

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/pisc](http://www.elsevier.com/locate/pisc)

# Einfluss der Lebensmittelprozessierung auf die Bioverfügbarkeit von Kupfer: Untersuchungen zur zellulären Kupferaufnahme aus $\text{CuSO}_4$ und Melanoidin-Cu-Komplexen <sup>☆</sup>

Claudia Keil<sup>a,\*</sup>, Juliane Kirchner<sup>a</sup>, Bettina Cämmerer<sup>a</sup>,  
Ines Laube<sup>a</sup>, Andrea Hartwig<sup>b</sup>, Lothar W. Kroh<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin

<sup>b</sup>Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Abteilung für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Adenauerring 20 a (Geb. 50.41), 76131 Karlsruhe

Received 30 July 2014; accepted 31 August 2014

Available online 29 November 2014

## KEYWORDS

Melanoidin;  
Kupfer;  
Kolonkarzinom;  
poly (ADP-Ribose)  
Polymerase;  
Metallothionein

## Abstract

Kupfer gilt als essentielles Spurenelement, da es als struktureller und katalytischer Cofaktor Bestandteil vieler lebenswichtiger Enzyme ist. Andererseits kann jedoch eine exzessive Zufuhr von Kupfer nachfolgend zu irreversiblen Gewebeschäden führen. Um pathophysiologische Erscheinungen zu vermeiden, muss deshalb sowohl die physiologische Kupferhomöostase als auch die Aufnahme von Kupfer aus der Nahrung streng reguliert werden. Obwohl Melanoidine als finale Produkte der thermischen Prozessierung von kohlenhydratreichen Lebensmitteln nachgewiesenermaßen über metallchelatisierende Eigenschaften verfügen, ist ihre Bedeutung für die Resorption von lebensnotwendigen Mineralien und Spurenelementen bisher nur unzureichend geklärt. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass lebensmittelrelevante Melanoidine über ein revertierbares Kupferbindungsvermögen verfügen. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen der Menge aus den Maillard-Reaktionsprodukten (MRPs) freisetzbarer Kupferionen und der Hemmung des Cu-sensitiven Enzyms poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 nachgewiesen werden. Die Aufnahme der Cu-Ionen aus Melanoidin-Cu Komplexen in humane HCT116-Kolonkarzinomzellen erfolgt im Vergleich zu der anorganischen Verbindung  $\text{CuSO}_4$  in gleichem

<sup>☆</sup>Dieser Beitrag gehört zum Sonderheft “Den Elementen auf der Spur - Diagnostik und medizinische Bedeutung der Spurenelemente”.

\*Corresponding authors.

E-mail addresses: [c.keil@tu-berlin.de](mailto:c.keil@tu-berlin.de) (C. Keil), [lothar.kroh@tu-berlin.de](mailto:lothar.kroh@tu-berlin.de) (L.W. Kroh).

Ausmaß, jedoch mit deutlich größerer Geschwindigkeit. Die durchgeführten Genexpressionsanalysen weisen zudem auf Unterschiede in der zellulären Bioverfügbarkeit der aufgenommenen Kupferionen hin. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Melanoidine als Endprodukte der Maillard-Reaktion regulierend in den Prozess der Kupferaufnahme in intestinalen Zellen eingreifen und thermisch prozessierte Lebensmittel somit als wichtige Modulatoren der Kupferhomöostase angesehen werden müssen.

© 2014 Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

## Einleitung

Als essentielles Spurenelement ist Kupfer am dritthäufigsten nach Eisen und Zink im Körper vertreten, wobei von einem Bestand an Cu im Erwachsenen zwischen 50-150 mg ausgegangen wird (Turnlund, 1994). Die Essentialität ergibt sich daraus, dass Cu als strukturelle Komponente sowie auch als redoxaktiver Kofaktor Bestandteil von mehr als 30 Enzymen wichtig für den Erhalt der Eisenhomöostase, der Bindegewebsstabilität, des Lipidmetabolismus als auch des antioxidativen Schutzsystems ist. Eine Unterversorgung mit Kupfer infolge einseitiger Ernährung oder aufgrund von Störungen bei der Aufnahme verursacht Mangelerscheinungen wie beispielsweise Blutarmut (normozytäre Anämie), Funktionsstörungen des Immun- und Nervensystems, Bindegewebsveränderungen sowie Pigmentstörungen in der Haut und den Haaren. Andererseits kann jedoch eine exzessive Zufuhr von Kupfer, bedingt durch die zelluläre Anhäufung freier Kupferionen und der verstärkten Generierung von Hydroxylradikalen, nachfolgend

in oxidativen Gewebsschädigungen und proinflammatorischen Erscheinungen resultieren (Arredondo and Nunez, 2005; Uriu-Adams and Keen, 2005). Im Allgemeinen beläuft sich die Zufuhr von Kupfer über die Ernährung für Erwachsene im Bereich von 1 bis 3 mg Cu/Tag, kann sich jedoch infolge der Zufuhr von Nahrungsergänzungsmitteln auf bis zu 5 mg/Tag erhöhen. Die wichtigsten Kupferquellen für den Menschen sind Cu-haltige Nahrungsmittel wie Meerestiere, Schokolade, Nüsse und Vollkorngetreide sowie das Trinkwasser (European Food Safety Authority, 2006; Institute of Medicine, 2001). Seitens verschiedener nationaler und internationaler Gremien wird eine Tagesdosis für Kupfer mit ca. 0,9 mg/Tag für Jugendliche und Erwachsene sowie altersabhängig zwischen 0,3-0,7 mg/Tag für Kinder empfohlen. Im Hinblick auf die Vermeidung möglicher toxikologischer Risiken für die Bevölkerung wurde von der ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) ein „Maximum Residue Limit“ (MRL-Wert) von 0,01 mg Cu/kg/KG/Tag für eine Aufnahme von Kupfer aus natürlichen pflanzlichen und tierischen Quellen vorgeschlagen.

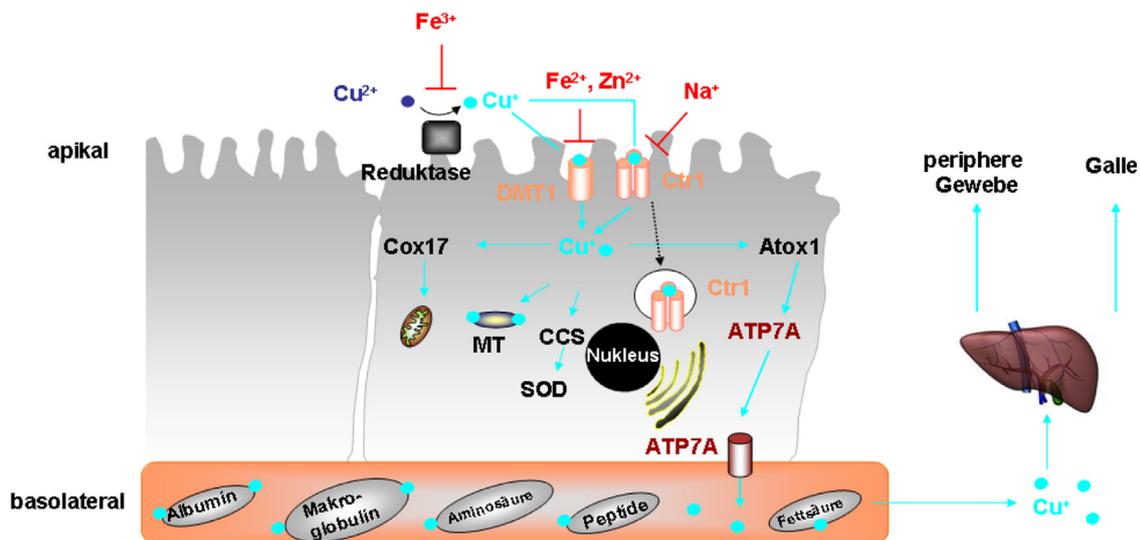


Abb. 1 Schematische Übersicht zur humanen Kupferhomöostase. Über die Nahrung aufgenommene Kupfer-Ionen werden auf apikaler Seite nichtenzymatisch oder aber unter Beteiligung von Metalloreduktasen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und über die Kupfertransporter hCtr1 und DMT1 in den Enterozyten eingeschleust. Vermittelt über die Chaperone Cox17 und CCS erfolgt intrazellulär die Verteilung an kupferhaltigen Enzyme der Atmungskette sowie die Superoxiddismutase (SOD). Das Kupferchaperon Atox1 überführt die im Zytosol befindlichen Kupferionen auf die für die Abgabe der Kupferionen auf basolateraler Seite verantwortliche ATP-getriebene Kupferpumpe ATP7A. Im portalen System wird Kupfer an Albumin, alpha2-Makroglobulin und Histidin gebunden zur Leber transportiert wo es wiederum mittels hCtr1 effizient absorbiert und unter Zuhilfenahme der Kupfer-ATPase ATP7B (Wilson-ATPase) für den Transport in die extrahepatischen Geweben oder die Ausscheidung über die Galle verteilt wird.

Dem vom Scientific Committee on Food festgelegtem "Tolerable Upper Intake Level" für Kupfer von 5 mg/Tag (SCOEL (The Scientific Committee on Occupational Exposure Limits), 2013) wurde seitens des Bundesinstituts für Risikobewertung mit dem Hinweis auf den Verzicht von Kupfer durch Nahrungsergänzungsmittel Rechnung getragen (BfR, 2004). Der Kupferbestand im menschlichen Körper wird wesentlich durch die Anpassung der intestinalen Absorption und der Ausscheidung über die Galle reguliert. Vorrangig erfolgt die Resorption des Kupfers aus dem Magen und im oberen Dünndarm (Duodenum). Hauptsächlich verantwortlich für den Transport in die Enterozyten sind die in der apikalen Duodenummembran befindlichen Kupfertransporter hCtr1 und DMT1 (van den Berghe and Klomp, 2009; Nevitt et al., 2012). Im Enterozyten erfolgt die Verteilung der  $\text{Cu}^+$ -Ionen zu den kupferhaltigen Enzymen der Atmungskette oder der Superoxiddismutase unter Zuhilfenahme der Kupferchaperone Cox17 und CCS (siehe Abb. 1). Für den Transport von Kupfer durch die basolaterale Membran in die interstitielle Flüssigkeit und das Blut ist die ATP-getriebene Kupferpumpe ATP7A (Menkes ATPase) zuständig. Im portalen System wird Kupfer an Albumin, alpha2-Makroglobulin und Histidin gebunden zur Leber transportiert wo es wiederum mittels hCtr1 effizient absorbiert und unter Zuhilfenahme der Kupfer-ATPase ATP7B (Wilson-ATPase) für den Transport in die extrahepatischen Gewebe oder die Ausscheidung über die Galle verteilt wird.

Die bisher in Humanstudien durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Kupferresorption als wesentlicher Bestandteil der physiologischen Kupferhomöostase durch zahlreiche Faktoren, wie das Alter oder das Geschlecht des Individuums aber auch durch im Lebensmittel enthaltene Makro- und Mikronährstoffe und Ballaststoffe beeinflusst werden kann (European Food Safety Authority, 2006; Wapnir, 1998). Hauptaugenmerk unserer Untersuchungen lag auf der bisher nur unzureichend geklärten Fragestellung nach der Bedeutung der Lebensmittelprozessierung für die Bioverfügbarkeit der Kupferionen. Diesbezüglich ist aus der Literatur bekannt, dass Melanoidine, welche als Endprodukte der Maillard-Reaktion besonders bei der hitzeinduzierten Be- und Verarbeitung kohlenhydrat- und aminosäurehaltiger Lebensmitteln entstehen, über metallchelatisierende Eigenschaften verfügen (Gomyo and Horikoshi, 1976; Morales et al., 2012). In verschiedenen Studien wurde vorgeschlagen, dass MRPs aufgrund ihres Verhaltens als anionische Polymere in der Lage sind  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+/1+}$ ,  $\text{Fe}^{3+/2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  zu komplexieren, was abhängig vom eingesetzten Maillard-Reaktionsmodell in einer erhöhten oder aber verminderten apparenten Verfügbarkeit der Metallionen resultierte. Einhergehend damit wurden auch im Tierkulturmodell zum Teil gegensätzlichen Effekte auf die Bioverfügbarkeit beobachtet (O'Brien and Morrissey, 1997; Delgado-Andrade et al., 2002). Zum jetzigen Zeitpunkt sind nur wenige Studien beschrieben, die sich mit der Bedeutung einzelner Maillard-Reaktionsprodukte oder aber prozessierter MRP-reicher Nahrungsmittel auf die Vorgänge der Kupferresorption sowie die resultierenden Effekte auf die Kupferhomöostase im Menschen beschäftigen (Mesías et al., 2012; Ruiz-Roca et al., 2008). Kürzlich publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Melanoidin-Cu Komplexe unter bestimmten Bedingungen über ein prooxidatives Potential gegenüber isolierter DNA als auch in kultivierten menschlichen Kolonkarzinomzellen verfügen (Cämmerer et al., 2012). Im Hinblick auf die Bedeutung einer intakten Kupferhomöostase für die körperliche und

geistige Entwicklung des Menschen bestand der Fokus der vorliegenden Studie darin, den Einfluss von durch thermische Prozessierung gewonnenen lebensmittelrelevanten Melanoidinen auf die Aufnahme und Verfügbarkeit von Kupferionen in humanen HCT116-Kolonkarzinomzellen zu untersuchen.

## Material und Methoden

### Zellmodell

Als Zellmodell wurden humane HCT116-Kolonkarzinomzellen verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte als Monolayer in Zellkulturschalen bei 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  und 100% Luftfeuchtigkeit. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit den jeweiligen präparierten Melanoidinen oder  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, 99,999%) für maximal 24 h.

### Herstellung und Charakterisierung der Melanoidine

Zur Herstellung der Melanoidine wurde D-Glc und L-Ala in äquimolaren Mengen gemischt und für 10 min bei 160 °C im Trocknen erhitzt (Cämmerer and Kroh, 1995). Nach einer Dialyse (MWCO 12-14 kDa) gegen destilliertes Wasser oder 10 mM  $\text{CuSO}_4$  wurden ungebundene Metallionen mittels Ultrafiltration (MWCO 3 KD) entfernt. Die Lagerung der gefriergetrockneten Melanoidine erfolgte in einem Exsikkator im Dunkeln. Die Charakterisierung der Melanoidine bezüglich des Gesamtkupfergehaltes erfolgte durch Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie mittels externer Kalibrierung (Cämmerer et al., 2012). Die Kupferchelatisierenden Eigenschaften der Melanoidine wurden durch Bestimmung des ungebundenen Kupfers mit Tetramethylmurexid quantifiziert (Ruiz-Roca et al., 2008).

### Poly (ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten

Der Einfluss von  $\text{CuSO}_4$  oder Cu-Melanoidinen auf die poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität von HCT116-Kernextrakten wurde anhand der Inkooperationsrate von  $^{32}\text{P}$ -NAD<sup>+</sup> in  $^{32}\text{P}$ -markierte poly (ADP-Ribose) Polymere bestimmt. Hierfür wurden aus HCT116-Zellen präparierte Kernextrakte (Schreiber et al., 1989) in Gegenwart von  $\text{CuSO}_4$  oder Cu-Melanoidinen mit sonifizierter Lachsspermin-DNA und  $^{32}\text{P}$ -NAD<sup>+</sup> inkubiert und die nach Trichloressigsäurefällung verbliebene Menge an  $^{32}\text{P}$ -markierten Molekülen mittels Cerenkov-Messung quantifiziert (Keil et al., 2004). Alternativ wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper mittels Western-Blot Analysen die Menge an unmodifizierter und mit poly (ADP-Ribose) modifizierter PARP-1 nachgewiesen (Keil et al., 2006).

### Genexpressionsanalysen

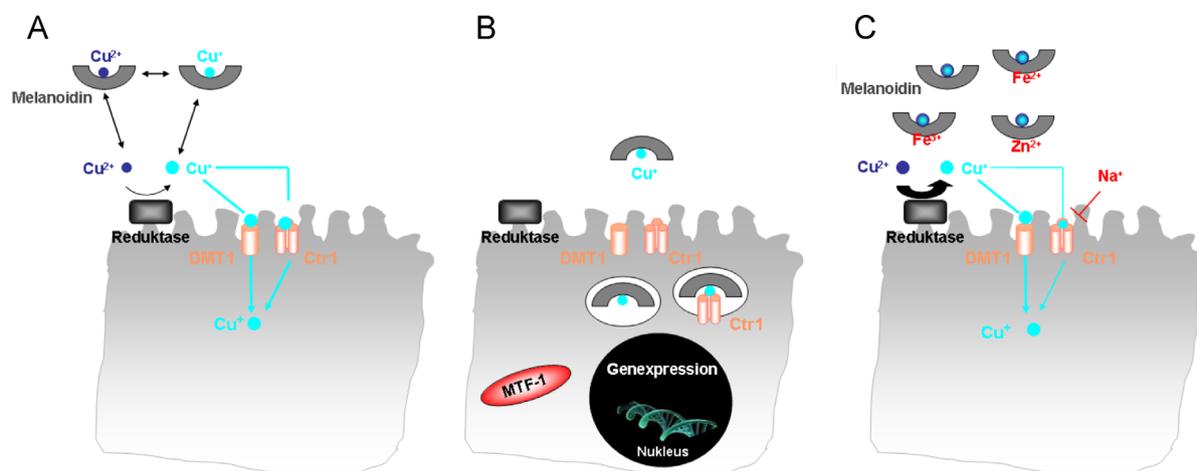
Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels Real-Time-PCR unter Verwendung des SYBR Green RT-PCR Systems. Als Zielgen wurde *mt2A* (Metallothionein 2 A) unter Verwendung von *gapdh* als invarianter Kontrolle analysiert. Zur Berechnung wurde das Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell herangezogen (Pfaffl 2001).

## Resultate und Schlussfolgerung

Ziel der Untersuchungen war es, vergleichende Aussagen zur Aufnahme und Bioverfügbarkeit von Kupferionen einerseits aus der in der Kupfersupplementation eingesetzten anorganischen Verbindung  $\text{CuSO}_4$  (SCOEL (The Scientific Committee on Occupational Exposure Limits), 2013; European Food Safety Authority, 2008) sowie andererseits aus hochpolymeren Melanoidin-Cu-Komplexen in humanen HCT116-Kolonkarzinomzellen zu erhalten. Hierfür wurde zunächst ein D-Glucose/L-Alanin-Modell thermisch prozessiert. Die nachfolgende kurze Dialyse gegen destilliertes Wasser erlaubte die Abtrennung von unumgesetzten Ausgangsstoffen, niedermolekularen Maillard-Reaktionsprodukten sowie Melanoidinvorstufen. Eine daran anschließende gezielte Dialyse gegen  $\text{CuSO}_4$  mit nachfolgender Ultrafiltration resultierte in Melanoidin-Cu Komplexen mit einer Kupferabsättigung von ungefähr 200 mg Cu-Ionen/g Melanoidin-Cu-Komplex, bestimmt durch Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie. Nach erneuter Resuspension der Cu-Melanoidine in bidestilliertem Wasser wurden in Gegenwart des Kupferchelators Tetramethylmurexid ca. 54% des Kupfers als freie Kupferionen detektiert, womit die Möglichkeit einer Freisetzung der Kupferionen aus den Melanoidin-Cu-Komplex unter physiologischen Bedingungen angenommen werden kann. Die besondere Affinität von Produkten der Maillard Reaktion gegenüber Kupferionen sind in der Literatur bereits sowohl für frühe Intermediate (Seifert et al., 2004; Mossine and Mawhinney, 2007; Ortega-Castro et al., 2009) als auch Produkte der späten Phase der Maillard-Reaktion (Morales et al., 2012; Gomyo and Horikoshi, 1976; Borrelli et al., 2002) beschrieben. Vermehrt wurde dabei ein Zusammenhang zwischen der Farbintensität und Molekülgröße der im Zuge der thermischen Behandlung generierten Moleküle und dem Kupferbindungsvermögen beobachtet, woraus sich Hinweise auf eine Metallchelatisierung vor allem durch die final gebildeten Melanoidinpolymere ergaben (Morales et al., 2012; Wijewickreme et al., 1997; Yoshimura et al., 1997). Diesbezüglich wurde von Plavsic et al. (2006) gezeigt, dass bei der thermischen Prozessierung von Reaktionsmodellen generiert aus D-Glucose und L-Lysin, oder alternativ unter Verwendung von L-Glutaminsäure bzw. L-Valin als Aminokomponente, die höhermolekularen Fraktionen stets über ein deutlich größeres Kupferbindungsvermögen verfügten als die Komponenten mit einem Molekulargewicht  $< 10$  kDa. Hinsichtlich der Kupferkomplexierung wurden zum einen kovalente Bindungsformen aber auch elektrostatische Anziehungskräfte diskutiert (Morales et al., 2012; Plavsic et al., 2006). Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine einheitlichen Aussagen zum Mechanismus der Metallchelatisierung durch Melanoidine und Maillard-Reaktionsprodukte. Vielmehr müssen die dafür verantwortlichen funktionellen Gruppen und die Stabilitätskonstanten der Komplexe im gewählten Lebensmittel bzw. Modell einzeln bestimmt werden. Grundsätzlich jedoch wird das Ausmaß der Metallchelatisierung von den Melanoidinen über das Verhältnis zwischen den Bildungsraten der MRP-Metall-Addukte und deren Dissoziation bestimmt. Liegt es auf Seite des Adduktes kann dies von physiologischem Vorteil im Falle einer Detoxifizierung von kanzerogenen und/oder toxischen Metallen sein (Morales et al., 2012). Diesbezüglich wurde der Effekt der Melanoidin-Cu-Komplexe auf die Aktivität der in der Literatur als Cu-sensitiv beschriebenes Enzym poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (Schwerdtle et al., 2007) untersucht.

Während sich die Hemmung der poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität in HCT116-Kernextrakten bereits ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  zeigte, waren für vergleichbare Effekte deutlich höhere Konzentrationen an in Melanoidin-Cu-Komplexen enthaltenen Kupferionen nötig. Entsprechend generierte hochmolekulare Melanoidine ohne Metallbeladung zeigten keine inhibierende Wirkung. Zusammenfassend bedeutet dies, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem aus lebensmittelrelevanten Melanoidin-Cu-Komplexen freisetzbaren Kupferionen und der Hemmung der PARP-1 Aktivität besteht. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass auch Melanoidin-gebundene Kupferionen über ein inhibitorisches Potential verfügen. Bezüglich dieser Hypothese wurde als ein möglicher Mechanismus der Hemmung der PARP-1 durch  $\text{CuSO}_4$  eine Inaktivierung der für die enzymatischen Aktivität essentiellen Zinkfingerstrukturen diskutiert (Schwerdtle et al., 2007). Die Bedeutung der im N-Terminus der PARP-1 befindlichen Zinkfingerstrukturen, in denen Zinkionen unter Beteiligung von Cystein- und Histidinresten gebunden werden, zeigt sich am Beispiel von PARP-1 Molekülen, in denen diese Aminosäuren deletiert oder durch gerichtete Mutagenese substituiert wurden (Trucco et al., 1999). Solche Proteine zeigen klare Defizite sowohl in der Erkennung von DNA-Schäden als auch der daran anschließenden Synthese von poly (ADP-Ribose) Polymeren sowohl im isolierten in-vitro System als auch unter zellulären Bedingungen (Langelier et al., 2012; Langelier and Pascal, 2013). Mit Blick auf die enorme Bedeutung der poly (ADP-Ribosyl)ierung für den Erhalt der genomischen Stabilität, bedingt durch die Beteiligung an zellulären Prozessen wie der Transkription, DNA-Reparatur, Telomerintegrität und der Regulation des Zelltodes (Oei et al., 2005; Schreiber et al., 2006), ist es daher von größtem Interesse die für die Inaktivierung der PARP-1 zugrundeliegenden Mechanismen im Falle der Melanoidin-Cu-Komplexe weiter aufzuklären.

Bezüglich der Frage nach der Bedeutung der Cu-Komplexierung durch hochmolekulare D-Glc/L-Ala Melanoidine für die Kupferresorption wurden im Folgenden die Kupferaufnahme in kultivierte humane intestinale Zellen untersucht. Hierfür wurden HCT116-Kolonkarzinomzellen für einen Zeitraum von 24 h mit  $\text{CuSO}_4$  oder Melanoidin-Cu Komplexen inkubiert und der zelluläre Kupfergesamtgehalt nach einem oxidativen Nassaufschluss mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse zeigten gegenüber den Kontrollzellen mit einem Gehalt von ca.  $25 \mu\text{M}$  Cu sowohl durch die Behandlung mit  $\text{CuSO}_4$  als auch mit Melanoidin-Cu Komplexen dosisabhängig eine Zunahme des zellulären Kupfergehaltes auf bis zu  $500 \mu\text{M}$ . Der direkte Vergleich beider Substanzen nach 24 h ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede, sodass von einer ähnlichen Effizienz der Kupferaufnahme aus  $\text{CuSO}_4$  und Melanoidin-Cu Komplexen in HCT116-Zellen ausgegangen werden muss. Detaillierte kinetische Untersuchungen zeigten jedoch, dass innerhalb der ersten 6 Stunden der Inkubation der Kupfertransport ausgehend von den MRP-Cu Komplexen deutlich schneller erfolgt. Hierzu ist bekannt, dass die für die intestinale Kupferaufnahme vornehmlich verantwortlichen Transporter hCTR1 und DMT1 vorrangig einwertige Kupferionen transportieren (van den Berghe and Klomp, 2009; Nevitt et al., 2012). Dies erfordert eine Umwandlung der im Dünndarm vorhandenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, vermittelt durch in der Enterozytenmembran befindlichen



**Abb. 2** Modelle zum Einfluss von Melanoidine auf die intestinale Kupferaufnahme. **(A)** Melanoidine könnten aufgrund ihrer metallchelatisierenden sowie reduzierenden Eigenschaften die Menge an  $\text{Cu}^+$ -Ionen, verfügbar für die in der intestinalen Membran befindlichen Kupfertransporter Ctr1 und DMT1 modulieren. **(B)** Postuliert wird eine zelluläre Aufnahme von Kupferionen aus Melanoidin-Cu Komplexen über Prozesse der Endozytose. Dieser zelluläre Pool steht jedoch nicht unmittelbar für die Aktivierung einer Cu-induzierten Genexpression unter anderem vermittelt über den Transkriptionsfaktor MTF-1 zur Verfügung. **(C)** Begründet mit ihrem Metallchelatisierungsvermögen, so auch für  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, ist ein induzierender Effekt der Melanoidine auf die in der intestinalen Membran befindlichen Metalloreduktasen mit  $\text{Cu}^{2+}$ -reduzierendem Potential möglich. Zudem kann die Kupferaufnahme vermittelt über die Transportproteine Ctr1 und DMT1 für Kupfer gesteigert werden, indem inhibitorische Metallionen ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) durch Melanoidine chelatisiert werden.

Metalloreduktasen wie beispielsweise die Familie der STEAP-Proteine oder die duodenale Cytochrom c-Reduktase (Lönnerdal, 2008; Ohgami et al., 2006; Knutson, 2007). Zudem wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von lebensmittelrelevanten Inhaltsstoffen mit reduzierendem Potential, wie beispielsweise Ascorbinsäure, die Kupferaufnahme in kultivierte Zellen deutlich verbessert wurde (Lee et al., 2002; Zimnicka et al., 2011).

Im Hinblick auf die Tatsache, dass auch die im Zuge der thermischen Prozessierung gebildeten Melanoidine über ein hohes Maß an reduzierenden Eigenschaften verfügen (Cämmerer et al., 2012; Borrelli et al., 2002), soll in Folgeexperimenten nunmehr überprüft werden, inwiefern sich aus diesen Eigenschaften ebenfalls mechanistische Zusammenhänge zum Ablauf und der Regulation der Kupferaufnahme ergeben (Abb. 2A).

Einen entscheidenden Einfluss auf die intestinale Kupferabsorption übernimmt die daran anschließende intrazelluläre Verteilung der Kupferionen einerseits via Kupferchaperone an kupferabhängige Enzyme der Atmungskette sowie die Superoxiddismutase oder andererseits an vorübergehende Kupferspeicherproteine wie Glutathion oder die kleinen metallbindenden Proteine der Metallothioneine (van den Berghe and Klomp, 2009; Nevitt et al., 2012). Um die Bioverfügbarkeit der Kupferionen in HCT116-Kolonzellen nach Inkubation mit  $\text{CuSO}_4$  oder Melanoidin-Cu Komplexen einschätzen zu können, wurden mittels Real-Time-PCR Änderungen der Transkriptmengen kodierend für die Metallothioneine MT2A durchgeführt. Während sich die relative Genexpression von *mt2A* nach einer 24-stündigen Inkubation mit  $400 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  maximal 10-fach gegenüber den Kontrollzellen erhöhte, konnte bei Verwendung gleicher Kupferinkubationskonzentrationen aus Melanoidin-Cu Komplexen eine signifikant geringere Induktion der Metallothionein 2 A-Genexpression beobachtet werden. Im Zusammenhang mit der zuvor genannten

Quantifizierung der Kupferaufnahme führte dies zu der Hypothese, dass die aus der anorganischen Verbindung  $\text{CuSO}_4$  sowie aus Melanoidin-Cu Komplexen in HCT116-Zellen aufgenommenen Kupferionen in unterschiedliche zelluläre Pools überführt werden. Nachfolgend sollen nun die dafür verantwortlichen Transportmechanismen identifiziert und mögliche regulatorische Einflüsse analysiert werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich in der Literatur, neben den bereits zuvor erwähnten Cu-Aufnahmewegen über in der apikalen Enterozytenmembran befindlichen Carrier, auch Hinweise auf eine Aufnahme von Kupferionen aus anorganischen Kupferquellen über endozytotische Internalisierung unter Beteiligung des Kupfertransporters hCtr1 finden (van den Berghe and Klomp, 2009; Zimnicka et al., 2011; Guo et al., 2004). Insbesondere im Hinblick auf die strukturellen und molekularen Besonderheiten der Melanoidine (Chandra et al., 2008; Wang et al., 2011) soll die Rolle der Pinozytose für die Aufnahme von Kupferionen aus Melanoidin-Kupfer Komplexen in HCT-116-Zellen sowie auch in komplexen intestinalen Modellen zukünftig untersucht werden (Abb. 2B).

## Conflict of Interest

Die Autoren erklären, dass kein Conflict of Interest vorliegt.

## References

- Arredondo, M., Nunez, M.T., 2005. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* **26**, 313-327.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2004. Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln, Berlin, Germany.
- Borrelli, R.C., Fogliano, V., Monti, S.M., Ames, J.M., 2002. Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 210-215.

- Cämmerer, B., Chodakowski, K., Gienapp, C., Wohak, L., Hartwig, A., Kroh, L.W., 2012. Pro-oxidative effects of melanoidin-copper complexes on isolated and cellular DNA. *Eur Food Res Technol* **234**, 663-670.
- Cämmerer, B., Kroh, L.W., 1995. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chem* **53**, 55-59.
- Chandra, R., Bharagava, R.N., Rai, V., 2008. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresour Technol* **99** (11), 4648-4660.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P., 2002. Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. *J. Food Sci.* **67**, 855-860.
- European Food Safety Authority, 2006. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. (<http://www.efsa.europa.eu/de/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf>).
- European Food Safety Authority, 2008. Conclusion on the peer review of copper compounds. EFSA Scientific Report **187**, 1-101 (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/187r.pdf>).
- Gomyo, T., Horikoshi, M., 1976. On the interaction of melanoidin with metallic ions. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 33-40.
- Gomyo, T., Horikoshi, M., 1976. Interaction of Melanoidin with Metallic-ions. *Agric. Biol. Chem.* **40** (1), 33-40.
- Guo, Y., Smith, K., Lee, J., Thiele, D.J., Petris, M.J., 2004. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J Biol Chem.* **279** (17), 17428-17433.
- Institute of Medicine, 2001. In: Board, F.a.N. (Ed.), *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.* National Academic Press, National Research Council, Washington, DC.
- Keil, C., Gröbe, T., Oei, S.L., 2006. MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. *J Biol Chem.* **281** (45), 34394-34405.
- Keil, C., Petermann, E., Oei, S.L., 2004. Tannins elevate the level of poly(ADP-ribose) in HeLa cell extracts. *Arch Biochem Biophys.* **425** (1), 115-121.
- Knutson, M.D., 2007. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. *Nutr Rev.* **65** (7), 335-340.
- Langelier, M.F., Pascal, J.M., 2013. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr Opin Struct Biol.* **23** (1), 134-143.
- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M., 2012. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science* **336** (6082), 728-732.
- Lee, J., Petris, M.J., Thiele, D.J., 2002. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J Biol Chem.* **277** (43), 40253-40259.
- Lönnerdal, B., 2008. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *Am J Clin Nutr.* **88** (3), 846 S-850.
- Mesías, M., Seiquer, I., Navarro, M.P., 2012. Consumption of highly processed foods: Effects on bioavailability and status of zinc and copper in adolescents. *Food Res. Int.* **45** (1), 184-190.
- Morales, F.J., Somoza, V., Fogliano, V., 2012. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids* **42** (4), 1097-1109.
- Mossine, V.V., Mawhinney, T.P., 2007. Nalpha-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidine (D-Fructose-L-histidine): a potent copper chelator from tomato powder. *J Agric Food Chem.* **55** (25), 10373-10381.
- Nevitt, T., Ohrvik, H., Thiele, D.J., 2012. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta.* **1823** (9), 1580-1593.
- O'Brien, J., Morrissey, P.A., 1997. Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. *Food Chem.* **58** (1-2), 17-27.
- Oei, S.L., Keil, C., Ziegler, M., 2005. Poly(ADP-ribosylation) and genomic stability. *Biochem Cell Biol.* **83** (3), 263-269.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., Fleming, M.D., 2006. The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood* **108** (4), 1388-1394.
- Ortega-Castro, J., Adrover, M., Frau, J., Donoso, J., Muñoz, F., 2009. Cu<sup>2+</sup> complexes of some AGEs inhibitors. *Chem. Physics Letters* **475**, 277-284.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Plavsic, M., Cosovic, B., Lee, C., 2006. Copper complexing properties of melanoidins. *Science of the Total Environment* **366** (1), 310-319.
- Ruiz-Roca, B., Navarro, M.P., Seiquer, I., 2008. Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: Relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* **56** (19), 9056-9063.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., Schaffner, W., 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17** (15), 6419.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., de Murcia, G., 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7** (7), 517-528.
- Schwerdtle, T., Hamann, I., Jahnke, G., Walter, I., Richter, C., Parsons, J.L., Dianov, G.L., Hartwig, A., 2007. Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosylation) and PARP-1 activity. *Mol Nutr Food Res.* **51** (2), 201-210.
- SCOEL (The Scientific Committee on Occupational Exposure Limits), 2013. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Copper and its inorganic compounds. SCOEL/SUM/171.
- Seifert, S.T., Krause, R., Gloe, K., Henle, T., 2004. Metal complexation by the peptide-bound maillard reaction products N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-Carboxymethyllysine. *J Agric Food Chem.* **52** (8), 2347-2350.
- Trucco, C., Rolli, V., Oliver, F.J., Flatter, E., Masson, M., Dantzer, F., Niedergang, C., Dutrillaux, B., Ménessier-de Murcia, J., de Murcia, G., 1999. A dual approach in the study of poly(ADP-ribose) polymerase: in vitro random mutagenesis and generation of deficient mice. *Mol Cell Biochem.* **193** (1-2), 53-60.
- Turnlund, J.R., 1994. Copper. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* 8th Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Uriu-Adams, J.Y., Keen, C.L., 2005. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* **26**, 268-298.
- van den Berghe, P.V., Klomp, L.W., 2009. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr. Rev.* **67** (11), 658-672.
- Wang, H.Y., Qian, H., Yao, W.R., 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry* **128**, 573-584.
- Wapnir, R.A., 1998. Copper absorption and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **67** (5 Suppl), 1054S-1060S.
- Wijewickreme, A.N., Kitts, D.D., Durance, T.D., 1997. Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4577-4583.
- Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T., Nakazawa, H., 1997. Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4106-4109.
- Zimnicka, A.M., Ivy, K., Kaplan, J.H., 2011. Acquisition of dietary copper: a role for anion transporters in intestinal apical copper uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300** (3), C588-C599.