996, **87** (2), 159 - 170.
45. Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., und Bos J.L.; Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988, **319** (9), 525 - 532.
46. Seger R. und Krebs E.G.; The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995, **9** (9), 726 - 735.
47. Young A., Lyons J., Miller A.L., Phan V.T., Alarcon I.R., und McCormick F.; Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res* 2009, **102** 1 - 17.
48. Cho K.R. und Vogelstein B.; Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* 1992, **70** (6 Suppl), 1727 - 1731.

49. Walther A., Johnstone E., Swanton C., Midgley R., Tomlinson I., und Kerr D.; Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009, **9** (7), 489 - 499.
50. Mehlen P. und Fearon E.R.; Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2004, **22** (16), 3420 - 3428.
51. Itoh F., Hinoda Y., Ohe M., Ohe Y., Ban T., Endo T., Imai K., und Yachi A.; Decreased expression of DCC mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1993, **53** (2), 260 - 263.
52. Goi T., Yamaguchi A., Nakagawara G., Urano T., Shiku H., und Furukawa K.; Reduced expression of deleted colorectal carcinoma (DCC) protein in established colon cancers. *Br J Cancer* 1998, **77** (3), 466 - 471.
53. Gotley D.C., Reeder J.A., Fawcett J., Walsh M.D., Bates P., Simmons D.L., und Antalis T.M.; The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 1996, **13** (4), 787 - 795.
54. Santarosa M. und Ashworth A.; Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 2004, **1654** (2), 105 - 122.
55. Goumans M.J., Liu Z., und ten D.P.; TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009, **19** (1), 116 - 127.
56. Clarke D.C. und Liu X.; Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends Cell Biol* 2008, **18** (9), 430 - 442.
57. Prives C. und Hall P.A.; The p53 pathway. *J Pathol* 1999, **187** (1), 112 - 126.
58. Balint E.E. und Vousden K.H.; Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 2001, **85** (12), 1813 - 1823.
59. Vogelstein B., Lane D., und Levine A.J.; Surfing the p53 network. *Nature* 2000, **408** (6810), 307 - 310.
60. Vousden K.H. und Lane D.P.; p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8** (4), 275 - 283.
61. Xie J. und Itzkowitz S.H.; Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008, **14** (3), 378 - 389.
62. Dionigi G., Bianchi V., Villa F., Rovera F., Boni L., Annoni M., Castano P., und Dionigi R.; Differences between familial and sporadic forms of colorectal cancer with DNA microsatellite instability. *Surg Oncol* 2007, **16 Suppl 1** S37 - S42.
63. Markowitz S.; TGF-beta receptors and DNA repair genes, coupled targets in a pathway of human colon carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1470** (1), M13 - M20.
64. Kuismanen S.A., Holmberg M.T., Salovaara R., de la C.A., und Peltomaki P.; Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of

- microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 2000, **156** (5), 1773 - 1779.
65. Miyakura Y., Sugano K., Akasu T., Yoshida T., Maekawa M., Saitoh S., Sasaki H., Nomizu T., Konishi F., Fujita S., Moriya Y., und Nagai H.; Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004, **2** (2), 147 - 156.
 66. Tischoff I. und Tannapfel A.; [Epigenetic alterations in colorectal carcinomas and precancerous lesions]. *Z Gastroenterol* 2008, **46** (10), 1202 - 1206.
 67. Dove-Edwin I. und Thomas H.J.; Review article: the prevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2001, **15** (3), 323 - 336.
 68. Strassburg C.P., Manns M.P., und Tukey R.H.; Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 1998, **273** (15), 8719 - 8726.
 69. Hong W.K. und Sporn M.B.; Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 1997, **278** (5340), 1073 - 1077.
 70. Gerhäuser C.; Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe. *Aktuel Ernaehr Med* 2001, **26** 137 - 143.
 71. Wattenberg L.W.; Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 1985, **45** (1), 1 - 8.
 72. Wattenberg L.W.; Chemoprevention of cancer. *Prev Med* 1996, **25** (1), 44 - 45.
 73. De F.S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R.M., Noonan D., und Albin A.; Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res* 2001, **480-481** 9 - 22.
 74. De F.S. und Ferguson L.R.; Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* 2005, **591** (1-2), 8 - 15.
 75. Hursting S.D., Slaga T.J., Fischer S.M., DiGiovanni J., und Phang J.M.; Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. *J Natl Cancer Inst* 1999, **91** (3), 215 - 225.
 76. Sheweita S.A.; Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab* 2000, **1** (2), 107 - 132.
 77. Liska D.J.; The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev* 1998, **3** (3), 187 - 198.
 78. Liska D., Lyon M., und Jones D.S.; Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore (NY)* 2006, **2** (2), 122 - 140.
 79. Dalhoff K., Buus J.K., und Enghusen P.H.; Cancer and molecular biomarkers of phase 2. *Methods Enzymol* 2005, **400** 618 - 627.
 80. Leonard G.D., Fojo T., und Bates S.E.; The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 2003, **8** (5), 411 - 424.

81. Chin K.V., Pastan I., und Gottesman M.M.; Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv Cancer Res* 1993, **60** 157 - 180.
82. Smith W.L., DeWitt D.L., und Garavito R.M.; Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000, **69** 145 - 182.
83. Simmons D.L., Botting R.M., und Hla T.; Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004, **56** (3), 387 - 437.
84. Brown J.R. und DuBois R.N.; COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol* 2005, **23** (12), 2840 - 2855.
85. Funk C.D.; Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001, **294** (5548), 1871 - 1875.
86. Cha Y.I., Solnica-Krezel L., und DuBois R.N.; Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev Biol* 2006, **289** (2), 263 - 272.
87. Sinicrope F.A.; Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2006, **45** (6), 447 - 454.
88. Yokoyama C., Takai T., und Tanabe T.; Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* 1988, **231** (2), 347 - 351.
89. Kargman S., Charleson S., Cartwright M., Frank J., Riendeau D., Mancini J., Evans J., und O'Neill G.; Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996, **111** (2), 445 - 454.
90. Kirschenbaum A., Liotta D.R., Yao S., Liu X.H., Klausner A.P., Unger P., Shapiro E., Leav I., und Levine A.C.; Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85** (9), 3436 - 3441.
91. Sinicrope F.A. und Gill S.; Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004, **23** (1-2), 63 - 75.
92. Balkwill F., Charles K.A., und Mantovani A.; Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005, **7** (3), 211 - 217.
93. Greenhough A., Smartt H.J., Moore A.E., Roberts H.R., Williams A.C., Paraskeva C., und Kaidi A.; The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009, **30** (3), 377 - 386.
94. Harris R.E., Beebe-Donk J., und Alshafie G.A.; Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell Biochem* 2007, **42** 193 - 212.
95. Dutton G.J.; Developmental aspects of drug conjugation, with special reference to glucuronidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1978, **18** 17 - 35.

96. Mackenzie P.I., Bock K.W., Burchell B., Guillemette C., Ikushiro S., Iyanagi T., Miners J.O., Owens I.S., und Nebert D.W.; Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 2005, **15** (10), 677 - 685.
97. King C.D., Rios G.R., Green M.D., und Tephly T.R.; UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000, **1** (2), 143 - 161.
98. van der Logt E.M., Bergevoet S.M., Roelofs H.M., Van H.Z., te Morsche R.H., Wobbes T., de Kok J.B., Nagengast F.M., und Peters W.H.; Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2004, **25** (12), 2407 - 2415.
99. Fisher M.B., Paine M.F., Strelevitz T.J., und Wrighton S.A.; The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev* 2001, **33** (3-4), 273 - 297.
100. Bossuyt X. und Blanckaert N.; Mechanism of stimulation of microsomal UDP-glucuronosyltransferase by UDP-N-acetylglucosamine. *Biochem J* 1995, **305** (Pt 1) 321 - 328.
101. Gong Q.H., Cho J.W., Huang T., Potter C., Gholami N., Basu N.K., Kubota S., Carvalho S., Pennington M.W., Owens I.S., und Popescu N.C.; Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 2001, **11** (4), 357 - 368.
102. Tukey R.H. und Strassburg C.P.; Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000, **40** 581 - 616.
103. Owens I.S., Basu N.K., und Banerjee R.; UDP-glucuronosyltransferases: gene structures of UGT1 and UGT2 families. *Methods Enzymol* 2005, **400** 1 - 22.
104. Monaghan G., Clarke D.J., Povey S., See C.G., Boxer M., und Burchell B.; Isolation of a human YAC contig encompassing a cluster of UGT2 genes and its regional localization to chromosome 4q13. *Genomics* 1994, **23** (2), 496 - 499.
105. Giuliani L., Ciotti M., Stoppacciaro A., Pasquini A., Silvestri I., De M.A., Frati L., und Agliano A.M.; UDP-glucuronosyltransferases 1A expression in human urinary bladder and colon cancer by immunohistochemistry. *Oncol Rep* 2005, **13** (2), 185 - 191.
106. Strassburg C.P., Vogel A., Kneip S., Tukey R.H., und Manns M.P.; Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* 2002, **50** (6), 851 - 856.
107. Eaton D.L. und Bammler T.K.; Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 1999, **49** (2), 156 - 164.
108. Pombrio J.M., Giangreco A., Li L., Wempe M.F., Anders M.W., Sweet D.H., Pritchard J.B., und Ballatori N.; Mercapturic acids (N-acetylcysteine S-conjugates) as endogenous substrates for the renal organic anion transporter-1. *Mol Pharmacol* 2001, **60** (5), 1091 - 1099.
109. Hayes J.D., Flanagan J.U., und Jowsey I.R.; Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, **45** 51 - 88.

110. Pool-Zobel B.L., Veeriah S., und Böhmer F.D.; Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005, **591** (1-2), 74 - 92.
111. van Bladeren P.J.; Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 2000, **129** (1-2), 61 - 76.
112. Tan K.L., Webb G.C., Baker R.T., und Board P.G.; Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics* 1995, **25** (2), 381 - 387.
113. Webb G., Vaska V., Coggan M., und Board P.; Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 1996, **33** (1), 121 - 123.
114. Hurst R., Bao Y., Jemth P., Mannervik B., und Williamson G.; Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem J* 1998, **332** (Pt 1) 97 - 100.
115. Meyer D.J., Coles B., Pemble S.E., Gilmore K.S., Fraser G.M., und Ketterer B.; Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 1991, **274** (Pt 2) 409 - 414.
116. Whittington A., Vichai V., Webb G., Baker R., Pearson W., und Board P.; Gene structure, expression and chromosomal localization of murine theta class glutathione transferase mGSTT1-1. *Biochem J* 1999, **337** (Pt 1) 141 - 151.
117. Hiratsuka A., Okada T., Nishiyama T., Fujikawa M., Ogura K., Okuda H., Watabe T., und Watabe T.; Novel theta class glutathione S-transferases Yrs-Yrs' and Yrs'-Yrs' in rat liver cytosol: their potent activity toward 5-sulfoxymethylchrysene, a reactive metabolite of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **202** (1), 278 - 284.
118. Hiratsuka A., Nishijima T., Okuda H., Ogura K., und Watabe T.; Rat liver theta-class glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: their chromatographic, electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal Biochem* 1997, **252** (2), 229 - 237.
119. Tan K.L. und Board P.G.; Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem J* 1996, **315** (Pt 3) 727 - 732.
120. Wang S., Chanock S., Tang D., Li Z., Jedrychowski W., und Perera F.P.; Assessment of interactions between PAH exposure and genetic polymorphisms on PAH-DNA adducts in African American, Dominican, and Caucasian mothers and newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, **17** (2), 405 - 413.
121. Landi S.; Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000, **463** (3), 247 - 283.
122. Tan K.L., Chelvanayagam G., Parker M.W., und Board P.G.; Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with

- different substrates involves different residues. *Biochem J* 1996, **319** (Pt 1) 315 - 321.
123. van Lieshout E.M., Tiemessen D.M., Roelofs H.M., und Peters W.H.; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs enhance glutathione S-transferase theta levels in rat colon. *Biochim Biophys Acta* 1998, **1381** (3), 305 - 311.
124. Martinez C., Martin F., Fernandez J.M., Garcia-Martin E., Sastre J., az-Rubio M., Agundez J.A., und Ladero J.M.; Glutathione S-transferases mu 1, theta 1, pi 1, alpha 1 and mu 3 genetic polymorphisms and the risk of colorectal and gastric cancers in humans. *Pharmacogenomics* 2006, **7** (5), 711 - 718.
125. Jang S.G., Kim I.J., Kang H.C., Park H.W., Ahn S.A., Yoon H.J., Kim K., Shin H.R., Lee J.S., und Park J.G.; GSTT2 promoter polymorphisms and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007, **7**, 16.
126. Kerr J.F.; A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965, **90** (2), 419 - 435.
127. Degtarev A., Boyce M., und Yuan J.; A decade of caspases. *Oncogene* 2003, **22** (53), 8543 - 8567.
128. Hengartner M.O.; The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000, **407** (6805), 770 - 776.
129. Chowdhury I., Tharakan B., und Bhat G.K.; Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008, **151** (1), 10 - 27.
130. Walczak H. und Krammer P.H.; The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000, **256** (1), 58 - 66.
131. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., und Peter M.E.; Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995, **14** (22), 5579 - 5588.
132. Cotter T.G.; Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 2009, **9** (7), 501 - 507.
133. Green D.R. und Kroemer G.; The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004, **305** (5684), 626 - 629.
134. Bratton S.B., Walker G., Srinivasula S.M., Sun X.M., Butterworth M., Alnemri E.S., und Cohen G.M.; Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 2001, **20** (5), 998 - 1009.
135. Hector S. und Prehn J.H.; Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1795** (2), 117 - 129.
136. Cheynier V.; Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005, **81** (1 Suppl), 223S - 229S.
137. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., und Jimenez L.; Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004, **79** (5), 727 - 747.

138. Ramos S.; Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 2008, **52** (5), 507 - 526.
139. Ramos S.; Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007, **18** (7), 427 - 442.
140. D'Archivio M., Filesi C., Di B.R., Gargiulo R., Giovannini C., und Masella R.; Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 2007, **43** (4), 348 - 361.
141. Fresco P., Borges F., Diniz C., und Marques M.P.; New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 2006, **26** (6), 747 - 766.
142. Scalbert A. und Williamson G.; Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000, **130** (8S Suppl), 2073S - 2085S.
143. Clifford M.N.; Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med* 2004, **70** (12), 1103 - 1114.
144. Watzl B. und Rechkemmer G.; Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 2001, **48** 498 - 502.
145. Kahle K., Kraus M., Scheppach W., und Richling E.; Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Mol Nutr Food Res* 2005, **49** (12), 1143 - 1150.
146. Kahle K., Huemmer W., Kempf M., Scheppach W., Erk T., und Richling E.; Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J Agric Food Chem* 2007, **55** (26), 10605 - 10614.
147. Olthof M.R., Hollman P.C., und Katan M.B.; Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001, **131** (1), 66 - 71.
148. Hollman P.C., de Vries J.H., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J., und Katan M.B.; Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995, **62** (6), 1276 - 1282.
149. Day A.J., DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J., Morgan M.R., und Williamson G.; Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998, **436** (1), 71 - 75.
150. Shixian Q., VanCrey B., Shi J., Kakuda Y., und Jiang Y.; Green tea extract thermogenesis-induced weight loss by epigallocatechin gallate inhibition of catechol-O-methyltransferase. *J Med Food* 2006, **9** (4), 451 - 458.
151. Falany C.N.; Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* 1997, **11** (4), 206 - 216.
152. Walle T., Eaton E.A., und Walle U.K.; Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenosulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 1995, **50** (5), 731 - 734.

153. Kroon P.A., Clifford M.N., Crozier A., Day A.J., Donovan J.L., Manach C., and Williamson G.; How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 2004, **80** (1), 15 - 21.
154. Koster H., Halsema I., Scholtens E., Knippers M., und Mulder G.J.; Dose-dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic compounds in the rat in vivo and in isolated hepatocytes. The role of saturation of phenolsulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 1981, **30** (18), 2569 - 2575.
155. O'Leary K.A., Day A.J., Needs P.W., Mellon F.A., O'Brien N.M., und Williamson G.; Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol* 2003, **65** (3), 479 - 491.
156. Blaut M., Schoefer L., und Braune A.; Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res* 2003, **73** (2), 79 - 87.
157. Gonthier M.P., Remesy C., Scalbert A., Cheynier V., Souquet J.M., Poutanen K., und Aura A.M.; Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomed Pharmacother* 2006, **60** (9), 536 - 540.
158. Bokkenheuser V.D. und Winter J.; Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. *Prog Clin Biol Res* 1988, **280** 143 - 145.
159. Rechner A.R., Smith M.A., Kuhnle G., Gibson G.R., Debnam E.S., Srai S.K., Moore K.P., und Rice-Evans C.A.; Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med* 2004, **36** (2), 212 - 225.
160. Schneider H., Schwiertz A., Collins M.D., und Blaut M.; Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch Microbiol* 1999, **171** (2), 81 - 91.
161. Braune A., Gutschow M., Engst W., und Blaut M.; Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67** (12), 5558 - 5567.
162. Schoefer L., Mohan R., Schwiertz A., Braune A., und Blaut M.; Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69** (10), 5849 - 5854.
163. Couteau D., McCartney A.L., Gibson G.R., Williamson G., und Faulds C.B.; Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol* 2001, **90** (6), 873 - 881.
164. Olthof M.R., Hollman P.C., Buijsman M.N., van Amelsvoort J.M., und Katan M.B.; Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr* 2003, **133** (6), 1806 - 1814.
165. Jenner A.M., Rafter J., und Halliwell B.; Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 2005, **38** (6), 763 - 772.

166. Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., und Gleis M.; Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 2009, **682** (1), 39 - 53.
167. Rafter J.J., Child P., Anderson A.M., Alder R., Eng V., und Bruce W.R.; Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *Am J Clin Nutr* 1987, **45** (3), 559 - 563.
168. Branca F., Hanley A.B., Pool-Zobel B., und Verhagen H.; Biomarkers in disease and health. *Br J Nutr* 2001, **86 Suppl 1** S55 - S92.
169. Osswald K., Becker T.W., Grimm M., Jahreis G., und Pool-Zobel B.L.; Inter- and intra-individual variation of faecal water - genotoxicity in human colon cells. *Mutat Res* 2000, **472** (1-2), 59 - 70.
170. Syngal S., Clarke G., und Bandipalliam P.; Potential roles of genetic biomarkers in colorectal cancer chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 2000, **34** 28 - 34.
171. Escarpa A. und Gonzalez M.C.; High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A* 1998, **823** (1-2), 331 - 337.
172. Thielen C., Will F., Zacharias J., Dietrich H., und Jacob H.; Polyphenole in Äpfeln: Verteilung von Polyphenolen im Apfelgewebe und Vergleich der Frucht mit Apfelsaft. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 2004, **100** 389 - 398.
173. Vrhovsek U., Rigo A., Tonon D., und Mattivi F.; Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J Agric Food Chem* 2004, **52** (21), 6532 - 6538.
174. Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.; Einfluss von Sorte und Herstellungsverfahren auf Veränderungen in wertgebenden Aromastoffen von Apfelsäften. *Abschlussbericht* 2006.
175. Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V.; Apfelsaft in aller Munde. *Bericht* 2005.
176. Guyot S., Marnet N., Sanoner P., und Drilleau J.F.; Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J Agric Food Chem* 2003, **51** (21), 6240 - 6247.
177. van der Sluis A.A., Dekker M., Skrede G., und Jongen W.M.; Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *J Agric Food Chem* 2002, **50** (25), 7211 - 7219.
178. Kahle K., Kraus M., und Richling E.; Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res* 2005, **49** (8), 797 - 806.
179. Terry P., Giovannucci E., Michels K.B., Bergkvist L., Hansen H., Holmberg L., und Wolk A.; Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001, **93** (7), 525 - 533.
180. Steinmetz K.A. und Potter J.D.; Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996, **96** (10), 1027 - 1039.
181. Lin J., Zhang S.M., Cook N.R., Rexrode K.M., Liu S., Manson J.E., Lee I.M., und Buring J.E.; Dietary intakes of fruit, vegetables, and fiber, and risk of colorectal

- cancer in a prospective cohort of women (United States). *Cancer Causes Control* 2005, **16** (3), 225 - 233.
182. Sato Y., Tsubono Y., Nakaya N., Ogawa K., Kurashima K., Kuriyama S., Hozawa A., Nishino Y., Shibuya D., und Tsuji I.; Fruit and vegetable consumption and risk of colorectal cancer in Japan: The Miyagi Cohort Study. *Public Health Nutr* 2005, **8** (3), 309 - 314.
183. Tsubono Y., Otani T., Kobayashi M., Yamamoto S., Sobue T., und Tsugane S.; No association between fruit or vegetable consumption and the risk of colorectal cancer in Japan. *Br J Cancer* 2005, **92** (9), 1782 - 1784.
184. Wakai K., Hirose K., Matsuo K., Ito H., Kuriki K., Suzuki T., Kato T., Hirai T., Kanemitsu Y., und Tajima K.; Dietary risk factors for colon and rectal cancers: a comparative case-control study. *J Epidemiol* 2006, **16** (3), 125 - 135.
185. Barth S.W., Fahndrich C., Bub A., Dietrich H., Watzl B., Will F., Briviba K., und Rechkemmer G.; Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 2005, **26** (8), 1414 - 1421.
186. Barth S.W., Faehndrich C., Bub A., Watzl B., Will F., Dietrich H., Rechkemmer G., und Briviba K.; Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *J Agric Food Chem* 2007, **55** (4), 1181 - 1187.
187. Gosse F., Guyot S., Roussi S., Lobstein A., Fischer B., Seiler N., und Raul F.; Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005, **26** (7), 1291 - 1295.
188. Deneo-Pellegrini H., De S.E., und Ronco A.; Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay. *Nutr Cancer* 1996, **25** (3), 297 - 304.
189. Gallus S., Talamini R., Giacosa A., Montella M., Ramazzotti V., Franceschi S., Negri E., und La V.C.; Does an apple a day keep the oncologist away? *Ann Oncol* 2005, **16** (11), 1841 - 1844.
190. Michels K.B., Giovannucci E., Chan A.T., Singhania R., Fuchs C.S., und Willett W.C.; Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Res* 2006, **66** (7), 3942 - 3953.
191. Jedrychowski W. und Maugeri U.; An apple a day may hold colorectal cancer at bay: recent evidence from a case-control study. *Rev Environ Health* 2009, **24** (1), 59 - 74.
192. Jedrychowski W., Maugeri U., Popiela T., Kulig J., Sochacka-Tatara E., Pac A., Sowa A., und Musial A.; 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** (1), 42 - 47.
193. Stein K., Borowicki A., Scharlau D., Scheub K., Brenner-Weiß G., Obst U., Hollmann J., Lindauer M., Wachterd N., und Gleis M.; Modification of an in vitro model

- simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention. *British Journal of Nutrition*, eingereicht 2010.
194. Richter M., Jurek D., Wrba F., Kaserer K., Wurzer G., Karner-Hanusch J., und Marian B.; Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer* 2002, **38** (14), 1937 - 1945.
 195. Fogh J. und Trempe G.; New human tumor cell lines. *Human Tumor Cells in vitro*, Plenum Press, New York 1975, 115 - 141.
 196. Talalay P.; Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors* 2000, **12** (1-4), 5 - 11.
 197. Galijatovic A., Walle U.K., und Walle T.; Induction of UDP-glucuronosyltransferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res* 2000, **17** (1), 21 - 26.
 198. Sengupta A., Ghosh S., und Das S.; Tea can protect against aberrant crypt foci formation during azoxymethane induced rat colon carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2003, **22** (2), 185 - 191.
 199. Bosma P.J., Seppen J., Goldhoorn B., Bakker C., Oude Elferink R.P., Chowdhury J.R., Chowdhury N.R., und Jansen P.L.; Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994, **269** (27), 17960 - 17964.
 200. Malfatti M.A. und Felton J.S.; N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 2001, **22** (7), 1087 - 1093.
 201. Malfatti M.A. und Felton J.S.; Human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the primary enzyme responsible for the N-glucuronidation of N-hydroxy-PhIP in vitro. *Chem Res Toxicol* 2004, **17** (8), 1137 - 1144.
 202. Ito N., Hasegawa R., Sano M., Tamano S., Esumi H., Takayama S., und Sugimura T.; A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 1991, **12** (8), 1503 - 1506.
 203. Bichlmaier I., Siiskonen A., Finel M., und Yli-Kauhaluoma J.; Stereochemical sensitivity of the human UDP-glucuronosyltransferases 2B7 and 2B17. *J Med Chem* 2006, **49** (5), 1818 - 1827.
 204. Court MH; Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol* 2005, **400** 104 - 116.
 205. Gelboin H.V.; Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 1980, **60** (4), 1107 - 1166.
 206. Hubatsch I., Ridderstrom M., und Mannervik B.; Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem J* 1998, **330** (Pt 1) 175 - 179.

207. Moskaug J.O., Carlsen H., Myhrstad M., und Blomhoff R.; Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev* 2004, **125** (4), 315 - 324.
208. Surh Y.J., Kundu J.K., Na H.K., und Lee J.S.; Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* 2005, **135** (12 Suppl), 2993S - 3001S.
209. Presterla T., Talalay P., Alam J., Ahn Y.I., Lee P.J., und Choi A.M.; Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Mol Med* 1995, **1** (7), 827 - 837.
210. Rushmore T.H., King R.G., Paulson K.E., und Pickett C.B.; Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87** (10), 3826 - 3830.
211. Kwak M.K., Wakabayashi N., und Kensler T.W.; Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res* 2004, **555** (1-2), 133 - 148.
212. Masella R., Di B.R., Vari R., Filesi C., und Giovannini C.; Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, **16** (10), 577 - 586.
213. Lee J.M. und Johnson J.A.; An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004, **37** (2), 139 - 143.
214. Gerhauser C., Klimo K., Hummer W., Holzer J., Petermann A., Garreta-Rufas A., Bohmer F.D., und Schreier P.; Identification of 3-hydroxy-beta-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* 2009, **53** (10), 1237 - 1244.
215. Yueh M.F., Huang Y.H., Hiller A., Chen S., Nguyen N., und Tukey R.H.; Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem* 2003, **278** (17), 15001 - 15006.
216. Yueh M.F., Bonzo J.A., und Tukey R.H.; The role of Ah receptor in induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *Methods Enzymol* 2005, **400** 75 - 91.
217. Ko H.P., Okino S.T., Ma Q., und Whitlock J.P., Jr.; Dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol Cell Biol* 1996, **16** (1), 430 - 436.
218. Sugatani J., Sueyoshi T., Negishi M., und Miwa M.; Regulation of the human UGT1A1 gene by nuclear receptors constitutive active/androstane receptor, pregnane X receptor, and glucocorticoid receptor. *Methods Enzymol* 2005, **400** 92 - 104.
219. Veeriah S., Kautenburger T., Habermann N., Sauer J., Dietrich H., Will F., und Pool-Zobel B.L.; Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells

- and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* 2006, **45** (3), 164 - 174.
220. Habig W.H., Pabst M.J., und Jakoby W.B.; Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974, **249** (22), 7130 - 7139.
221. Hussey A.J. und Hayes J.D.; Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem J* 1992, **286** (Pt 3) 929 - 935.
222. Gottesman M.M.; Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002, **53** 615 - 627.
223. McCann M.J., Gill C.I., O' B.G., Rao J.R., McRoberts W.C., Hughes P., McEntee R., und Rowland I.R.; Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem Toxicol* 2007, **45** (7), 1224 - 1230.
224. Veeriah S., Balavenkatraman K.K., Bohmer F., Kahle K., Gleit M., Richling E., Scheppach W., und Pool-Zobel B.L.; Intervention with cloudy apple juice results in altered biological activities of ileostomy samples collected from individual volunteers. *Eur J Nutr* 2008, **47** (5), 226 - 234.
225. Schaefer S., Baum M., Eisenbrand G., Dietrich H., Will F., und Janzowski C.; Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 2006, **50** (1), 24 - 33.
226. Chaudiere J., Wilhelmsen E.C., und Tappel A.L.; Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J Biol Chem* 1984, **259** (2), 1043 - 1050.
227. Hussey A.J., Kerr L.A., Cronshaw A.D., Harrison D.J., und Hayes J.D.; Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle. Evidence for the existence of heterodimers. *Biochem J* 1991, **273**(Pt 2) 323 - 332.
228. Spanos G.A., Wrolstad R.E., und Heatherbell D.A.; Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J Agric Food Chem* 1990, **38** 1572 - 1579.
229. Montoro P., Tuberoso C.I., Piacente S., Perrone A., De F., V, Cabras P., und Pizza C.; Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharm Biomed Anal* 2006, **41** (5), 1614 - 1619.
230. Friedman M. und Jurgens H.S.; Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000, **48** (6), 2101 - 2110.
231. Holzschuh M.H., Silva D.M., Schapoval E.E., und Bassani V.L.; Thermal and photo stability of phenolic constituents of an *Achyrocline satureioides* spray-dried powder. *Pharmazie* 2007, **62** (12), 902 - 906.
232. Srivastava A., Akoh C.C., Yi W., Fischer J., und Krewer G.; Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *J Agric Food Chem* 2007, **55** (7), 2705 - 2713.

233. van der Sluis A.A., Dekker M., und van Boekel M.A.; Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *J Agric Food Chem* 2005, **53** (4), 1073 - 1080.
234. Huemmer W., Dietrich H., Will F., Schreier P., und Richling E.; Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnol J* 2008, **3** (2), 234 - 243.
235. Daumann H.; Einfluss von Apfelkonsum auf Diabetes-assoziiierter Risikofaktoren für Dickdarmkrebs und das Polyphenolprofil bei gesunden Probanden. 2009.
236. Pool-Zobel B.L., Selvaraju V., Sauer J., Kautenburger T., Kiefer J., Richter K.K., Soom M., und Wolf S.; Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 2005, **26** (6), 1064 - 1076.
237. Sauer J., Richter K.K., und Pool-Zobel B.L.; Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *Br J Nutr* 2007, **97** (5), 928 - 937.
238. Rosenberg L., Palmer J.R., Zauber A.G., Warshauer M.E., Stolley P.D., und Shapiro S.; A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991, **83** (5), 355 - 358.
239. O'Leary K.A., de Pascual-Tereasa S., Needs P.W., Bao Y.P., O'Brien N.M., und Williamson G.; Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res* 2004, **551** (1-2), 245 - 254.
240. Shan J., Fu J., Zhao Z., Kong X., Huang H., Luo L., und Yin Z.; Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 2009, **9** (9), 1042 - 1048.
241. Warren C.A., Paulhill K.J., Davidson L.A., Lupton J.R., Taddeo S.S., Hong M.Y., Carroll R.J., Chapkin R.S., und Turner N.D.; Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr* 2009, **139** (1), 101 - 105.
242. Karlsson P.C., Huss U., Jenner A., Halliwell B., Bohlin L., und Rafter J.J.; Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds. *J Nutr* 2005, **135** (10), 2343 - 2349.
243. Nakao S., Ogtata Y., Shimizu E., Yamazaki M., Furuyama S., und Sugiya H.; Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2002, **238** (1-2), 11 - 18.
244. Baldwin A.S., Jr.; Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001, **107** (1), 3 - 6.
245. Dejardin E.; The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 2006, **72** (9), 1161 - 1179.

246. Plummer S.M., Holloway K.A., Manson M.M., Munks R.J., Kaptein A., Farrow S., and Howells L.; Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999, **18** (44), 6013 - 6020.
247. Tedelind S., Westberg F., Kjerrulf M., und Vidal A.; Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007, **13** (20), 2826 - 2832.
248. Yoon H. und Liu R.H.; Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF-kappaB activation in human breast cancer MCF-7 cells. *J Agric Food Chem* 2007, **55** (8), 3167 - 3173.
249. Letzig E. und Nürnberger H.; Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung von Trubausfällungen aus keltertrübem Apfelsaft. *Aus dem Institut für Obstbau und Zierpflanzen Dresden-Pillnitz der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin* 1963, 518 - 528.
250. Sun-Waterhouse D., Melton L.D., O'Connor C.J., Kilmartin P.A., und Smith B.G.; Effect of apple cell walls and their extracts on the activity of dietary antioxidants. *J Agric Food Chem* 2008, **56** (1), 289 - 295.
251. Mollov P., Mihalev K., Buleva M., und Petkanchin I.; Cloud stability of apple juices in relation to their particle charge properties studied by electro-optics. *Food Research International* 2006, **39** 519 - 524.
252. Will F. und Dietrich H.; Isolation, purification and characterization of neutral polysaccharides from extracted apple juices. *Carbohydrate Polymers* 1992, **18** 109 - 117.
253. Licht T.R., Hansen M., Bergstrom A., Poulsen M., Krath B.N., Markowski J., Dragsted L.O., und Wilcks A.; Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: role of apple pectin. *BMC Microbiol* 2010, **10** (1), 13 pages.
254. Hamer H.M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J., und Brummer R.J.; Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008, **27** (2), 104 - 119.
255. Rao C.V., Chou D., Simi B., Ku H., und Reddy B.S.; Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis* 1998, **19** (10), 1815 - 1819.
256. Umar S., Morris A.P., Kourouma F., und Sellin J.H.; Dietary pectin and calcium inhibit colonic proliferation in vivo by differing mechanisms. *Cell Prolif* 2003, **36** (6), 361 - 375.
257. Ohno K., Narushima S., Takeuchi S., Itoh K., Mitsuoka T., Nakayama H., Itoh T., Hioki K., und Nomura T.; Inhibitory effect of apple pectin and culture condensate of *Bifidobacterium longum* on colorectal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in transgenic mice harboring human prototype c-Ha-ras genes. *Exp Anim* 2000, **49** (4), 305 - 307.

258. Roy M.J., Dionne S., Marx G., Qureshi I., Sarma D., Levy E., und Seidman E.G.; In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine. *Nutrition* 2009, 1193 - 1201.
259. Eberhardt M.V., Lee C.Y., und Liu R.H.; Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000, **405** (6789), 903 - 904.
260. Kern M., Pahlke G., Balavenkatraman K.K., Bohmer F.D., und Marko D.; Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2007, **55** (13), 4999 - 5006.
261. Park S.Y., Kim E.J., Shin H.K., Kwon D.Y., Kim M.S., Surh Y.J., und Park J.H.; Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by phloretin. *J Med Food* 2007, **10** (4), 581 - 586.
262. Pischon T., Nothlings U., und Boeing H.; Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc* 2008, **67** (2), 128 - 145.
263. Harriss D.J., Atkinson G., George K., Cable N.T., Reilly T., Haboubi N., Zwahlen M., Egger M., und Renehan A.G.; Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): systematic review and meta-analysis of associations with body mass index. *Colorectal Dis* 2009, **11** (6), 547 - 563.
264. Pischon T., Lahmann P.H., Boeing H., Friedenreich C., Norat T., Tjonneland A., Halkjaer J., Overvad K., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M.C., Guerne G., Bergmann M.M., Linseisen J., Becker N., Trichopoulos A., Trichopoulos D., Sieri S., Palli D., Tumino R., Vineis P., Panico S., Peeters P.H., Bueno-de-Mesquita H.B., Boshuizen H.C., Van G.B., Palmqvist R., Berglund G., Gonzalez C.A., Dorransoro M., Barricarte A., Navarro C., Martinez C., Quiros J.R., Roddam A., Allen N., Bingham S., Khaw K.T., Ferrari P., Kaaks R., Slimani N., und Riboli E.; Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2006, **98** (13), 920 - 931.
265. Birmingham J.M., Busik J.V., Hansen-Smith F.M., und Fenton J.I.; Novel mechanism for obesity-induced colon cancer progression. *Carcinogenesis* 2009, **30** (4), 690 - 697.
266. Harle P. und Straub R.H.; Leptin is a link between adipose tissue and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1069** 454 - 462.
267. Rouet-Benzineb P., Aparicio T., Guilmeau S., Pouzet C., Descatoire V., Buyse M., und Bado A.; Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cells via NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2004, **279** (16), 16495 - 16502.
268. Keaney J.F., Jr., Larson M.G., Vasan R.S., Wilson P.W., Lipinska I., Corey D., Massaro J.M., Sutherland P., Vita J.A., und Benjamin E.J.; Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23** (3), 434 - 439.
269. Erdelyi I., Levenkova N., Lin E.Y., Pinto J.T., Lipkin M., Quimby F.W., und Holt P.R.; 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** (11), 2072 - 2078.

270. Erhardt J.G., Lim S.S., Bode J.C., und 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** (5), 706 - 709.
271. Rieger M.A., Parlesak A., Pool-Zobel B.L., Rechkemmer G., und Bode C.; A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis* 1999, **20** (12), 2311 - 2316.
272. Babbs C.F.; Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med* 1990, **8** (2), 191 - 200.
273. Bartsch H., Nair J., und Owen R.W.; Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem* 2002, **383** (6), 915 - 921.
274. Chang E.B., Sitrin M.D., und Black D.D.; Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Nutritional Physiology. 1996, 278 - 284.
275. Rehner G. und Daniel H.; Biochemie der Ernährung. 2002, **2. Auflage**.
276. McGarr S.E., Ridlon J.M., und Hylemon P.B.; Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005, **39** (2), 98 - 109.
277. Ridlon J.M., Kang D.J., und Hylemon P.B.; Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006, **47** (2), 241 - 259.
278. Bernstein H., Payne C.M., Kunke K., Crowley-Weber C.L., Waltmire C.N., Dvorakova K., Holubec H., Bernstein C., Vaillancourt R.R., Raynes D.A., Guerriero V., und Garewal H.; A proteomic study of resistance to deoxycholate-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004, **25** (5), 681 - 692.
279. Payne C.M., Weber C., Crowley-Skillicorn C., Dvorak K., Bernstein H., Bernstein C., Holubec H., Dvorakova B., und Garewal H.; Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 2007, **28** (1), 215 - 222.
280. Rao Y.P., Studer E.J., Stravitz R.T., Gupta S., Qiao L., Dent P., und Hylemon P.B.; Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factor receptor in primary rat hepatocytes. *Hepatology* 2002, **35** (2), 307 - 314.
281. Hughes R. und Rowland I.; Nutritional and Microbial Modulation of Carcinogenesis, In: Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health. 2003, 208 - 236.
282. Hebels D.G., Jennen D.G., Kleinjans J.C., und de Kok T.M.; Molecular signatures of N-nitroso compounds in Caco-2 cells: implications for colon carcinogenesis. *Toxicol Sci* 2009, **108** (2), 290 - 300.
283. Bernstein H., Bernstein C., Payne C.M., und Dvorak K.; Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2009, **15** (27), 3329 - 3340.

284. Cummings J.H. und Macfarlane G.T.; Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997, **21** (6), 357 - 365.
285. Wong J.M., de S.R., Kendall C.W., Emam A., und Jenkins D.J.; Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006, **40** (3), 235 - 243.
286. Koch T.C., Briviba K., Watzl B., Fahndrich C., Bub A., Rechkemmer G., und Barth S.W.; Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: impact of juice constituents and obesity. *Mol Nutr Food Res* 2009, **53** (10), 1289 - 1302.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Claudia Miene geboren am 30.06.1982 in Zwickau, Familienstand: ledig

Berufliche und schulische Ausbildung

- seit 04/2010 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
JenaGen GmbH, Jena
- 02/2007 – 03/2010 **Promotionsstudentin/wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Promotionsthema
„Chemopräventive Effekte von Apfelpolyphenolen und ausgewählten Metaboliten in humanen Kolonzellen unter besonderer Berücksichtigung der GSTT2.“
- 10/2001 – 01/2007 **Studium der Ernährungswissenschaften**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Diplomthema
„Untersuchungen zum Effekt von Apfel-Polyphenolen auf die Expression und Aktivität der Phase II-Enzyme UGT1A1, UGT1A4 und Isoformen der UGT2B-Familie in Kolonadenom- und Kolonadenokarzinomzellen.“
Abschluss: Diplom-Trophologin
- 06/2001 **Abitur**
Christoph-Graupner-Gymnasium in Kirchberg

Praktische Tätigkeiten

- 04/2007 **Labora Austausch**
Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- 03/2005 – 04/2005 **Praktikum in der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft**
Referat Anorganische Analytik, Jena
- 08/2004 – 09/2004 **Forschungspraktikum**
Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena
Thema der praktischen Arbeit
„Eignung von aus Fäzesproben isolierter DNA zur Genotypisierung von Probanden.“
- 02/2004 – 03/2004 **Praktikum im Lebensmittelüberwachungs- und Veterinäramt**
Landkreis Chemnitzer Land
- 07/2003 – 08/2003 **Praktikum in der Großküche/Bereich Diätetik**
Kreiskrankenhaus Kirchberg

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Miene C, Weise A, Gleis M: Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). (eingereicht bei *Nutrition and Cancer*)

Petermann A*, **Miene C***, Schulz-Raffelt G, Palige K, Hölzer J, Gleis M, Böhmer FD: *GSTT2*, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. *Mol Nutr Food Res*, 53(10) 1245-53, 2009

Miene C, Klenow S, Veeriah S, Pool-Zobel BL, Gleis M: 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, 2009

Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, **Miene C**, Munjal U, Stein K, Gleis M: Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mut Res*, 682(1) 39-53, 2009

Miene C, Gleis M: Chemopräventive Effekte von Apfelpolyphenolen. *Flüssiges Obst* (Ausgabe 07/2008)

Veeriah S, **Miene C**, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Sauer S, Böhmer F, Wölfl S, Pool-Zobel BL: Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer*, (122) 2647-2655, 2008

*) geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

Vergleichende Untersuchung von Apfelpolyphenolextrakten unterschiedlicher Erntejahrgänge auf Parameter der Chemoprotektion in humanen Kolonzellen (LT97, HT29).

45. *Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE)*, Lebensmittelqualität, 2008, Bonn

Poster

Miene C, Gleis M: Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on chemoprevention of colon cancer. Risk assessment of phytochemicals in food - novel approaches, *Symposium der Senats-Kommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM)*, 2009, Kaiserslautern

Petermann A, **Miene C**, Schulz-Raffelt G, Pool-Zobel BL, Böhmer FD: Protection against DNA damage in colon epithelial cells by *GSTT2*, a phase II gene induced by apple polyphenols. *Nutrition and Health: Intestinal effects of food constituents, 2nd Symposium GRK 1427*, 2008, Düsseldorf

Miене C, Veeriah S, Pool-Zobel BL: Modulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) by an apple polyphenol extract in the colon adenoma and carcinoma cell lines. 1. *International Symposium on Nutrition and Intestinal Health*, 2007, Kaiserslautern

Veeriah S, **Miене C**, Pool-Zobel BL: Assessment of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) induction by apple polyphenols in the human colon adenoma cell line LT97. *10th Karlsruhe Nutrition congress*, 2006, Düsseldorf

Publizierte Abstracts

Petermann A, **Miене C**, Schulz-Raffelt G, Pool-Zobel BL, Böhmer FD: Protection against DNA damage in colon epithelial cells by *GSTT2*, a phase II gene induced by apple polyphenols. *Abstracts of Nutrition and Health: Intestinal effects of food constituents*, 2008

Miене C, Veeriah S, Klenow S, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL: Vergleichende Untersuchung zur Wirkung von Apfelpolyphenolextrakten unterschiedlicher Erntejahrgänge auf Parameter der Chemoprotektion in humanen Kolonadenomzellen (LT97). *Proc Germ Nutr Soc, Vol 12*, 2008

Pool-Zobel BL, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Knöbel Y, **Miене C**, Munjal U, Scharlau D, Veeriah S, Gleis M: Modulation of carcinogenesis by food components: targets and mechanisms of action. *Ann Nutr Metab, Vol 51, Suppl. 1*, 2007

Danksagung

An dieser Stelle danke ich all jenen, die durch ihre fachliche, aber auch persönliche Kompetenz zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei der viel zu früh verstorbenen Frau Prof. Beatrice Louise Pool-Zobel bedanken, die mir die Möglichkeit eröffnete nach meiner Diplomarbeit weiter an der interessanten Themenstellung zu arbeiten und darüber diese Dissertation verfassen zu können.

Mein Dank gilt ebenso PD Dr. Michael Glei für die Unterstützung und erstklassige Betreuung in allen Forschungslagen sowie die zahlreichen Vorschläge für Verbesserungen. Des Weiteren danke ich ihm für seine unermüdliche Motivation.

Für seine ausgesprochen offene, ausgeglichene Art und seine konstruktive Hilfe bei allen Problemen und Unklarheiten danke ich Dr. Daniel Scharlau.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Frank-Dietmar Böhmer für eine sehr gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Meinen lieben Kollegen der ETOX danke ich für den freundschaftlichen Umgang innerhalb der Arbeitsgruppe, die nicht nachlassende Hilfsbereitschaft sowie die aufrichtige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) danke ich für die finanzielle Förderung des Projektes.

Ein großer Dank gebührt meinen Freunden, die immer für die notwendige Abwechslung zum Laboralltag sorgten. Denn durch sie sieht man die Welt auch aus anderen Perspektiven.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Schatz Sebastian für seine Geduld und Ausdauer, die manchmal dringend nötig waren, um mich zu ertragen.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meiner Eli-Maus fürs Zuhören, Aufrichten und ihr uneingeschränktes Verständnis. Ohne Euch hätte das alles nie geklappt.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Jena, im Juli 2010

Claudia Miene