



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch
Kaffee und ausgewählte Inhaltsstoffe“

Verfasserin

Diplom Lebensmittelchemikerin Nadine Volz

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

Wien, 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 091 419
Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:	Chemie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

*„Ich werde jedenfalls nicht auf der faulen Haut liegen.
Ich bin nämlich ein Sachensucher und da hat man
niemals eine freie Stunde. [...] Die ganze Welt ist voll von Sachen,
und es ist wirklich nötig, dass jemand die findet.
Und das gerade, das tun die Sachensucher.“*

Pippi Langstrumpf

Für Christian, meine Eltern und Sarah

...die es mir ermöglichten, ein „Sachensucher“ zu werden

Prüfungskommission:

Prof. Dr. K.-H. Wagner (Vorsitz)

Prof. Dr. D. Marko

Prof. Dr. A. Gescher

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen Juli 2007 und Mai 2009 an der Universität Karlsruhe (TH), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie und wurde an der Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie im Oktober 2010 vollendet.

Ich danke Fr. Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des spannenden Themas und für ihr in mich und meine Arbeit gesetztes Vertrauen.

Des Weiteren danke ich den Gutachtern Hr. Prof. Dr. A. Gescher und Hr. Prof. Dr. K.-H. Wagner für die Übernahme der Beurteilung meiner Arbeit.

I. Inhalt

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen	3
2.2	Nrf2/ARE-Signalweg	5
2.3	Struktureller Aufbau von Nrf2 und Keap1	6
2.4	Interaktion von Nrf2 und Keap1	9
2.4.1	<i>Keap1 als Regulator des proteasomalen Abbaus von Nrf2</i>	10
2.4.2	<i>Das „hinge and latch“ Modell</i>	11
2.4.3	<i>Keap1 als nukleär-zytosolischer Transporter von Nrf2</i>	13
2.4.4	<i>Die direkte Beeinflussung von Keap1 und Nrf2 durch ARE-Aktivatoren</i>	15
2.5	„Crosstalk“ und Aktivierung über andere Signalwege	16
2.5.1	<i>Die mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)</i>	17
2.5.2	<i>Der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg</i>	17
2.5.3	<i>Proteinkinase C (PKC)</i>	18
2.5.4	<i>Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) –Signalweg</i>	19
2.6	Aktivatoren von Phase-II-Enzymen	20
2.7	Nrf2/ARE-regulierte Gene	23
2.7.1	<i>Glutathion-S-Transferasen (GSTs)</i>	23
2.7.2	<i>NAD(P)H-Chinonoxoreduktase 1 (NQO1)</i>	25
2.7.3	<i>Hämoxygenase 1 (HO1)</i>	26
2.7.4	<i>γ-Glutamylcysteinylgase (γ-GCL)</i>	27
2.7.5	<i>Glutathionperoxidase (GPx)</i>	28
2.7.6	<i>Glutathionreduktase (GSR)</i>	29
2.7.7	<i>Katalase</i>	31
2.7.8	<i>Superoxiddismutase 1 (SOD1)</i>	32
2.8	Polymorphismen in Nrf2 und Nrf2-abhängigen Genen	33
2.9	Kaffee	35
2.9.1	<i>Aufnahme und Bioverfügbarkeit ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe</i>	37
2.9.2	<i>Biologische Wirkung von Kaffee und ausgewählten Inhaltsstoffen</i>	43
2.9.3	<i>Die Studienkaffees CGA-Kaffee, NMP-Kaffee und Kaffee Brazil Blend</i>	49
2.10	Bildung von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	51

3	Problemstellung	52
4	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1	Zelluläre Wirkmechanismen von Kaffeeextrakten <i>in vitro</i>	54
4.1.1	Hemmung des Zellwachstums durch Kaffeeextrakte	55
4.1.2	Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies	58
4.1.3	Modulation der Nrf2-Kerntranslokation durch Kaffeeextrakte	63
4.1.4	Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch vorgeschaltete Signalelemente	70
4.1.5	Beeinflussung ARE-regulierter Gentranskripte durch Kaffeeextrakte	72
4.1.6	Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch Glucuronide der CGA <i>ex vivo</i>	81
4.1.7	Modulation der GST-Enzymaktivität durch Kaffeeextrakte und einzelne Kaffeeinhaltsstoffe	84
4.2	Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 durch Kaffee <i>in vivo</i>	89
4.2.1	Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray	90
4.2.2	Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 durch vierwöchigen Konsum von Kaffee Brazil Blend	94
4.3	Modulation ausgewählter Phase-II-Enzyme durch einzelne und miteinander kombinierte Kaffeeinhaltsstoffe	105
4.3.1	Hemmung des Zellwachstums durch Trigonellin	105
4.3.2	Modulation der Nrf2-Kerntranslokation durch Trigonellin	106
4.3.3	Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch Trigonellin	109
4.3.4	Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch Koinkubation verschiedener Kaffeeinhaltsstoffe	111
4.3.5	Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch Kaffeeinhaltsstoffe in konsumrelevanten Konzentrationen	115
4.3.6	Modulation der GST-Enzymaktivität durch Kaffeeinhaltsstoffe in konsumrelevanten Konzentrationen	124
4.4	Gesamtdiskussion der Ergebnisse	128
5	Zusammenfassung	146
6	Material und Methoden	150
6.1	Zellkultur	150
6.1.1	Verwendete Zelllinie	150
6.1.2	Medienwechsel bei Monolayerkulturen	150
6.1.3	Passagieren von Monolayerkulturen	150
6.1.4	Lagerung von Zellen	152
6.1.5	Auftauen von Zellen	152

6.1.6	<i>Zellzahlbestimmung</i>	153
6.1.7	<i>Mykoplasmascreening</i>	154
6.2	Untersuchungen zur Wachstumshemmung (SRB-Assay)	155
6.3	Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung	156
6.4	Glutathion-S-Transferase (GST)-Enzymaktivität	157
6.4.1	<i>Zellaufarbeitung</i>	158
6.4.2	<i>Substratumsatzung</i>	158
6.5	Untersuchung der Nrf2 Kerntranslokation	159
6.5.1	<i>Zellinkubation</i>	160
6.5.2	<i>Gewinnung der Zellproteine</i>	160
6.5.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	161
6.5.4	<i>SDS Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	162
6.5.5	<i>Western Blot</i>	165
6.5.6	<i>Detektion mittels spezifischer Antikörper</i>	167
6.6	Bestimmung des intrazellulären ROS-Gehaltes	169
6.7	Untersuchungen zur Gentranskription	170
6.7.1	<i>Zellinkubation von HT29-Zellen</i>	170
6.7.2	<i>Zellinkubation und Isolierung von peripheren Blutlymphozyten</i>	171
6.7.3	<i>Isolierung der RNA</i>	172
6.7.4	<i>Überprüfung der RNA Integrität mit dem Agilent 6000 Pico Assay</i>	174
6.7.5	<i>Reverse Transkription</i>	175
6.7.6	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	176
6.7.7	<i>Human Toxicology and Drug Resistance Mikroarray</i>	179
6.8	Materialverzeichnis	184
6.9	Geräteliste	189
7	Literatur	192
8	Anhangsverzeichnis	221

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

AhR	“Aryl hydrocarbon“-Rezeptor
AH109A	Ratten-Leberhepatomzellen
AP	“activating protein”
ARE	“antioxidant responsive element”
AREc32	Humane Lungenzellen
AS	Aminosäure(n)
BA	Blutabnahme
BB	Brazil Blend
BHA	Butylhydroxyanisol
BTB	“Broad complex, tram track, brick’a’brack”
bZIP	basischer Leucin-Zipper
Caco-2	Humane Kolonkarzinomzelle
CAPE	Kaffeesäurephenethylester
CBP	“CREB-binding protein”
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
CGA	<i>n</i> -Chlorogensäure
CHX	Cycloheximid
CNC	“Cap’n’collar”
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CREB	“cAMP response element-binding protein”
CTR	C-terminale Region
Cul	Cullin-Protein

CYP	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase
Cys	Cystein
CHX	Cyclohexemidin
D3T	1,2-dithiole-3-thion
DCF	Dichlorofluorescein
DGR	“Double glycine repeat”
DMEM	“Dulbecco’s modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Ubiquitin-aktivierende Enzyme
E2	Ubiquitin-konjugierende Enzyme
E3	Ubiquitinligase
EC CGR8	Mausembryonale Stammzellen
EH	Epoxidhydrolase
eIF2	“Eukaryotic translation initiation factor 2”
EpRE	“electrophil responsive element”
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EST	Esterase
FKS	Fetales Kälberserum
g-GCL	γ -Glutamylcysteinylase
GDP	Guanosindiphosphat
GF109203X	Spezifischer Hemmstoff der PKC
GM-7373	Bovine Aortaendothelzellen
GPx	Glutathionperoxidase

GSSG	Glutathion Disulfid
GSH	Gutathion
GSR	Glutathionreduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H4IIE	Rattenhepatomzellen
HAEC	Humane Aortenendothelzellen
HCT 116	Humanen Kolonkarzinomzellen
Hepalclc7	Maus-Hepatomzellen
HepG2	Humane Leberkarzinomzellen
HT29	Humane Kolonkarzinomzellen
HO1	Hämoxygenase 1
iAs	Anorganisches Arsen
INrf2	“Inhibitor of Nrf2“
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IVR	“Intervening region”
JB6	Mausepithelzellen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Kontrolle
KE	Kaffeeextrakt
Keap1	“Kelch-like ECH-associated protein 1”
KYSE70	Humane Speiseröhrenepithelkarzinomzellen
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LMB	Leptomycin B

LZ	Leucin Zipper
LY294002	Spezifischer Hemmstoff der PI3K
M	Menadion
Maf	“Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma protein”
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCF	Embryofibroblastenzellen
MTPT	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MW	Mittelwert
NAC	<i>n</i> -Acetylcystein
Neh	Nrf2-ECH-homology region
NES	“Nuclear exporting signal“
NLS	„Nuclear localisation signal“
NIH3T3	Mausembryofibroblastenzellen
NF-E2	“Nuclear factor erythroid 2”
NMP	<i>N</i> -Methylpyridinium
NQO1	NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase 1
Nrf2	“Nuclear factor E2-related factor 2”
NTR	Hoch homologe Domäne in der N-terminale Region
8-OH-dG	8-Hydroxydeoxyguanosin
OGTT	Oralen-Glukose-Toleranz-Test
ORAC	“oxygen radical absorbance capacity in microemulsion”
P	Phosphat
PB98059	Spezifischer Hemmstoff der MAPK/ERK
PBLs	Periphere Blutlymphozyten

PBS	„Phosphate buffered saline“
PC12	Phäochromozytomzellen
PD98059	Spezifischer Hemmstoff der MAPK/ERK
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMC	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POZ	“Pox virus and zinc finger”
RA	Reduktase
RAW624.7	Maus-Makrophagenzellen
Raf	Serin/Threoninkinase
Ro320432	Spezifischer Hemstoff der PKC
RT	Raumtemperatur
Ras	„Rat sarcoma“
RNA	Ribonukleinsäuren
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rtPCR	Real Time Polymerase Kettenreaktion
S	Schwefel
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
-SH	Sulfhydrylgruppen
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen
SK-N-SH	Humane Neuroblastomzellen

SNP	„Single Nucleotide Polymorphisms“
SOD	Superoxiddismutase
SRB	Sulforhodamin B
TAC	Totale antioxidative Kapazität
TBH	<i>tert</i> Butylhydroperoxid
<i>t</i> BHQ	<i>tert</i> Butylhydrochinon
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
1,2,4 THB	1,2,4 Trihydroxybenzol
Tm	Trockenmasse
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol-13- acetat
Tyr	Tyrosin
UBQ	Ubiquitin
UC	Colitis Ulcerosa
UGT	UDP-Glucuronyltransferasen
XRE	“Xenobiotic Response Element”

1 Einleitung

Im Jahr 2009 konsumierte jeder Bundesbürger in Deutschland 150 Liter Kaffee, was einem Pro-Kopf-Verbrauch von 6,4 kg Rohkaffee entspricht. Mit einem Verbrauch von mehr als 400 Milliarden Tassen pro Jahr zählt Kaffee damit zu den beliebtesten Getränken weltweit [Deutscher Kaffeeverband, 2010; Illy, 2002], was neben dem wohlschmeckenden Aroma vor allem auf seine belebende Wirkung zurückzuführen ist. Aus wissenschaftlicher Perspektive ist insbesondere der Einfluss von Kaffee auf die menschliche Gesundheit von Interesse. Intensive Forschungen der letzten Jahre konnten Hinweise für ein breites Spektrum an gesundheitsfördernden Wirkungen von Kaffee liefern. Eine Reihe epidemiologischer Studien stellten einen erhöhten Schutz gegenüber Kolon und Leberkrebs durch den Konsum von Kaffee fest [Larsson and Wolk, 2007; La Vecchia, 2005; Tavani und La Vecchia, 2004; Giovannucci, 1998]. Als zugrundeliegender chemopräventiver Wirkmechanismus wird das antioxidative Potential von Kaffee diskutiert, wobei die Aktivierung des enzymatischen, körpereigenen Abwehrsystemes eine maßgebliche Rolle zu spielen scheint. Verschiedene Humanstudien konnten eine Induktion der Gentranskription sowie die Steigerung der Enzymaktivität von Phase-II-Enzymen durch Kaffeekonsum beobachten [Bichler et al., 2007; Steinkellner et al., 2005]. An der Induktion der Gentranskription von Phase-II-Enzymen kann, als regulatorisches Schlüsselement, der Transkriptionsfaktor Nrf2 (erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2) beteiligt sein. Nach Aktivierung transloziert Nrf2 in den Zellkern, bindet dort an ARE (antioxidant responsive element) in der Promotorregion entsprechender Gene von Phase-II-Enzymen, wodurch deren Transkription eingeleitet werden kann [Itoh et al., 1997]. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen durch Kaffee mit einer Aktivierung von Nrf2 einher zu gehen scheint [Dissertation Böttler, 2009; Cavin et al., 2008]. Möglicherweise stellt der Nrf2/ARE-Signalweg und die dadurch induzierte Gentranskription verschiedener Phase-II-Enzyme einen zentralen Wirkmechanismus von Kaffee gegenüber oxidativen Einflüssen dar.

Um den zugrundeliegenden Vorgang der gesundheitsfördernden Wirkung von Kaffee zu verstehen, ist die Kenntnis der daran beteiligten Kaffeeinhaltsstoffe von elementarer Bedeutung. Aktuelle Untersuchungen konnten ein antioxidatives Potential, durch Erhöhung wichtiger Phase-II-Enzyme, der beiden Kaffeeinhaltsstoffe *n*-Chlorogensäure (CGA) und *N*-Methylpyridinium (NMP) erkennen lassen [Böttler et al., 2010], wohingegen die Abschätzung

einer möglichen gesundheitsfördernden, bioaktiven Wirkung des Kaffeebestandteiles Trigonellin in der Literatur einer kontroversen Diskussion unterliegt und infolgedessen einer intensiveren Untersuchung bedarf. Eine weitgehend offene Fragestellung ist ferner, inwieweit synergistische, antagonistische oder additive Effekte, durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Inhaltsstoffe, an der Wirkung von Kaffee beteiligt sind.

Im Mittelpunkt dieser Dissertation stand die Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch Kaffee und ausgewählten Inhaltsstoffen um deren Beitrag als chemopräventives Lebensmittel, im Sinne einer Steigerung der enzymatischen Abwehr, besser beurteilen zu können. Die Arbeit entstand im Rahmen des BMBF geförderten Projekt "Coffee prevention: Identifizierung, Prüfung und Optimierung der gesundheitsfördernden Eigenschaften von Kaffee" mit der BMBF Fördernummer 0313843.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen

Im aeroben Organismus stellt die Entstehung von ROS (reaktiven Sauerstoffspezies) ein ständig ablaufender Prozess dar, welcher mit elementaren physiologischen Vorgängen wie Signalübertragung, bakterielle Abwehr durch Entzündungsreaktionen oder zelluläre Atmung einhergeht. Sauerstoff welcher zur Energiegewinnung in den Mitochondrien aufgenommen wird, unterliegt der Reduktion zu Wasser, wobei als intermediäres Zwischenprodukt das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), Hydrogenperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$) sowie in weiteren Abläufen Singulett-Sauerstoff (1O_2) oder Peroxylradikale ($ROO^{\cdot}$) entstehen können [Sies et al., 1997]. Neben den endogenen tragen ebenso exogene Faktoren wie UV-Strahlung, Luftverschmutzung oder Industriechemikalien zur Generierung von ROS bei. Sauerstoffradikale zeichnen sich, wie alle Radikale, durch ein oder mehrere ungepaarte, freie Elektronen auf einzelnen Orbitalen aus, die durch den Übergang in den gepaarten Zustand in einen niedrigeren Energiezustand überführt werden. Aufgrund dessen tritt eine hohe chemische Reaktivität zu Tage, die sich an den geringen Halbwertszeiten der Sauerstoffradikale abbildet (z.B. Halbwertszeit Hydroxylradikal: 10^{-9} sek.) [Evants und Halliwell, 1999; Sies und Stahl, 1995]. Tritt ein gestörtes Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen auf in der Form, dass mehr ROS produziert als abgebaut werden, entsteht sogenannter oxidativer Stress [Sies et al., 1997]. Durch oxidativen Stress können Basen der DNA angegriffen werden. Beispielsweise ist das Hydroxylradikal bekannt, mit nahezu allen Bestandteilen der DNA wie beispielsweise den Purin/Pyrimidin-Basen zu reagieren [Beckman et al., 1997]. Diese dadurch entstehenden oxidativen DNA-Schäden stellen einer der ersten Schritte der Mutagenese, Kanzerogenese und des Alterungsprozesses dar [Dizdaroglu et al., 2002; Marnett et al., 2000]. Eine Vielzahl von Proteinen können durch oxidativen Stress geschädigt werden darunter Strukturproteine, fremdstoffmetabolisierende und detoxifizierende Enzyme als auch Proteine die in die Signalgebung und Genexpression eingreifen [Marnett et al., 2003]. Lipide stellen eine weitere wichtige Substanzklasse dar, die durch oxidativen Stress modifiziert werden können. Sauerstoffradikale sind in der Lage mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Zellmembran zu oxidieren, wodurch Lipid-Peroxide entstehen, die in der Zellmembran akkumulieren und somit zu einer Destabilisierung führen

können [Evants und Halliwell, 1999]. Oxidativer Stress wird mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter arteriosklerotische Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes mellitus, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Krebs [Sies 1993 und 1997]. Im Organismus ist den oxidativen Angriffen jedoch ein antioxidativer Schutzmechanismus entgegengestellt. Dieser besteht zum einen aus nicht-enzymatischen Antioxidantien darunter Vitamin C und E, Carotinoide, Thiole wie Glutathion, Thioredoxin und Liponsäure ebenso Polyphenole wie Flavonoide [McCall et al., 1999]. Der zweite Teil der Abwehr stellen antioxidativ und detoxifizierend wirkende Enzyme dar, die als Phase-I und Phase-II-Enzyme bezeichnet werden. Ihre Aufgabe ist es im Fremdstoffmetabolismus, der sogenannten Biotransformation, in zwei Phasen endogene und exogene lipophile Substanzen in besser wasserlösliche und damit leichter ausscheidbare Verbindungen umzuwandeln. Die Phase-I-Enzyme, deren wichtige Vertreter Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) darstellen, führen durch Oxidations-, Reduktions- und/oder Hydrolysereaktionen funktionelle Gruppen in Xenobiotika ein, weshalb ihre Reaktionen auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet werden. Phase-II-Enzyme konjugieren die funktionellen Gruppen mit Liganden wie Glutathion, Sulfat, Aminosäuren oder Glukuronsäure wodurch weniger reaktive Moleküle entstehen können. Diese Reaktionen werden deshalb auch als Entgiftungsreaktionen bezeichnet [Williams, 1967]. Wichtige Vertreter der Phase-II-Enzyme sind beispielsweise GSTs (Glutathion-S-Transferasen), HO1 (Hämoxygenase 1) oder NQO1 (NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase 1). Durch DNA-Sequenzuntersuchungen in der Promotorregion verschiedener Phase-II-Gene konnte die Existenz verschiedener funktioneller Elemente („cis-acting element“) gezeigt werden, darunter XRE („xenobiotic response element“), TPA („12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate response element“) sowie ARE („antioxidant responsive element“), auch als EpRE („elektrophil responsive element“) bekannt [Rushmore et al., 1991 und 1990; Denison et al., 1988]. Viele Studien unterstützen die Annahme, dass an der Induktion von Phase-II-Enzymen dem ARE eine besondere Bedeutung zukommt [Holtzclaw et al., 2004]. Reguliert werden kann die Induktion der Expression ARE-tragender Gene mithilfe des Transkriptionsfaktors Nrf2 (erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2), der an ARE bindet und dadurch die Gentranskription von Phase-II-Enzymen auslösen kann [Itoh et al., 1997]. Der Nrf2/ARE-Signalweg stellt einen essentiellen Abwehrmechanismus dar, indem oxidativer Stress durch die Induktion antioxidativ und detoxifizierend wirkender Enzyme minimiert werden kann.

2.2 Nrf2/ARE-Signalweg

Anhand Gensequenzuntersuchungen in der Promotorregion der Phase-II-Enzyme GSTY α und NQO1 an Ratten konnte ein funktioneller Bereich ausgemacht werden, der in seiner Kernsequenz als GTGACA***GC definiert ist und als ARE bezeichnet wird. Weiterhin machte die Entdeckung des ARE deutlich, dass dieser gemeinsam mit einem DNA-bindenden Protein einen Signalweg bildet, der als Sensor auf oxidativen Stress reagieren kann [Rushmore et al., 1991]. Seit diesen ersten, elementaren Entdeckungen sind eine Vielzahl an Phase-II-Enzymen identifiziert geworden, welche ein ARE besitzen und über dies in ihrer Genexpression stimuliert werden können [Jaiswal, 2004]. Intensive Forschungen auf diesem Gebiet zeigten weiterhin, dass an der Induktion der Genexpression ARE-abhängiger antioxidativer Enzyme der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine Schlüsselrolle einnimmt. An Studien mit *nrf2*^(-/-) „Knock out“-Mäusen konnte ein verminderter Status antioxidativer Enzyme sowie eine geringe Widerstandsfähigkeit gegenüber Karzinogenen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden [Fahey et al., 2002; Ramoz-Gomez et al., 2001; Itoh et al., 1997]. Im inaktiven Zustand ist Nrf2 im Zytoplasma mit aktungebundenem Keap1 („Kelch-like ECH-associated protein 1“) assoziiert (Abbildung 1). Keap1 hält Nrf2 im Zytosol zurück und ist für dessen proteasomalen Abbau verantwortlich. Eine Aktivierung des Signalweges führt zur Translokation von Nrf2 und dessen Akkumulation im Zellkern. Nrf2 heterodimerisiert dort mit Molekülen aus der Familie der Maf („Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma“) Proteine. Es wurde vermutet, dass Nrf2 auch mit anderen bZip Transkriptionsfaktoren, wie ATF4, Heterodimere ausbildet, allerdings zeigten Studien mit *maf*^(-/-) „Knock out“-Mäusen einen Verlust ihrer Fähigkeit ARE abhängige Gene zu induzieren und waren anfälliger für oxidativen Stress [Blank, 2008; Katsuoka et al., 2005; He et al., 2001; Venugopal und Jaiswal, 1998 und 1996]. Demnach kann vermutet werden, dass Maf Proteine die hauptsächlichen Dimerisierungspartner von Nrf2 darstellen. Der Nrf2/Maf-Komplex, der teilweise noch mit weiteren transkriptionalen Coaktivatoren komplementiert wird, bindet an ARE und löst somit die Transkription ARE-abhängiger Gene aus [Lin et al., 2006; Itoh et al., 1999; Itoh et al., 1997]. Interessanterweise ist die Induktion des Nrf2/ARE-Signalweges nicht nur auf das Einwirken von oxidativem Stress zurückzuführen. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe, wie sie in Gemüse, Tee oder Kaffee enthalten sind, zur einer Nrf2-abhängigen Induktion von Phase-II-Enzymen fähig sind [McMahon et al., 2004; Keum et al., 2004; Chen et al., 2000].

Zusammenfassend zeigt sich, dass die drei Kernkomponenten ARE, Nrf2 und Keap1 einen Signalweg bilden, der einen wirkungsvollen Abwehrmechanismus gegenüber oxidative Einflüsse darstellt und über die Aktivierung mithilfe natürlicher Lebensmittelinhaltsstoffe einen möglichen Beitrag zur Chemoprävention leisten kann [Kensler et al., 2007; Jeong et al., 2006].

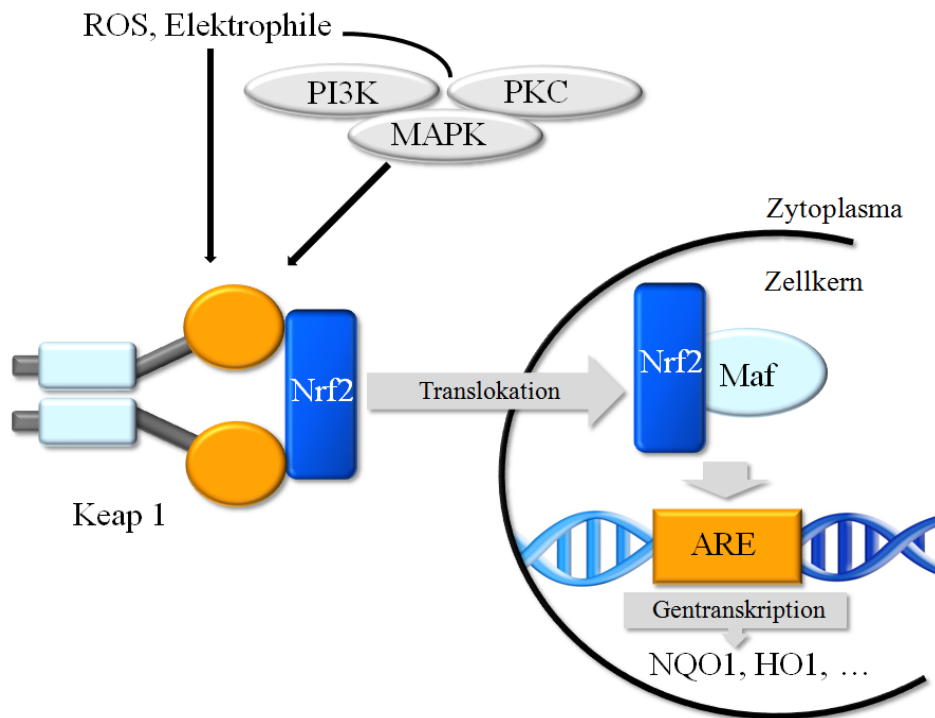


Abbildung 1: Der Nrf2/ARE-Signalweg [modifiziert nach Holtzclaw et al., 2004]. ARE: antioxidant responsive element; HO1: Hämoxygenase 1; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; Nrf2: erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2; NQO1: NAD(P)H-Chinonoxoreduktase 1; Maf: Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma protein; MAPK: mitogen aktivierte Proteinkinasen; PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase; PKC: Proteinkinase C.

2.3 Struktureller Aufbau von Nrf2 und Keap1

Nrf2 (erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2) ist eine 66,9 kDa schwerer Transkriptionsfaktor, der in fast allen Zellen und Geweben exprimiert wird. Gemeinsam mit NF-E2 (nuclear factor-erythroid 2), Nrf1 und Nrf3 zählt Nrf2 zu der Familie der sogenannten Cap'n' collar (CNC) basic leucine zipper (b-Zip) denen ein CNC-Motiv gemein ist und die Heterodimere mit Proteinen wie kleinen Mafs ausbilden können [Mohler et al., 1995]. Humanes Nrf2 besteht aus 605 Aminosäuren welche in sechs Abschnitte, Neh1-6, unterteilt werden kann, wobei sich diese in ihren Funktionen und Merkmalen unterscheiden (Tabelle 1, Abbildung 2).

Tabelle 1: Abschnitte von Nrf2 und dessen Funktionen und Merkmalen

Abschnitt	Funktion/Merkmal	Quelle
Neh1	Beinhaltet ein b-Zip Motiv und ist sowohl für die Dimerisierung mit kleinen Maf Proteinen, als auch Bindung an die DNA als obligates Heterodimer verantwortlich.	[Motohashi et al.,2002].
Neh2	N-terminale Region und Interaktionsstelle mit Keap1.	[Itoh et al., 1999]
Neh3	C-terminale Region. An dieser Stelle ist Nrf2 mit dem Transkriptionsapparat assoziiert sowie eine Bindungsstelle für CHD6 (chromodomain helicase DNA-bindung protein 6).	[Nioi et a., 2005]
Neh4/Neh5	Transaktivierungsdomänen welche mit CREB Bindungsproteinen interagieren kann.	[Katoh et al., 2001]
Neh6	Verantwortlich für proteasomalen Abbau.	[McMahon et al., 2004]

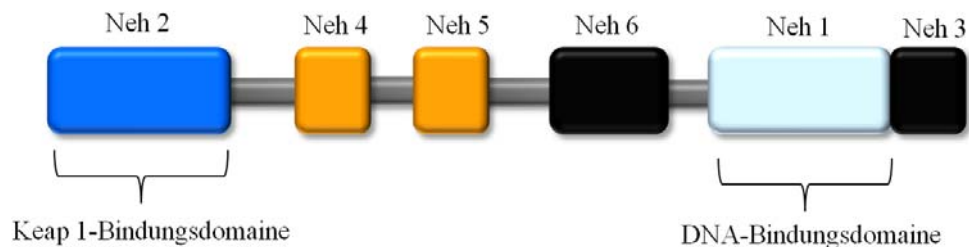


Abbildung 2: Struktureller Aufbau von Nrf2 [modifizierte nach Heyes and McMahon, 2009].

Keap1 („Kelch-like ECH-associated protein 1“) ist strukturell verwandt mit einem *Drosophila* Protein Kelch und besitzt ein Molekulargewicht von 69,5 kDA. Keap1 stellt einen zytosolischen Inhibitor von Nrf2 da, weshalb er auch als „INrf2“ bezeichnet wird. Keap1 hat die Funktion Nrf2 im Zytosol zurückzuhalten sowie für dessen proteasomalen Abbau zu sorgen. Ebenso wie Nrf2, kann das 624 Aminosäuren lange Protein in fünf Regionen unterteilt werden (Tabelle 2, Abbildung 3). Keap1 bildet über die BTB Region ein Homodimer aus, was als Voraussetzung für die Bindung von Nrf2 gilt [Zipper und Mulcahy, 2002]. Humanes Keap1 enthält 27 Cysteinreste, wobei etwa bei der Hälfte eine hohe Reaktivität vermutet wird. Diese Entdeckung unterstützt die Vermutung, dass Keap1 als intrazellulärer Redoxsensor fungiert, da die reaktiven Cysteinreste mit Elektrophilen Addukte bilden können oder leicht zu oxidieren sind [Snyder et al., 1981].

Tabelle 2: Abschnitte von Keap1 und dessen Funktionen und Merkmalen

Abschnitt	Funktion/Merkmal	Quelle
NTR	N-terminale Region mit den ersten 60 Aminosäuren.	[Motohashi et al., 2002].
BTB	Braod-complex, Tramtrack, Bric-à-brac (BTB) Domäne, welche für Bindung mit Proteinen wie Cul3 benötigt werden als auch für die Dimerisierung von zwei Keap1 Proteinen.	[Zipper and Mulcahy, 2002]
IVR	Cysteinreiche „intervening region“ (IVR) welche eine wichtige Rolle in der Unterdrückungsfunktion des Proteins spielt.	[Wakabayashi et al., 2004]
DGR/Kelch Domäne	„Double glycine repeat“ (DGR) oder auch Kelch-wiederholende Domäne. Besteht aus sechs sich wiederholenden Kelch-Motiven die dem Protein die β -Propeller Struktur verleiht. Bindungsstelle der Neh2 Region von Nrf2 und des Aktinzytoskelettes.	[Adams et al., 2000]
CTR	C-Terminale Region.	[Holtzclaw et al., 2004]

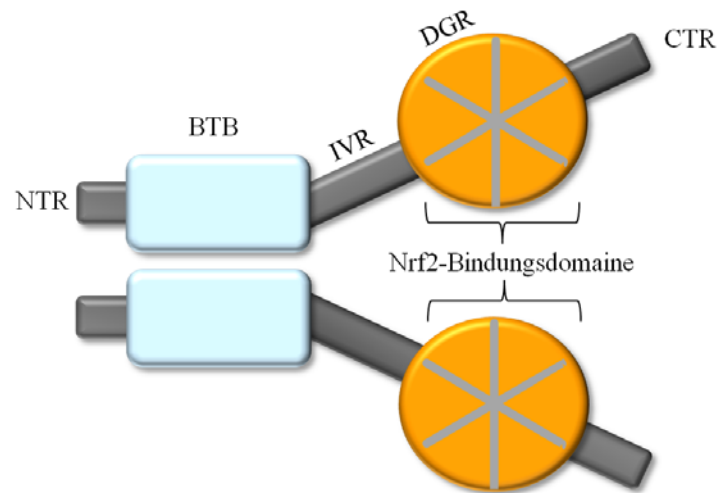


Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Keap1 [modifiziert nach Holtzclaw et al., 2004]. BTB: Braod-complex, Tramtrack, Bric-à-brac Domäne; CTR: C-Terminale Region; DGR: Double glycine repeat Domäne; IVR: “intervening region”; NTR: N-Terminale Region.

2.4 Interaktion von Nrf2 und Keap1

Der Nrf2/ARE-Signalweg wird maßgeblich durch die Interaktion von Nrf2 und Keap1 bestimmt, wobei Keap1 die Aufgabe hat die Aktivität von Nrf2 zu regulieren [Kobayashi et al., 2004; Itoh et al., 2003; McMahon et al., 2003; Stewart et al., 2003; Zhang et al., 2003; Sekhar et al., 2002]. Bestätigt werden kann dies durch Untersuchungen an *keap1*^(-/-) „Knock out“-Mäusen, die einen konstitutiv aktiven Nrf2 Stimulus im Zellkern zeigten [Wakabayashi et al., 2003]. Zudem fungiert Keap1 als Sensormolekül indem es von Aktivatoren des Signalweges, wie etwa oxidativem Stress, direkt moduliert werden kann und nachfolgend den entsprechenden Stimulus an Nrf2 weiterleitet [Itoh et al., 2003]. Das genaue Zusammenspiel zwischen Nrf2 und Keap1 unterliegt einer kontroversen Diskussion, wobei klar zu sein scheint, dass Keap1 unter Abwesenheit von Aktivatoren des Signalweges die Translokation von Nrf2 in den Zellkern supprimiert und dessen Sequestrierung im Zytoplasma begünstigt. Weiterhin ausreichend bestätigt ist eine Beteiligung von Keap1 beim proteasomalen Abbau von Nrf2. Studien dokumentieren, dass durch oxidative Einflüsse dieser Abbau gehemmt werden kann und somit eine Akkumulation in den Zellkern eingeleitet wird [Kobayashi et al., 2006]. Weiterführend wird im „hinge and latch“ Modell beschrieben, welche Regionen innerhalb von Nrf2 und Keap1 unter Einfluss von Aktivatoren des Signalweges miteinander agieren um eine vermehrte Nrf2-Kerntranslokation zu bewirken. Kontrovers hierzu wird in verschiedenen Untersuchungen vermutet, dass Keap1 für Nrf2 einen Transporter zwischen

Zytoplasma und Zellkern darstellt und bei einer Aktivierung des Signalweges der nukleäre Export vermindert und so eine Akkumulation im Zellkern herbeigeführt wird [Velichkova und Hasson, 2005].

2.4.1 *Keap1 als Regulator des proteasomalen Abbaus von Nrf2*

Der proteasomale Proteinabbau spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von biologischen Vorgängen wie Signaltransduktion oder Transkription [Pickart et al., 2001; Hershko et al., 1998]. Nrf2 ist mit einer Halbwertszeit von etwa 15 min ein relativ instabiles Protein, wobei die Zelle mit dessen raschen, proteasomalen Abbau eine unnötig dauernde Expression von Nrf2 Zielgenen verhindert [Itoh et al., 2003; McMahon et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Stewart et al., 2003]. Dem Abbau über ein 26S Proteasom ist eine Ubiquitinierung vorausgesetzt, die von den drei wichtigen Enzymen, den Ubiquitin-aktivierenden Enzymen (E1), den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) sowie den Ubiquitinligasen (E3) begleitet wird. E3 Ligasen erkennen spezifisch Substratproteine und katalysieren deren Übertragung von Ubiquitin. Ein Subtyp von E3 Ligasen stellen Cullin (Cul) Proteine dar. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Keap1 ein Adapter für Cullin E3 Ligasen (Cul3) darstellt. Nrf2 wird demnach ohne aktivierende Einflüsse über einen Keap1-Cul3 Komplex im Zytoplasma sequestriert und dem ubiquitinabhängigen proteasomalen Abbau zugeführt (Abbildung 4) [Furukawa et al., 2005; Cullin et al., 2004; Kobayashi et al., 2004; Zhang et al., 2004]. Es häufen sich Veröffentlichungen, die davon berichtet wird, dass die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges mit einer Hemmung des proteasomalen Abbaus von Nrf2 einhergeht und aufgrund dessen Nrf2 in den Zellkern transloziert. Nach diesem Modell löst oxidativer Stress eine Modifikation von Cysteinresten in Keap1 aus, wodurch eine Konformationsänderung im Keap1-Cul3 Komplex bewirkt wird. Darauf folgt eine Hemmung der Konjugation von Nrf2 mit Ubiquitin und damit auch dessen proteasomaler Abbau [Kobayashi et al., 2006]. Egger et al. (2005) gehen weiterhin davon aus, dass unter oxidativem Stress eine Umlagerung der Ubiquitinierung von Nrf2 auf Keap1 stattfindet und Nrf2 aufgrund dessen nicht mehr für den Abbau markiert werden kann.

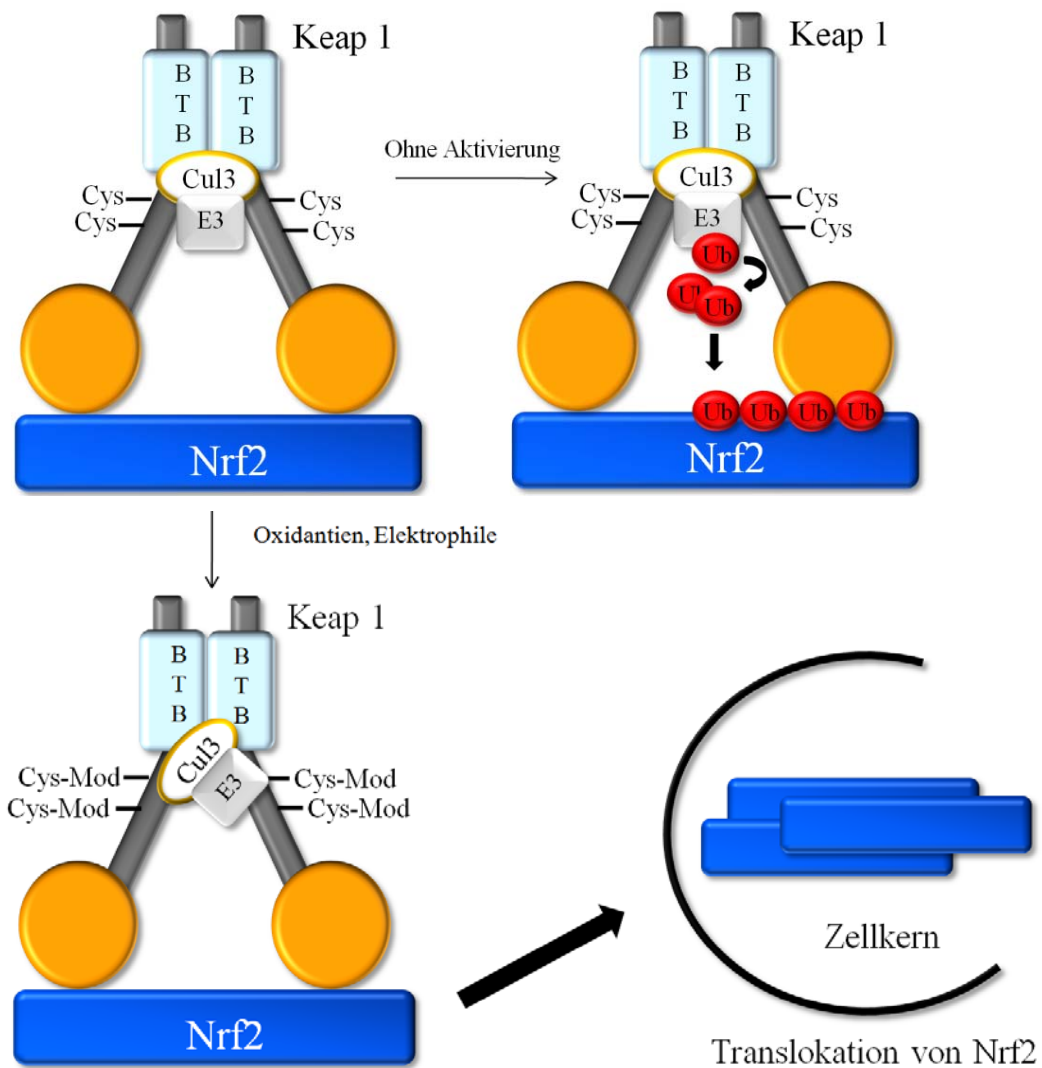


Abbildung 4: Regulation des proteasomalen Abbaus von Nrf2 durch den Keap1-Cul3 Komplex [modifiziert nach Kobayashi et al., 2006]. BTB: Braod-complex, Tramtrack, Bric-à-brac (BTB) Domäne; Cul3: Cullin 3; Cys: Cystein; E3: Ubiquitin-konjugierende Enzyme ;Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; Mod: modifizierte Cysteinreste; Nrf2: erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2; Ub: Ubiquitin.

2.4.2 Das „hinge and latch“ Modell

Die Hemmung des proteasomalen Abbaus von Nrf2 als regulatorisches Element in der Interaktion von Keap1 und Nrf2 kann durch des „hinge and latch“ Model genauer erklärt werden. In Abwesenheit von oxidativem Stress oder Nrf2 Aktivatoren ist ein Nrf2 Molekül durch das Keap1 Homodimer gebunden. Die DGR-Regionen von Keap1 sind hierbei assoziiert mit dem DLG- und ETGE-Motiv innerhalb der Neh2 Region von Nrf2. Die Bindung mit dem ETGE-Motiv führt zu einem einhängen „hinge“ von Nrf2, welchem somit relativ viel Bewegungsraum zur Verfügung steht. Gleichzeitig beinhaltet die Bindung zum

DLG-Motiv ein einrasten „latch“, wodurch Nrf2 an dieser Stelle fest mit Keap1 assoziiert ist und dadurch die optimale Position für eine Konjugation mit Ubiquitin einnimmt (Abbildung 5, A) [McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a]. Interessanterweise ist die Bindungsaffinität zwischen DLG und Keap1 [$K(\text{DTG}) = 10^6 \text{M}^{-1}$] geringer im Vergleich zur Bindungsaffinität des ETGE-Motives zu Keap1 [$K(\text{ETGE}) = 10^8 \text{M}^{-1}$]. Unter Bedingungen wie oxidativem Stress wird die schwächere DLG-Keap1 Bindung gestört und somit auch die für die Degeneration von Nrf2 benötigte Ubiquitinierung [He et al., 2006; Kobayashi et al., 2006; Zang et al., 2004]. Es wird vermutet, dass sich das DLG komplett von Keap1 ablöst, wodurch einzig die Bindung zwischen ETGE und Keap1 bestehen bleibt (Abbildung 5, B) [Tong et al., 2006b]. Diskutiert wird an dieser Stelle, ob eine Ablösen von Nrf2 aus dem Komplex mit Keap1 stattfindet und dieses freie Nrf2 in den Zellkern transloziert [Itoh et al., 2006; Bloom und Jaiswal, 2003]. Einige Studien gehen kontrovers hierzu davon aus, dass als Resultat des verminderten proteosomalen Abbaus Keap1 mit Nrf2 gesättigt ist, dieser Komplex jedoch nicht vollständig gelöst wird und Nrf2 aus einem *de novo* synthetisierten Pool für eine Translokation sowie Akkumulation im Zellkern verantwortlich ist [Kobayashi et al., 2006; Eggler et al., 2005; Zhang et al., 2004]. Untersuchungen mit Embryofibroblastenzellen (MCF) der Maus, inkubiert mit ROS-generierendem *tert*-Butylhydrochinon (tBHQ) sowie mit und ohne Zusatz des Proteinsyntheseinhibitors CHX (Cyclohexemidin) konnten hierzu bestätigend zeigen, dass eine Nrf2 Akkumulation im Zellkern nur in Abwesenheit von CHX detektiert werden konnte und demnach eine Nrf2 *de novo* Synthese für dessen Anreicherung im Zellkern vermutet werden kann [Kobayashi et al., 2006].

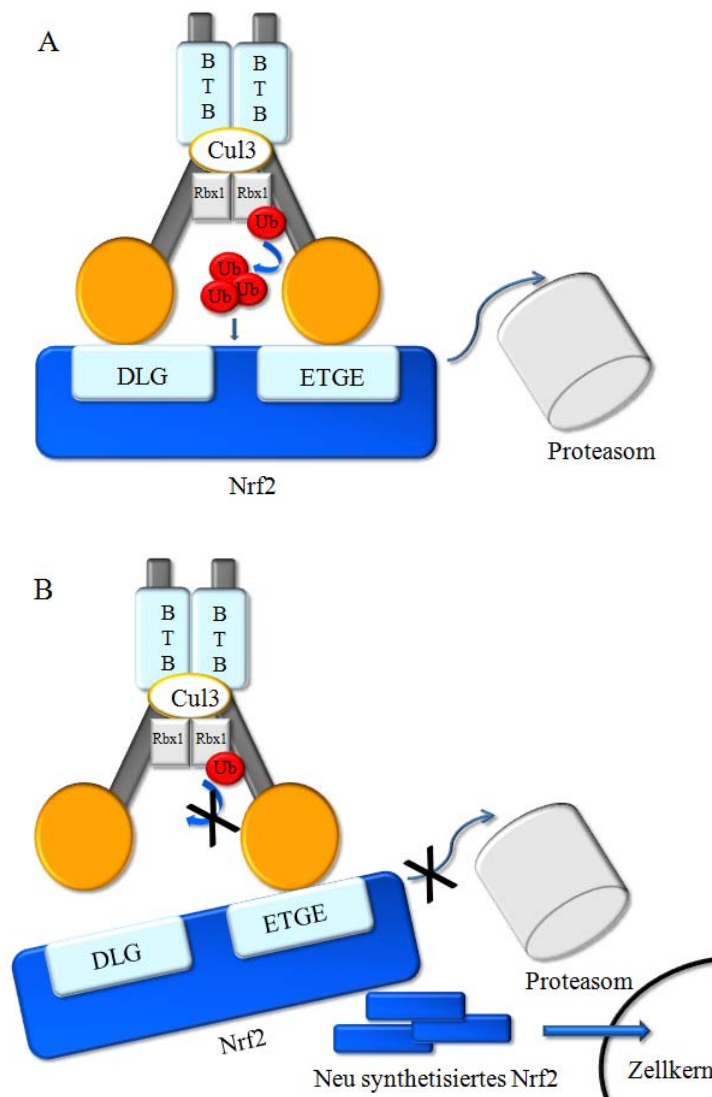


Abbildung 5: Schematischer Überblick über die Nrf2-Keap1 Interaktion nach dem „hinge and latch“ Modell [modifiziert nach Copple et al., 2008]. A: in Abwesenheit von oxidativem Stress und Aktivatoren des Nrf2/ARE-Signalweges. B: nach Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges. BTB: Broad-complex, Tramtrack, Bric-à-brac (BTB) Domäne; Cul3: Cullin 3; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; Nrf2: erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2; Ub: Ubiquitin.

2.4.3 Keap1 als nukleär-zytosolischer Transporter von Nrf2

Viele Studien beschreiben Keap1 als Regulator der Nrf2 Aktivität, wobei er Nrf2 im Zytoplasma am aktinassozierten Zytoskelett zurückhält. Velichkova und Hasson (2005) stellen hierzu eine kontroverse Theorie auf in der sie davon ausgehen, dass Keap1 Nrf2 nicht sequestriert, sondern Nrf2 mit Hilfe eines oxidations-sensitiven Crm1/Exportin-Transporters aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert (Abbildung 6). Basiert ist dieses Model auf der Entdeckung eines NES („nuclear export signal“) in der IVR Domäne von Keap1 [Karapetian

et al., 2005; Velichkova und Hasson, 2005]. NES wurde bei Proteinen identifiziert, die durch Crm1/Exportin aus dem Zellkern exportiert werden [Fabbro et al., 2003]. Ein Zusammenhang mit Crm1/Exportin zeigt der Einsatz von LMB (Leptomycin B), einem Hemmstoff der an Crm1/Exportin bindet und so eine Assoziation mit NES tragenden Proteinen verhindert. Als Konsequenz kommt es zur Akkumulation von NES tragenden Proteinen im Zellkern und ein Export ins Zytoplasma wird unterbunden [Kudo et al., 1999]. Eine Behandlung von Fibroblasten (NIH3T3) mit 3 nM LMB für 3 h zeigte eine Umverteilung von Keap1 und dessen NES Sequenz vom Zytoplasma in den Zellkern [Velichkova und Hasson, 2005; Nguyen et al., 2005]. Weiterhin konnte eine NLS („nuclear localizing signal“) in der Neh1 Domäne in Nrf2 identifiziert werden, das nach Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges zur Akkumulation von Nrf2 in den Zellkern führt. Es wird spekuliert, dass Keap1 und Nrf2 in einem Komplex interagieren, der zwischen Zytoplasma und Zellkern als eine Art Transporter transloziert. Unter basalen Bedingungen dominiert das NES von Keap1, wodurch der Keap1/Nrf2 Komplex im Zytoplasma lokalisiert bleibt und Nrf2 einem ubiquitinabhängigen Abbau zugeführt werden kann (Abbildung 6, A). Durch oxidativen Stress oder weitere Aktivatoren des Nrf2/ARE-Signalweges scheint der nukleäre Export-Signalweg durch Crm1/Exportin blockiert zu sein und Nrf2 sowie Keap1 akkumulieren im Zellkern (Abbildung 6, B). Es wird weiterhin vermutet, dass durch eine weitere Modifikation an Nrf2, möglicherweise durch Phosphorylierungsreaktionen, die endgültige Aktivierung von Nrf2 herbeigeführt und so die Transkription ARE-abhängiger Gene induziert wird. Die Theorie nach der Keap1 in den Zellkern translozieren kann, wird ebenso in Arbeiten von Nguyen et al. (2005) beschrieben. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Nrf2 konstitutiv im Zytosol exprimiert wird und nach Translokation in den Zellkern zur basalen, also nicht induzierten Gentranskription führt. Der ubiquitinabhängige Abbau von Nrf2 findet nach dieser Theorie durch Keap1 im Zellkern statt, was einen nukleären Transport von Keap1 voraussetzt. Bei Zellen unter gestressten Bedingungen wird Nrf2 stabilisiert, indem zum einen der Keap1 eingeleitete Abbau im Zellkern behindert und zum anderen eine gestärkte *de novo* Synthese von Nrf2 eingeleitet wird. Allerdings ist die These von einem nukleären Transport von Keap1 umstritten. In mehreren Studien zeigte die Behandlung von endogenem Keap1 mit Elektrophilen und LMB keine erhöhten Gehalte von Keap1 in Zellkern, sondern eine Lokalisation im Zytoplasma [Tong et al., 2006b; Watai et al., 2007].

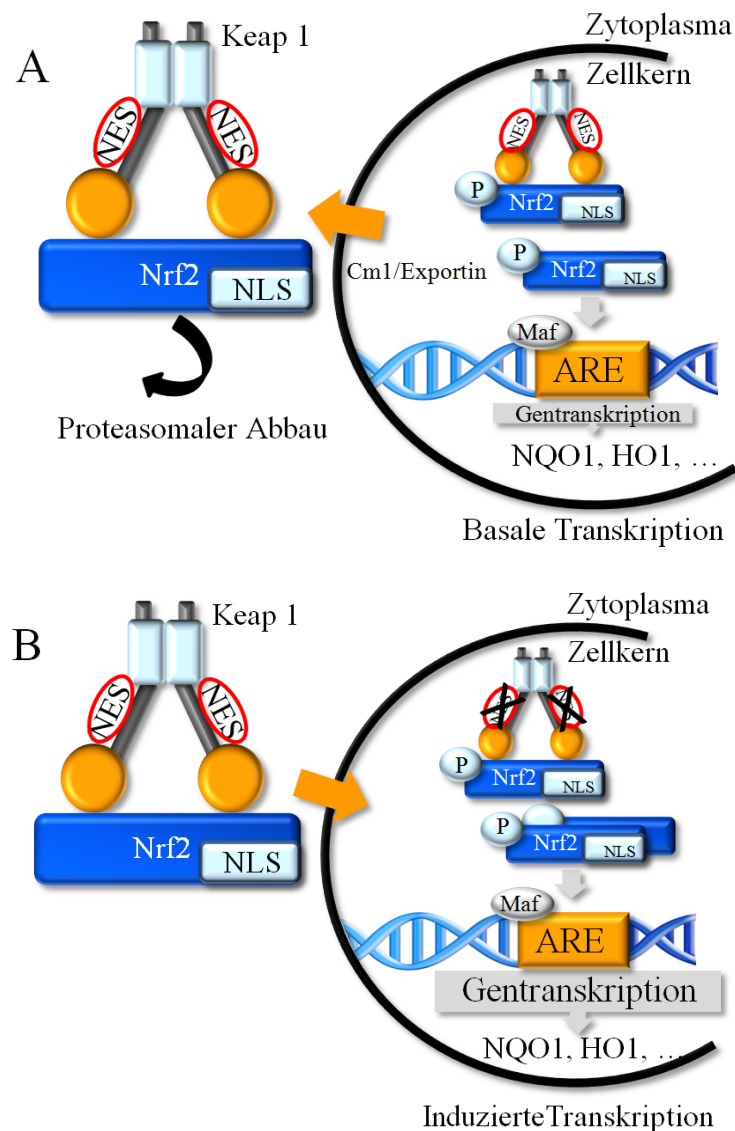


Abbildung 6: Keap1 als nukleär-zytosolischer Transporter für Nrf2 [modifiziert nach Velichkova und Hasson, 2005]. A: ohne Aktivierung des Signalweges tritt nur ein kleiner Anteil des Nrf2/Keap1 Komplexes in den Zellkern um die Transkription des basalen Gehalt an ARE-regulierten Genen auszulösen. B: Aktivierung des Signalweges wodurch der Nrf2/Keap1 Komplex vermehrt in den Zellkern transloziert.

2.4.4 Die direkte Beeinflussung von Keap1 und Nrf2 durch ARE-Aktivatoren

Intensive Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich bei Aktivatoren von Nrf2 meist um Elektrophile handelt, welche mit nukleophilen Gruppen, höchst wahrscheinlich Sulfhydrylgruppen (-SH), als Bestandteil eines intrazellulären Sensors reagieren können. Keap1 enthält 27 Cysteinreste, wovon die meisten in der IVR Region von Keap1 lokalisiert

sind. Luciferase Reporteranalysen ließen beobachten, dass mutiertes Keap1, mit einer fehlerhaften IVR Region, die Fähigkeit verliert, die Aktivität von Nrf2 zu unterdrücken [Kang et al., 2004]. Als direkte Angriffspunkte von Elektrophilen werden hierbei insbesondere die drei Cysteinreste Cys-151, Cys-273 und Cys-288 von Keap1 diskutiert. Cys-273 und Cys-288 sind in der IVR Region von Keap1 lokalisiert und dort mitverantwortlich für die unterdrückende Rolle von Keap1 unter basalen Bedingungen [Kobayashi et al., 2006; Levonen et al., 2004; Wakabayashi et al., 2004; Zhang und Hannink, 2003]. Cys-151, das in der BTB Domains von Keap1 vorkommt, wird vermutlich durch oxidativen Stress modifiziert, wodurch Keap1 seine unterdrückenden Funktion gegenüber Nrf2 verliert [Zhang et al., 2004; Zhang und Hannink, 2003]. Als zweiter, sich möglicherweise überlappender Mechanismus, der eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges bewirken kann, wird die Phosphorylierung von Nrf2 diskutiert. Untersuchungen mit Phosphataseinhibitoren, die zu einer Hyperphosphorylierung führen, konnten demonstrieren, dass dadurch eine Akkumulation von Nrf2 in den Zellkern sowie eine ARE-Reportergen Aktivierung initiiert wird [Nguyen et al., 2003; Cohen et al., 1990]. Des Weiteren zeigte sich, dass Kinasen als Elemente vorgeschalteter Signalkaskaden zur Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges über Phosphorylierung von Nrf2 beitragen können [Kang et al., 2002; Huang et al., 2000; Yu et al., 1997]. Zwei unabhängige Studien beobachteten hierbei, dass die Phosphorylierung an Serin-40 in Nrf2 stattfindet und dadurch die Translokation von Nrf2 in den Zellkern ausgelöst werden kann [Bloom und Jaiswal, 2003; Huang et al., 2002].

2.5 „Crosstalk“ und Aktivierung über andere Signalwege

Die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges folgt einem komplexen, zum Teil noch nicht vollständig geklärten Ablauf und eine Vielzahl von Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen isolierten Prozess handelt, sondern sowohl vorgeschaltete Kinasesignalwege als auch einige Transkriptionsfaktoren involviert sind [Yang et al., 2005; Kang et al., 2002; Huang et al., 2000; Yu et al., 1997]. Im folgenden Abschnitt sind einige, wichtige Überschneidungspunkte mit dem Nrf2/ARE-Signalweg dargestellt.

2.5.1 Die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) stellen einen der wichtigsten Signalwege dar, der über Proteinphosphorylierungen entlang einer Kaskade extrazelluläre Signale in den Zellkern weiterleiten kann. Drei MAP Kinase Signalwege sind bekannt, die „extracellular-signal-regulated kinase (ERK), die c-jun N-terminal kinase (JNK) und die p38 MAPK. Alle drei Signalwege bestehen aus drei Kinasemodulen, welche hintereinander geschaltet über Phosphorylierungsreaktionen aktiviert werden können [Hanks et al., 1995]. Während ERK mitogen, das heißt durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann, unterliegen JNK und p38 MAPK einem Stress-aktivierbaren Mechanismus. Seit Entdeckung des Nrf2 Signalweges am Ende des letzten Jahrhunderts ist eine Verknüpfung mit der MAPK-Signalkaskade bekannt. Arbeiten von Yu et al. (1999) konnten zeigen, dass die Inkubation von HepG2 Zellen mit tBHQ und Sulforaphan, zwei bekannte Aktivatoren von Phase-II-Enzymen über den Nrf2/ARE-Signalweg, zu einer Stimulation von ERK2 führt. Darauf aufbauend ließ der Zusatz von 20 µM und 50 µM mit PB98059, einem spezifischen Hemmstoff der MAPK/ERK Kinase, keine Aktivierung von ERK durch Sulforaphan beobachten. Infolgedessen wurde postuliert, dass ERK2 zu einer Aktivierung des ARE beitragen kann. Unterstützend hierzu zeigte der Einsatz von ERK Hemmstoffen eine Hemmung der Akkumulation von Nrf2, der Bindung von Nrf2 an ARE sowie eine verminderte Induzierbarkeit der Phase-II-Enzyme wie NQO1 oder HO1 [Lin et al., 2010; Manandhar et al., 2007]. Viele Veröffentlichungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Induktion der MAPK Signalkaskade über ERK zur Aktivierung von Nrf2 und ARE führen kann [Lin et al., 2010; Lim et al., 2007; Manandhar et al., 2007; Keum et al., 2006; Yu et al., 1999].

2.5.2 Der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg

Ein Schlüsselement des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweges ist die Proteinkinase B, auch Akt genannt. Durch Bindung von Phospholipiden transloziert Akt vom Zytoplasma an die Zellmembran und kann dort durch Phosphorylierung aktiviert werden. Im aktiven Zustand phosphoryliert Akt seinerseits eine Reihe von Substraten, welche an der Regulation der Apoptose, Differenzierung und Proliferation, Angiogenese sowie Migration beteiligt sind [Kang et al., 2000; Daulhac et al., 1999]. Immunblotuntersuchungen mit der Rattenhepatomzellenlinie (H4IIE) zeigten, dass nach 6 h Inkubation mit tBHQ ein Anstieg an nukleärem Nrf2 zu detektieren ist und die Proteinexpression des Phase-II-Enzymes GSTA2

induziert wird. Wortmannin kann eine irreversible Hemmung der PI3K verursachen, indem sein Furanring mit dem primären Amin eines Lysinrestes in unmittelbarer Nachbarschaft zur katalytischen Domäne der PI3K einen kovalenten Komplex bildet [Walker et al., 2000; Wymann et al., 1996]. Der Zusatz von Wortmannin unterdrückte sowohl die Translokation von Nrf2 in den Zellkern sowie die Induktion der GSTA2 [Kang et al., 2000]. Martin et al. (2004) konnten ebenso zeigen, dass das Diterpen Carnisol aus Rosmarin die Bindung von Nrf2 an ARE erhöht sowie den Nrf2 abhängigen Promotor von HO1 in Mäusen aktivieren kann. Bei der Fragestellung, welche Signalwege an der durch Carnisol verursachten Induktion der HO1 beteiligt sind, konnte beobachtet werden, dass neben ERK, p38 und JNK vor allem der PI3K Signalweg eine Rolle zu spielen scheint. Bestätigt werden kann dies durch Studien mit Isoorientin, einem Inhaltsstoff in Bambusblättern, der eine potente Induktion von phosphoryliertem Akt nach 60 min in HepG2 Zellen zeigte. Die ARE-Luciferaseaktivität wurde bei diesem Versuchsansatz erhöht, wohingegen unter Beteiligung von Wortmannin eine Verminderung zu beobachten war [Lim et al., 2007]. Zusammenfassend ließ sich durch mehrere Studien eine Beteiligung des PI3K-Signalweges an der Aktivierung von Nrf2 vermuten.

2.5.3 *Proteinkinase C (PKC)*

Neben dem MAPK und PI3K Signalweg scheint weiterhin die Proteinkinase C (PKC) eine direkte Verknüpfung zu Nrf2 zu besitzen. Die Inkubation mit tBHQ sowie Phorbol-12-myristat-13-acetat, einem bekannten Aktivator der PKC, zeigte eine vermehrte Akkumulation von Nrf2 im Zellkern. Die selektiven Hemmstoffe der PKC, Staurosporine und Ro320432, unterdrückten hingegen diesen Effekt. In weiteren Studien wurde beobachtet, dass die PKC Nrf2 an Serin-40 phosphoryliert und Mutationen an dieser Aminosäure eine Bindung von Nrf2 an ARE beeinträchtigen. Es wird vermutet, dass die PKC durch Phosphorylierung an Nrf2 einen kritischen Schritt im ARE-abhängigen antioxidativen Abwehrmechanismus darstellt [Huang et al., 2002; Huang et al., 2000]. Eine weitere Studie belegte einen Zusammenhang zwischen phosphorylierter PKC und einer Nrf2 abhängigen Induktion der HO1 [Kweon et al., 2006]. Eine aktuelle Veröffentlichung konnte beobachten, dass die Isoform PKC- δ für die Phosphorylierung an Serin-40 von Nrf2 verantwortlich ist und diese Phosphorylierung beim Lösen des Nrf2/ Keap1 Komplex eine Rolle zu spielen scheint [Niture et al., 2009].

2.5.4 *Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) –Signalweg*

Nrf2 und der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) sind zwei Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von Enzymen des xenobiotischen Metabolismus beteiligt sein können. Der AhR-Signalweg besteht aus dem im Zytosol lokalisierten AhR, der bei Aktivierung unter Abspaltung von Hsp90, p23 und XAP2 mit den Kerntranslokator (Arnt) Protein heterodimerisiert und an eine spezifische DNA-Sequenz, dem so genannten „xenobiotic response element“ (XRE), bindet. Dadurch wird die Translokation von Phase-I-Enzymen wie beispielsweise Cyp1A1 induziert [Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003]. Einige Gene enthalten in ihrer Promotorregion sowohl ein XRE als auch ein ARE, wobei beide voneinander unabhängig agieren [Kensler et al., 2007]. Unterschiedliche Studien gehen allerdings davon aus, dass es eine direkte Verbindung zwischen dem AhR und Nrf2 gibt. Ma et al. (2004) untersuchten AhR-, Arnt und Nrf2-defiziente Zellen mit der Beobachtung, dass NQO1 zum einen durch den AhR Aktivator 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) sowie zum anderen durch den Nrf2 Aktivator tBHQ induziert werden kann. Weiterhin zeigte sich, dass tBHQ unabhängig vom AhR NQO1 induzieren kann, wohingegen TCDD zur Induktion von NQO1 sowohl AhR, Arnt als auch Nrf2 benötigte. Ebenso wurde beschrieben, dass AhR selbst Nrf2 regulieren kann. Studien von Miao et al. (2005) zeigten eine direkte Bindung von AhR in der Promotorregion von Nrf2. Weiterhin ließ sich beobachten, dass eine Stilllegung der AhR Expression durch siRNA die Induktion der Nrf2 mRNA durch TCDD verhindert. Es wurde daraufhin postuliert, dass Nrf2 und ARE Nachfolgeelemente des AhR-Signalweges sein könnten. Vasiliou et al. (1995) konnten beobachten, dass der AhR als Transkriptionsfaktor an XRE und möglicherweise auch an ARE bindet. Es könnte sich folglich andeuten, dass ein Transkriptionsfaktor zwei „cis-acting“ regulierende Elemente aktivieren kann. Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass in humanen Leberzellkarzinomzellen (HepG2), Speiseröhrenepithelkarzinomzellen (KYSE70) sowie Kolonkarzinomzellen (Caco-2) nach Inkubation mit Kaffee, in einer Konzentration von 12% im Zellkulturmedium, die mRNA des Phase-II-Enzymes UDP Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 erhöht, unter Beteiligung einer Erhöhung des AhR sowie Nrf2-Proteingehaltes. Es wurde daraufhin postuliert, dass die Modulation der UGT1A1 durch Kaffee unter dem AhR/XRE als auch dem Nr2/ARE Signalweg abzulaufen scheint [Kalthoff et al., 2010]. Zusammenfassend zeigen die Daten aus der Literatur, dass die zwei Signalwege AhR/XRE

und Nrf2/ARE eine gemeinsame Verbindung zu besitzen scheinen, was jedoch weiteren Untersuchungen bedarf.

2.6 Aktivatoren von Phase-II-Enzymen

Substanzen die Phase-II-Enzyme über den Nrf2/ARE-Signalweg aktivieren, können freie Radikale wie ROS sein bzw. Substanzen, die ROS generieren, als auch exogene oder endogene Elektrophile [Kensler et al., 2010]. Viele natürliche, in Lebensmitteln vorkommende, Antioxidantien erlangen ihre chemopräventive Wirkung durch die Induktion von Phase-II-Enzymen. Eine Beteiligung des Nrf2/ARE-Signalweges scheint hierbei denkbar, da der chemische Aufbau von vielen Lebensmittelinhaltsstoffen Funktionseinheiten von Phase-II-Induktoren beinhaltet. Substanzen, die Phase-II-Enzyme über ARE aktivieren können, lassen sich in zwei Klassen eingeteilt, monofunktionalen und bifunktionalen Aktivatoren. Monofunktionale Aktivatoren aktivieren Phase-II-Enzyme auf direktem Weg über ARE. Bifunktionale Aktivatoren induzieren in einem ersten Schritt Phase-I-Enzyme über den AhR-Signalweg. Der erhöhte Gehalt an Phase-I-Enzymen katalysiert in einem folgenden Schritt die Umwandlung der bifunktionalen Aktivatoren zu Metaboliten, die den monofunktionalen Aktivatoren ähneln und so indirekt über ARE Phase-II-Enzyme induzieren [Prochaska and Talalay, 1988]. In Tabelle 3 sind monofunktionale Aktivatoren von Phase-II-Enzymen, unterteilt in ihre chemischen Substanzklassen, dargestellt. Eine erste systematische Einteilung der Phase-II-Aktivatoren konnte vorgenommen werden, nachdem Untersuchungen zeigten, dass Michael-reaktive Akzeptoren Phase-II-Enzyme induzieren können [Talalay et al., 1988; Prochaska et al., 1985]. Zu Michael-reaktiven Akzeptoren zählen α,β ungesättigte Carbonylverbindungen (Michael Akzeptoren), die mit einer elektronenziehenden Gruppe konjugiert sind, wie Aldehyde, Ketone oder Ester und an die in einer Addition Nukleophile (Michael Donoren) wie Thiole angreifen. Einen elektrophilen Charakter sowie den chemischen Aufbau eines Michael-reaktiven Akzeptors besitzen die phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe Curcumin und Kaffeesäurephenylester (CAPE), bei denen eine Induktion des Phase-II-Enzymes HO1 über den Nrf2/ARE-Signalweg beschrieben wurde [Balogum et al., 2003].

Tabelle 3: Chemische Klassen von monofunktionalen Phase-II-Aktivatoren [modifiziert nach Prestera et al., 1993 a,b]

Chemische Klasse	Beispiele
Oxidierbare Diphenole, Phenylendiamine, Chinone	
Michael-Reaktion-Akzeptoren	 Z = NO ₂ > COAr > CHO > COCH ₃ > CO ₂ CH ₃
Isothiocyanate	
Thiocarbamate	
Trivalente Arsenverbindungen	
1,2-Dithiol-3-thione	
Hydroperoxide	
Vicinale Dimercaptane	
Schwermetalle	Hg > Cd > Zn
Polyene	

In der Gruppe der Isothiocyanate stellt Sulforaphan (Tabelle 3), ein Inhaltsstoff von Kreuzblütengewächsen, einen der bekanntesten Induktoren der Phase-II-Enzyme dar [Thimmulappa et al., 2002]. Zahlreiche Studien zeigen bei Sulforaphan eine Induktion von Phase-II-Enzymen in Abhängigkeit von Nrf2 und dem ARE [Jeong et al., 2005; Kim et al., 2003; Zhang et al., 2003; Yu et al., 1999]. Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Strukturaufklärung von Phase-II-Aktivatoren lieferten Untersuchungen mit Butylhydroxyanisol (BHA), einem Antioxidans, das Lebensmitteln zugesetzt wird. BHA kann im Organismus durch Demethylierung zu tBHQ umgesetzt werden. Studien mit tBHQ und dessen Analogen, in denen die Orientierung der diphenolischen Gruppe geändert wurde von 1,4-Diphenol zum 1,2- oder 1,3-Diphenol, konnten eine klare strukturelle Voraussetzung für die Induktoren beobachten. Nur die 1,2-Diphenole (Catechole) und 1,4-Diphenole (Hydrochinone) zeigten eine Aktivierung von Phase-II-Enzymen, nicht aber die 1,3-Diphenole.

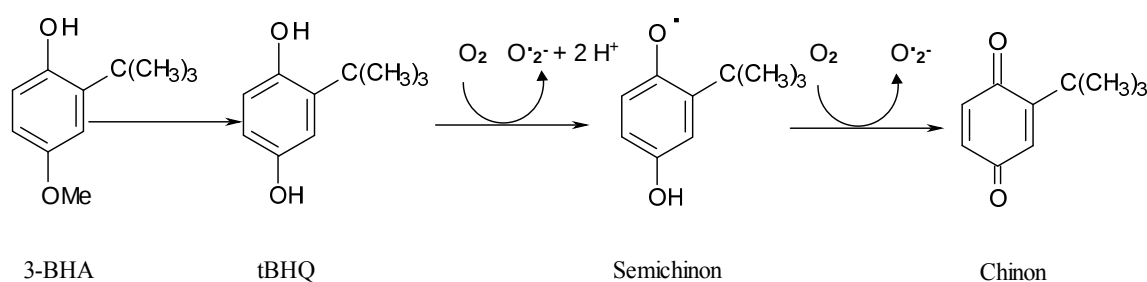


Abbildung 7: Mechanismus der Aktivierung des Nrf2 Signalweges über tBHQ [modifiziert nach Prochaska et al., 1985] BHA: Butylhydroxyanisol; tBHQ: tertiär- Butylhydrochinon.

Das Resultat zeigt deutlich, dass das Substitutionsmuster wichtig ist, um aus dem Diphenol in einem weiteren Schritt ein Chinon zu bilden, was bei dem 1,3-Diphenol nicht möglich ist. Diese Oxidation vom 1,2- bzw. 1,4-Diphenol zum Chinon läuft unter der Generierung von ROS ab, welche direkt mit dem Nrf2/ARE-Signalweg interagieren können (Abbildung 7) [Talalay et al., 1995]. Eine gemeinsame Eigenschaft, die alle monofunktionalen Phase-II-Aktivatoren aufweisen, ist ihre chemische Reaktivität sowie ihr Reaktionsvermögen mit Thiol/Disulfidgruppen durch Alkylierung, Oxidation, Reduktion oder Thiolinteraktion [Dinkova-Kostova et al., 2002]. Diese Feststellung bekräftigt die Annahme, dass an der Induktion von Phase-II-Enzymen ein intrazellulärer Sensor wie Keap1 beteiligt zu sein

scheint, der hochreaktive Cysteinreste trägt, über die eine Interaktion mit den Aktivatoren von Phase-II-Enzymen stattfinden kann.

2.7 Nrf2/ARE-regulierte Gene

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Gene, die eine Aktivierung über den Nrf2/ARE-Signalweg erfahren können, werden im Folgenden näher erläutert. Einen schematischen Überblick hinsichtlich ihrer Interaktion untereinander ist in Abbildung 8 dargestellt.

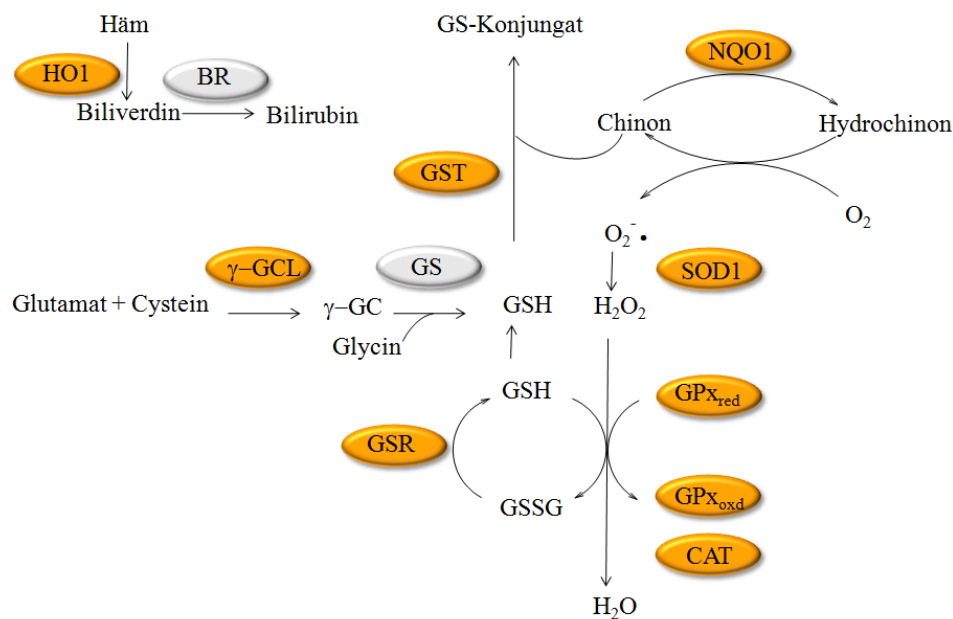


Abbildung 8: Interaktion antioxidativer und Nrf2/ARE regulierter Gene [modifiziert nach Kensler et al., 2007]. BR: Bilirubinreduktase; CAT: Katalase; γGCL: γ-Glutamylcysteinyligase; GS: Glutathionsynthetase; GST: Glutathion-S-Transferase; GPx: Glutathionperoxidase; GSH: Glutathion (reduziert); GSSG: Glutathion (oxidiert); HO1: Hämoxygenase 1; NQO1: NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase 1; SOD1: Superoxiddismutase.

2.7.1 Glutathion-S-Transferasen (GSTs)

Die humanen Glutathion-S-Transferasen (GSTs) werden in die drei Hauptfamilien zytosolische GSTs, mitochondriale GSTs und mikrosomale GSTs eingeteilt. Die zytosolischen GSTs sind alle Dimere, die Untereinheiten mit 199-244 Aminosäuren besitzen. Abhängig von ihrer Aminosäuresequenzhomologie können die zytosolischen GST in sieben Klassen unterteilt werden: Alpha (A), Mu (M), Pi (P), Sigma (S), Theta (T), Omega (O) und Zeta (Z) [Sheechan et al., 2001; Hayes et al., 1999 und 1995; Armstrong et al., 1997]. Jede

Klasse besitzt eine verschiedene Anzahl an Untereinheiten, die sich in ihrem Vorkommen sowie in ihrer Substratspezifität unterscheiden können. Beispielsweise ist die GST Klasse A aus GSTA1 bis GSTA5 zusammengesetzt, wobei GSTA1 bis A3 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die GSTA4 eine sehr geringe Expression und das GSTA5 Protein ist nahezu undetektierbar [Hayes et al., 2005]. Die GSTs sind involviert in elementare, zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose oder Fremdstoffresistenzen [Okcu et al., 2004; Cho et al., 2001]. Eine besondere Rolle spielen GSTs im Phase-II-Metabolismus indem sie den nukleophilen Angriff von reduziertem Glutathion (GSH) auf unpolare Verbindungen mit elektrophilen Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatomen katalysieren. Zu den Substraten der GSTs zählen halogenierte Nitrobenzole, Arenoxide, Chinone und α,β -ungesättigte Carbonyle, wie sie in endogenen Metaboliten oder Xenobiotika auftreten können [Sheechn et al., 2001; Hayes et al., 1999 und 1995; Chen et al., 1998, Armstrong et al., 1997, Keen et al., 1978]. Als Resultat dieser Konjugationsreaktion entstehen in der Regel Verbindungen, welche besser wasserlöslich sind und ausgeschieden werden können (Abbildung 9) [Chen et al., 1998].



Abbildung 9: Katalysierte Reaktion der GST am Beispiel von Acrolein [modifiziert nach Hayes et al., 2005]
GSH: reduziertes Glutathion.

Die GSTs zählen zu den ersten Phase-II-Enzymen bei denen eine Induktion durch den Nrf2/ARE-Signalweg detektiert werden konnte. Itoh et al. (1997) detektierten eine signifikante Verminderung der BHA-induzierbaren Expression von GSTs in *nrf2*^(-/-) „Knock out“-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Ebenso konnte anhand Gensequenzuntersuchungen an Ratte und Maus ein ARE in der Promotorregion von GSTA1 identifiziert werden [Rushmore et al., 1991]. In einer jüngeren Studie wurde ein ARE in der humanen GSTA2 nachgewiesen [Thimmulappa et al., 2002]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Nrf2/ARE-Signalweg bei der Regulation der Expression von GSTs mitverantwortlich zu sein scheint.

2.7.2 NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase 1 (NQO1)

Die NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase (NQO) 1 hat ein Molekulargewicht von 60 kDa wobei zwei Monomere mit je 274 Aminosäuren ein Homodimer ausbilden. NQO1 wird ubiquitär in nahezu allen Geweben exprimiert und obwohl es eine große Anzahl an zytosolischen NQOs gibt, zählt die NQO1 zu den am besten untersuchten Enzymen. Die NQO1 ist ein Flavoprotein, das Zweielektronenreduktionen an Chinonen katalysiert (Abbildung 10).

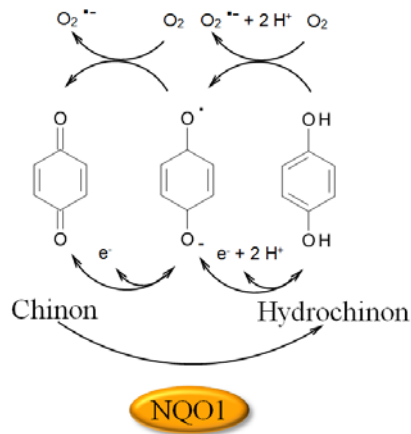


Abbildung 10: Katalysierte Reaktion der NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase (NQO1).

Durch diese Detoxifizierungsreaktion wird die Freisetzung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies unterbunden und die Zelle vor Angriffen von Chinonen und deren Derivaten geschützt [Joseph et al., 1994; Lind et al., 1982]. Ein Fehlen der NQO1 Genexpression bei Mäusen demonstriert eine erhöhte Anfälligkeit Benzo(a)pyren-induzierte Tumore der Haut und intestinalen Organen zu entwickeln, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [Jaiswal, 2000]. Die NQO1 zählt neben den GSTs zu den ersten Enzymen bei denen ein Zusammenhang zwischen der Induktion der Genexpression und dem Nrf2/ARE-Signalweg entdeckt wurde. Die Induzierbarkeit der Genexpression der NQO1 durch BHA sinkt signifikant bei *nrf2*^(-/-) „Knock out“-Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die Nrf2 besitzen [Itoh et al., 1997]. In weiterführenden Studien konnte berichtet werden, dass Nrf2 an ARE humaner NQO1 binden kann [Venugopal und Jaiswal, 1996]. Neuere Veröffentlichungen bestätigen eine Beteiligung des Nrf2/ARE-Signalweges an der Expression der NQO1 [Dinkova-Kostova und Talalay, 2010]. Obwohl seit der Entdeckung der NQO1 schon 50 Jahre vergangen sind, scheint das breite Wirkspektrum der NQO1 noch nicht vollständig geklärt und so zeigen neue Studien eine Wirkung der NQO1, die sich unabhängig von der katalytischen Aktivität

abspielt. Asher et al. (2001) berichten von einem verminderten Abbau des Tumorsuppressorgenes p53 in humanen Kolonkarzinomzellen (HCT-116) mithilfe der NQO1, das p53 durch Bindung zu stabilisieren scheint. Dieser Effekt blieb in Anwesenheit des NQO1 Inhibitors Dicumarol aus.

2.7.3 Hämoxygenase 1 (HO1)

Menschen besitzen zwei Isoenzyme der Hämoxygenase (HO), HO1 (32 kDa) und HO2 (36 kDa). Während HO2 konstitutiv exprimiert wird und keiner Induktion unterliegt, kann HO1 als Antwort auf oxidativen Stress ubiquitär in der Expression aktiviert werden [Li et al., 2009; Wilks et al., 2002]. HO1 ist ein Schlüsselenzym im sogenannten Häm/HO-1 System. Häm ist ein Protoporphyrin-IX-Ring, der im Zentrum ein Fe^{2+} trägt und in seiner freien Form über die Fentonreaktion aus H_2O_2 hochreaktive Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$) bilden kann. Unter homöostatischen Bedingungen wird dieser pro-oxidative Effekt durch Hämproteine kontrolliert. Unter oxidativem Stress kann Häm als prosthetische Gruppe der Hämproteine freigesetzt werden und dadurch freie Radikale generieren. Um dies zu vermeiden katalysiert die HO1 die detoxifizierende Reaktion unter der der Protoporphyrin-IX-Ring- Fe^{2+} -Komplex oxidativ abgebaut wird, unter Entstehung von Biliverdin, Eisen und CO. Biliverdin kann im nachfolgenden Schritt zu Bilirubin mittels der Bilirubinreduktase umgewandelt werden kann (Abbildung 11) [Stocker et al., 1987; Singleton et al., 1965; Fenton et al., 1894]. Das entstehende CO wird daraufhin im Organismus zur Modulation zellulärer Signaltransduktion benötigt [Piantadosi et al., 2008].



Abbildung 11: Katalysierte Reaktion der Hämoxygenase 1 (HO1). NADPH/ H^+ : Nicotinsäureamidadenin-Dinukleotidphosphat (reduziert); NADP $^+$: Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert).

HO1 stellt ein Stress-sensitives zytoprotektives Enzym dar, welches als Antioxidans der Entstehung von freien Radikalen entgegenwirkt. An der Transkription der HO1 scheint eine Reihe von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren beteiligt zu sein. Oxidativer Stress kann

den transkriptionalen Repressor Bach-1 vermindern und so zur Transkription von HO1 führen [Zenke-Kawasaki et al., 2007; Ogawa et al., 2001]. Studien an Bach-1-defizienten Zellen (*bach-1*^(-/-)) zeigten dennoch eine erhöhte Expression an HO1 mRNA. Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen, die zudem noch ein Fehlen von Nrf2 aufwiesen, keine erhöhte Expression an HO1 mRNA beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass der Nrf2/ARE-Signalweg involviert ist [Sun et al., 2002]. Die Behandlung von Phäochromozytomzellen (PC12) der Ratte zeigte eine Induktion der HO1 mRNA durch Behandlung mit Carnosol. PC12 Zellen wurden in einer Folgeuntersuchung mit Vektoren transfiziert, die den Maus Wildtyp HO1 Promotor oder den ARE-defizienten HO1 Promotor aufwiesen. Eine Induktion der mit Carnosol induzierbaren HO1 mRNA konnte abermals nur bei jenen Zellen detektiert werden, die den Maus Wildtyp Promotor als Vektor eingesetzt hatten [Martin et al., 2004]. Dieser Versuch bestätigt die Vermutung, dass die HO1 Expression unter Einfluss des Nrf2/ARE-Signalweges zu stehen scheint.

2.7.4 γ -Glutamylcysteinligase (γ -GCL)

Die γ -Glutamylcysteinligase (γ -GCL), auch unter dem Namen γ -Glutamylcysteinsynthetase bekannt, ist ein heteromeres Protein. Es besteht aus einer größeren, katalytischen Untereinheit (GCLC) mit 73 kDa, sowie aus einer kleineren, regulatorischen Untereinheit (GCLM) mit 31 kDa. Die Expression dieser beiden Untereinheiten wird über zwei Gene unterschiedlich reguliert [Yang et al., 2007; Griffith, 1999; Meister, 1983]. Die γ -GCL ist verantwortlich für den ersten der beiden ATP-abhängigen Schritte um Glutathion (GSH) zu synthetisieren. Aus Glutamat und Cystein wird unter Einwirkung der γ -GCL γ -Glutamylcystein. Im nachfolgenden Schritt, der durch die Glutathionsynthetase katalysiert ist, wird Glycin an γ -Glutamylcystein gebunden und somit GSH synthetisiert (Abbildung 12). GSH ist involviert in eine große Anzahl an elementaren, zellulären Prozessen wie Protein und DNA-Synthese, DNA-Reparatur, Zellproliferation und dem Phase-II-Metabolismus mithilfe der GSTs (siehe 2.7.1) [Townsend et al., 2007; Wu et al., 2004; Hayes et al., 1995; Meister, 1983]. Der zelluläre GSH Spiegel wird hauptsächlich über die γ -GCL als bestimmender Faktor reguliert, weshalb der Modulation der Expression und Aktivität der γ -GCL ein großes Interesse zukommt [Lu et al., 2008].

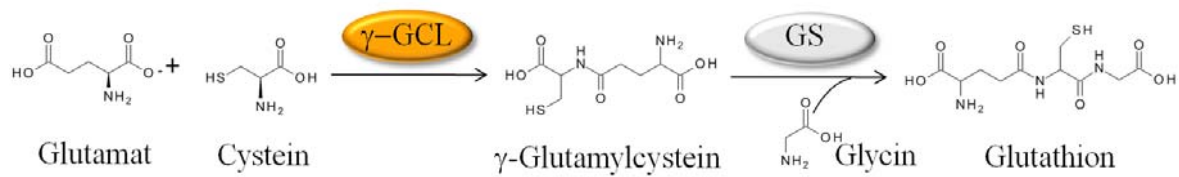


Abbildung 12: Katalysierte Reaktion der γ -Glutamylcysteinylgase (γ GCL). GS: Glutathionsynthetase.

Untersuchungen von Mulcahy et al. (1997) konnten ein ARE in der 5'-angrenzenden Sequenzregion an der katalytischen Untereinheit der humanen γ -GCL identifizieren. Weiterhin konnte veranschaulicht werden, dass sowohl die konstitutive als auch β -Naphthoflavon induzierbare Expression der katalytischen Untereinheit der humanem γ -GCL zumindest teilweise unter Beteiligung des ARE abläuft. Eine aktuelle Veröffentlichung zeigte hierzu bestätigend, dass der Rotweinhaltstoff Resveratrol einen signifikanten Anstieg der Nrf2-Aktivität im Luciferasereporterassay in Verbindung mit einer signifikanten Induktion der Expression der Nrf2-Zielgene NQO1, HO1 sowie γ -GCL in koronaren, arteriellen Endothelzellen verursachen kann [Ungvri et al., 2010].

2.7.5 Glutathionperoxidase (GPx)

Humane Glutathionperoxidasen (GPx) können in fünf Gruppen eingeteilt werden: zytosolisches GPx (cGPx oder GPx1), gastrointestinales GPx (GI-GPx oder GPx2), Plasma GPx (pGPx oder GPx3), Phospholipid-Hydroperoxid GPx (PHGPx oder GPx4) und GPx6, das vermutlich nur in olfaktorischen Epithelzellen exprimiert wird. Die verschiedenen Formen der GPx unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihrem Vorkommen [Brigelius-Flohé, 1999].

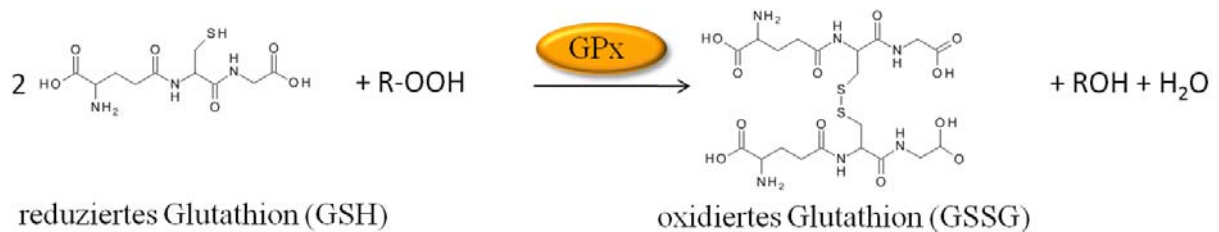
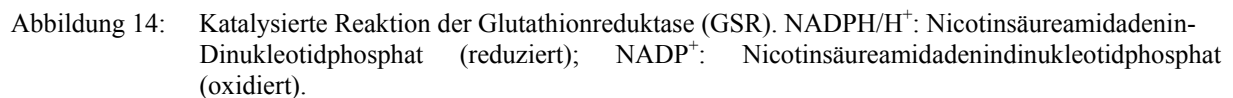


Abbildung 13: Katalysierte Reaktion der Glutathionperoxidasen (GPx).

Die GPxs besitzen in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Selenocystein und zählen zu den Selenproteinen. Die Biosynthese der einzelnen Selenproteine ist in unterschiedlichem Maße abhängig von der Selenverfügbarkeit. Die cGPx reagiert sehr sensitiv auf Unterschiede im Selenspiegel und so wird bei einem Selenmangel ihre mRNA Menge und der Proteingehalt stark reduziert. Im Vergleich dazu zählen die GI-GPx und PHGPx zu den stabilsten Selenproteinen [Wingler et al., 1999; Bermano et al., 1995; Lei et al., 1995]. GPxs reduzieren Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen und Wasser unter Oxidation von Glutathion (Abbildung 13). Die cGPx zeigt unter den GPxs die stärkste antioxidative Wirkung. Eine Überexpression der cGPX in Mäusen bewirkte eine hohe Widerstandskraft gegenüber oxidativem Stress [McClung et al., 2004]. Mäuse denen cGPx fehlte starben hingegen schneller im Vergleich zu Kontrolltieren nach Stressung mit Paraquat [Cheng et al., 1998]. Die Transkription der GPxs kann über den Nrf2/ARE-Signalweg ausgelöst werden. Es konnte gezeigt werden, dass der GI-GPx Promotor ein ARE besitzt, das durch das Nrf2/Keap1 System reguliert wird. Weiterhin war anhand Chromatinimmunopräzipitationsanalysen zu beobachten, dass Nrf2 an den endogenen GI-GPx Promotor bindet und typische Nrf2 Aktivatoren wie Sulforaphan zu einer Induktion der GI-GPx Expression führen konnten [Banning et al., 2005]. Ein Zusammenhang zwischen der cGCPx und Nrf2 zeigen Studien mit Mausembryonalen Stammzellen (EC CGR8), die mit anorganischem Arsen (iAs) behandelt wurden. Es zeigte sich ein Anstieg an ROS und nukleärem Nrf2. Ebenso wurde nach 24 h Inkubation mit iAs eine signifikant erhöhte Expression der cGPx festgestellt [Huang et al., 2009]. Untersuchungen von Chen et al. (2006) konnten in humane Aortenendothelzellen (HAEC) beobachten, dass eine Expression von Nrf2 zu einer Erhöhung des GPx Proteingehaltes führt. Zusammenfassend lassen unterschiedliche Studien auf einen Zusammenhang der GPx mit dem Nrf2/ARE-Signalweg schließen.

2.7.6 *Glutathionreduktase (GSR)*

Die Glutathionreduktase (GSR) ist ein Flavoprotein, das aus einem Homodimer aufgebaut ist. Die GSR befindet sich intrazellulär im Zytosol sowie in den verschiedenen Kompartimenten der Mitochondrien. In Säugerzellen sind bisher noch keine Isoenzyme der GSR beschrieben worden [Panfili et al., 1991; Carlberg und Mannervik, 1985; Williams, 1967]. Die GSR ist ein essentielles Enzym der zellulären GSH Homöostase. Bei der Reduktion von Radikalen und Peroxiden wird GSH zu GSSG oxidiert. Die Regeneration über eine Reduktion der GSSG zu



30

abhängigen erhöhten Expression von GSR in Verbindung steht, wodurch ein vermehrter Schutz durch GSH erreicht werden kann.

2.7.7 Katalase

Bei Katalase handelt es sich um ein tetrameres Enzym, das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist und vier Ferriprotoporphyringruppen pro Molekül enthält. Katalase zählt zu den effizientesten Enzymen und unterliegt keiner Sättigung mit H_2O_2 [Lledias et al., 1998]. Katalase kann mit Peroxiden reagieren und auf diesem Weg H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff umsetzen (Abbildung 15).



Abbildung 15: Katalysierte Reaktion der Katalase.

Katalase zählt damit gemeinsam mit Peroxidasen zu den Hauptenzymen des H_2O_2 Katabolismus. Ob die Induktion durch Katalase auf dem Nrf2/ARE-Signalweg basiert, wird kontrovers diskutiert. Reisman et al. (2009) konnten nur eine geringe Abnahme der mRNA Expression von Katalase in der Leber von *nrf2*^(-/-) „Knock out“-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachten. Weiterhin zeigten *keap1*^(-/-) „Knock out“-Mäuse, bei denen eine erhöhte Aktivität von Nrf2 zu erwarten ist, keine vermehrte mRNA Expression von Katalase gegenüber Wildtyp-Mäusen. Demnach scheint es wahrscheinlich, dass Nrf2 nicht für die Induzierbarkeit der Katalase in der Leber verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu wurde in weiteren Studien gezeigt, dass die Inkubation mit 1,2-Dithiol-3-thion (D3T) von kardialen Fibroblasten eine signifikante Induktion der Aktivität von Phase-II-Enzymen, darunter auch der Katalase, bedingt. Dieser Effekt kommt bei *nrf2*^(-/-) Zellen zum Erliegen, so dass auf eine Beteiligung von Nrf2 an der Katalaseaktivität geschlossen werden kann [Zhu et al., 2005]. Einen Zusammenhang zwischen Nrf2 und Katalase konnten auch durch Untersuchungen von Yeh und Yen (2006) beobachtet werden. Die Expression von Nrf2-Protein in der Rattenleber nahm zu, nachdem phenolische Säuren in einer 14-tägigen Fütterungsstudie verabreicht wurden. Die Aktivität der Katalase sowie weiterer antioxidativer Enzyme in der Leber wurde

hierbei ebenso erhöht und daraufhin vermutet, dass Nrf2 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der antioxidativen Enzyme durch phenolische Säuren einnimmt.

2.7.8 Superoxiddismutase 1 (SOD1)

Superoxiddismutasen (SOD) zählen zu den Metalloenzymen, die in drei Gruppen eingeteilt werden können, zytosolische SOD1, mitochondriale SOD2 sowie extrazelluläre SOD3 [Marklund, 1984]. Im Menschen liegen SOD1 als Dimere vor, wohingegen SOD2 und SOD3 als Tetramere vertreten sind [Marklund, 1982; McCord, 1976; McCord und Fridovich, 1969]. Ebenso können die SODs definiert werden in Abhängigkeit ihrer als Cofaktoren gebundenen Metallionen, wodurch sie als Mn-SOD, Cu-SOD, Zn-SOD, Fe-SOD und Ni-SOD Bezeichnung finden. SODs katalysieren die Überführung von Superoxidradikalanionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff.



Abbildung 16: Katalysierte Reaktion der Superoxiddismutasen (SOD).

Wasserstoffperoxid kann anschließend durch Katalase oder Peroxidase weiter abgebaut werden. Die Superoxiddismutasen sind Teil einer Enzymgruppe, die Reaktionen katalysieren die ROS zu weniger reaktiven Substanzen umsetzen [Crack and Tylor, 2005]. Einige Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass die Induktion der SOD1 Gentranskripte unter Mitwirkung des Nrf2/ARE-Signalweges stattfindet. Studien beschrieben, dass an der Induktion der humanen SOD1 Gentranskription durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) die Region zwischen 400 und 239 Basenpaaren im SOD1 Promotor aktiviert wird und in dieser Region ein XRE lokalisiert ist. In weiterführenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass ebenso ein ARE an der TCDD Induktion der SOD1 Gentranskripte beteiligt ist und dass Nrf2 durch Bindung an ARE die Expression und Induktion der SOD1 durch TCDD modulieren kann [Park und Rho, 2002; Cho et al., 2001].

2.8 Polymorphismen in Nrf2 und Nrf2-abhängigen Genen

Die menschlichen Individuen sind zu 99,9 % genetisch identisch und jeder Mensch besitzt etwa drei Milliarden Basenpaare. Die genetische Heterogenität beruht auf etwa drei Millionen Polymorphismen in diesen drei Milliarden Basenpaaren [Guttmacher und Collins, 2002; Venter et al., 2001]. Gene mit geringer Abweichung in ihrer DNA-Sequenz (Allele) werden als "polymorphe" Gene bezeichnet. Von einem genetischen Polymorphismus wird dann gesprochen, wenn die Häufigkeit einer bestimmten Allelvariante in einer Population mehr als ein Prozent beträgt [Shimada et al., 1994]. Etwa 90 % der genetischen Variation ist bedingt durch den „single nucleotide polymorphism“ (SNP), bei dem im entsprechenden Gen ein einziges Nucleotid ausgetauscht ist [Lewin, 2004]. Die einzelnen SNPs treten in den verschiedenen ethnischen Gruppen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf [Serpia et al., 2005]. Für Nrf2, sowie für einige Phase-II-Enzyme konnten Polymorphismen bzw. SNPs beschrieben werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Auswahl an Genen, bei denen ein Polymorphismus beschrieben ist.

Gen	Quelle
Nrf2	Marzec et al., 2007; Yamamoto et al., 2004
NQO1	Kosaka et al., 2009; Guha et al., 2008
Katalase	Suzen et al., 2009
GPx1	Suzen et al., 2009
SOD2	Kosaka et al., 2009
GSTA1, A2, T1, P1	Coles et al., 2003; Townsend et al., 2003; Hayes et al., 2000
γ-GCL	Walsh et al., 2001
HO1	Hirai et al., 2003; Kimpara et al., 1997

SNPs an der Adapterstelle für Transkriptionsfaktoren können deren Bindungsfähigkeit an der DNA vermindern, wodurch eine beeinträchtigte Genexpression resultieren kann. Als Folge ist eine empfindliche Störung des Abwehrmechanismus gegenüber Krankheiten möglich [Wang et al., 2007]. Untersuchungen von Marzec et al. (2007) identifizierten sechs SNPs in Nrf2. Hierbei zeigte der Polymorphismus - 617 (C zu A) in der Promotorregion eine Verminderung des basalen Expressionsgehaltes an Nrf2, resultierend in einer abgeschwächten ARE-

abhängigen Genexpression. In einer Fall-Kontroll Studie zeigten Patienten mit einem - 617 (C zu A) SNP ein signifikant höheres Risiko, eine akute Lungeninsuffizienz nach einem Trauma zu entwickeln im Vergleich zu Patienten, die keine polymorphe Form sondern die Wildtyp-Form -617 (CC) hatten. Profunde Änderungen im Bezug auf die Bindungsspezifität von small Maf G Proteinen (MafG) durch SNPs konnten Untersuchungen von Kimura et al. (2007) beobachten. Hierbei führten SNPs dazu, dass anstelle des MafG:Nrf2 Heterodimeres bevorzugt MafG:MafG Homodimere gebildet wurden. Änderungen in der Enzymaktivität werden auch in Bezug auf NQO1 beschrieben. Im NQO1 Gen konnten über 93 SNPs identifiziert werden. Der NQO1*3 Polymorphismus besteht aus einer Änderung von C zu T an der Position 465, wodurch ein Austausch der Aminosäure Arginin zu Tryptophan stattfindet. Durch diesen Austausch fehlt dem synthetisierten Protein die Bindungsstelle für Chinone und das Enzyme besitzt eine veränderte Enzymaktivität [Pan et al., 2002; Hu et al., 1996; Gsdaska et al., 1995; Pan et al., 1995]. Kosaka et al. (2009) gehen davon aus, dass eine veränderte Enzymaktivität der NQO1 den Schweregrad der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis Ulcerosa (UC) beeinflussen kann. Weiterführende Untersuchungen zeigten ebenso Polymorphismen für die SOD2, wobei der SOD2 Ala-9Val Polymorphismus im Zusammenhang steht, das altersbedingte Auftreten der UC zu beschleunigen. Eine große Anzahl an Untersuchungen lassen vermuten, dass Polymorphismen in Nrf2 sowie Nrf2-abhängigen Genen mitverantwortlich für das Entstehen von Krankheiten sein können. Hierbei spielt auch eine Rolle, dass aufgrund von Polymorphismen die einzelnen Genotypen unterschiedlich auf die Bioaktivität von Lebensmitteln reagieren können. Das Auftreten von Krebs der Speiseröhre ist endemisch in einer bestimmten Region von China. Ein vermehrter Konsum von grünem Tee steht in Verbindung einen erhöhten Schutz gegenüber Krebs der Speiseröhre zu bewirken. Eine Studie von Wang et al. (2007) konnte zeigen, dass dies nicht für Personen zutrifft, die einem GSTT1 null Genotyp angehören und denen somit die GSTT1 als detoxifizierendes Enzym fehlt. Grüner Tee konnte bei GSTT1 null Genotypen keinen erhöhten chemopräventiven Schutz bieten im Vergleich zur übrigen Bevölkerung. Es wird vermutet, dass die Abwesenheit einer GST Isoform zu einer erhöhten Expression einer anderen GST führen könnte [Lo und Ali Osman, 2007]. Eine „Crossover“-Studie belegte, dass der Verzehr von Gemüse der Familie der Kreuzblütler (z.B. Weißkohl, Blumenkohl, Brokkoli, Rosenkohl) signifikant die Konzentration der GSTA im Serum erhöht, allerdings nur bei Personen, die den GSTM1*0 Genotyp besitzen. Es wurde daraufhin postuliert, dass

der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Gemüse der Familie der Kreuzblütler und dem Krebsrisiko bei Menschen durch genetische Polymorphismen der GSTs beeinflusst werden kann [Lampe und Peterson, 2002]. Es lässt sich beobachten, dass die bioaktive Wirkung von Lebensmittelinhaltsstoffen im Zusammenhang mit dem individuellen Genotyp zu stehen scheint. Ferguson (2009) fordert deshalb bei Humanstudien über die gesundheitsfördernde Wirkung von Lebensmittelinhaltsstoffen eine zusätzliche Genotypisierung des Probandenkollektives. Varianzen der einzelnen Probanden in der Wirkung der Lebensmittelinhaltsstoffe wären somit besser erklärbar und ein gezieltes Auswählen von Lebensmitteln mit dem Hintergrund einer individuellen Genotypisierung könnten den Erkenntnisstand zur Reduktion von chronischen Erkrankungen optimieren.

2.9 Kaffee

Unter Kaffee (Bohnenkaffee) versteht man die von der Fruchtschale und nach Möglichkeit von der Samenschale („Silberhaut“) befreiten, rohen (Rohkaffee) oder gerösteten (Röstkaffee), ganzen oder zerkleinerten Samen von Pflanzen der Gattung *Coffea*, wie auch das daraus zubereitete Getränk [Belitz, 2008]. Obwohl ca. 70 *Coffea*-Arten bekannt sind, entfallen 99 % der Gesamtproduktion auf die zwei Hauptarten *Coffea arabica* (70 % der Weltproduktion) und *Coffea canephora*, allgemein als *Coffea robusta* (30 % der Weltproduktion) bezeichnet. 2009 konsumierte jeder Bundesbürger in Deutschland 150 Liter Kaffee was einem Pro-Kopf-Verbrauch von 6,4 kg Rohkaffee entspricht. Kaffee stellt damit das meist konsumierte Getränk in Deutschland dar und mit einem Verbrauch von mehr als 400 Milliarden Tassen pro Jahr zählt Kaffee zu den beliebtesten Getränken weltweit [Deutscher Kaffeeverband, 2010; Illy, 2002]. Aufgrund des hohen Konsums ist die Frage der Wirkung von Kaffee und dessen einzelnen Inhaltsstoffen auf den Menschen von besonderem Interesse. Die Kaffeebohne enthält bis zu 1000 Inhaltsstoffe, wobei die Verarbeitung der Kaffeebohne einen wesentlichen Betrag zu deren vielfältiger Zusammensetzung leistet. Die chemische Komplexität von Kaffee im Bezug auf aromagebende Inhaltsstoffe wird in besonderem Maße durch die zahlreichen pyrolytischen Reaktionen infolge des Röstvorganges erhöht. Während die grüne Kaffeebohne 250 verschiedene flüchtige Inhaltsstoffe aufweist, erhöht sich diese Anzahl bei der gerösteten Kaffeebohne auf über 800 [Illy, 2002]. Rösten ist als trockenes Erhitzen auf Temperaturen über 100°C definiert. Je nach gewünschter Farbe,

Geruch und Geschmack kann Kaffee bei bis zu 220°C geröstet werden [Meier, 1981]. Die Dauer des Röstvorganges kann 90 sec bis zu 40 min betragen. Rösten wird in drei Phasen unterteilt, die Trocknungsphase, die Röstungsphase und die Kühlungsphase. Während der effektiven Röstungsphase kann der Zellinnendruck der Kaffeebohne auf 25 bar ansteigen, die Zellwand durchlässig werden und es kommt zu einer Freisetzung von CO₂. Ab 160°C beginnt die exotherme Reaktionsphase unter der die meisten der Abbau-, Kondensations- und Polymerisationsreaktionen stattfinden. Bei der Maillardreaktion kommt es zur Kondensationsreaktion von reduzierenden Zuckern mit freien Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. Als Endprodukt entstehen hierbei Aromastoffe und Melanoidine, die im Kaffee zu einer bräunlichen Farbe sowie einem bittersüßen Geschmack beitragen [Illy, 2002]. Aufgrund zahlreicher pyrolytischer Reaktionen nehmen die Karamellisierungs- und Kondensationsprodukte stark zu (Tabelle 5).

Tabelle 5: Chemische Zusammensetzung von rohem und gerösteten Kaffee in % Trockenmasse der Kaffeesorte Arabica [modifiziert nach Illy und Viali, 1995]. K: Karamellisierungs- und Kondensationsprodukte; *Gehalt an Trigonellin und Röstnebenprodukten; Tm = Trockenmasse.

Substanz	% Tm in rohem Kaffee	% Tm in gerösteten Kaffee
Polysaccharide	49,8	38
Saccharose	8	0
Koffein	1,2	1,3
Aminosäuren	0,5	0
Chlorogensäuren	6,5	2,5
Chinasäure	0,4	0,8
Trigonellin*	1	1
Protein	9,8	7,5
Lipide	16,2	17
Aliphatische Säuren	1,1	1,6
Reduzierende Zucker	0,1	0,3
Mineralstoffe	4,2	4,5
Flüchtige Aromen	-	0,1
K	-	25,4

Während sich der Gehalt an Koffein und Lipiden nur moderat ändert, kommt es innerhalb des Röstvorganges zu einer Abnahme der Proteine und Polysaccharide sowie zu einem starken Rückgang des Gehaltes an Saccharose und Chlorogensäuren. Die Konzentration an Chlorogensäuren nimmt proportional zum Röstgrad ab. In stark geröstetem Kaffee kann die Menge an Chlorogensäuren im Vergleich zur rohen Bohne um bis zu 80 % abnehmen. Diese Korrelation ist ebenso bei Trigonellin zu sehen. Bei 160°C nimmt der Trigonellengehalt um

60 % ab und bei 230°C kann dieser Rückgang bis zu 85 % betragen. Ein Abbauprodukt von Trigonellin ist Nicotinsäure (Niacin), ein Vitamin dessen tägliche Aufnahme ca. 18 mg betragen sollte. Durch einen Gehalt von 10-40 mg Niacin in 100 g stellt Kaffee eine wichtige Quelle dar, um den täglichen Bedarf dieses Vitamins zu decken [Illy and Viani, 1995]. Eine genauere Ausführung der thermischen Zersetzung von Trigonellin und weiterer ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe während des Röstvorganges sind im Abschnitt 2.9.1 aufgeführt.

2.9.1 Aufnahme und Bioverfügbarkeit ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe

Zu den in diesem Abschnitt näher beschriebenen Inhaltsstoffen zählen die im Fokus dieser Dissertation betrachteten Verbindungen *n*-Chlorogensäure (CGA), *N*-Methylpyridinium (NMP) und Trigonellin sowie die Kaffeeinhaltsstoffe Cafestol, Kahweol und Koffein. Die Bioaktivität von Kaffeeinhaltsstoffen wird beeinflusst durch die Aufnahme, die Verfügbarkeit für den Organismus sowie der chemischen Form in der sie vorliegen. Aufgrund dessen wird im Folgenden eine Einschätzung über die tägliche Aufnahme und Bioverfügbarkeit gegeben.

2.9.1.1 Diterpene

Zu der unverseifbaren Lipidfraktion im Kaffee zählen die Diterpene Cafestol und Kahweol (Abbildung 17).

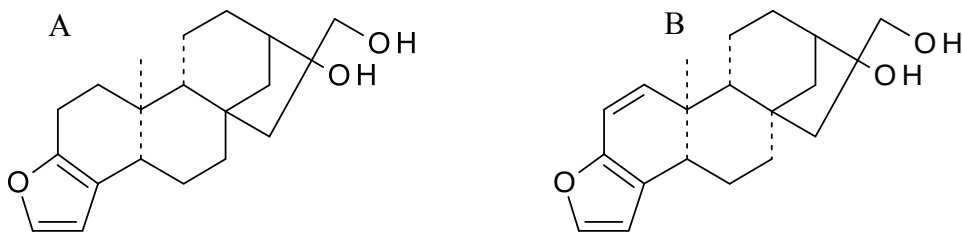


Abbildung 17: Chemische Struktur von A: Cafestol, B: Kahweol [modifiziert nach Higdon und Frei, 2006].

Cafestol und Kahweol können während des Röstvorganges abgebaut werden. Das 16-O-Methylcafestol hingegen zeichnet sich durch eine hohe thermische Beständigkeit aus und kommt nur im *Coffea robusta* vor, weshalb es sich für den Nachweis eines Verschnittes von *Coffea robusta* und *Coffea arabica* eignet [Illy und Viani, 1995].

Aufnahme und Bioverfügbarkeit

Der Gehalte an Diterpenen im Kaffeegetränk ist abhängig von der Zubereitungsmethode, da sie vom Kaffeefilter aufgefangen werden können. Demnach enthält Kaffee, deren Zubereitung ohne Filtern stattfindet wie türkischer Kaffee, skandinavisch gekochter Kaffee oder französisch gepresster Kaffee, einen hohen Gehalt an Cafestol und Kahweol (6-12 mg/Tasse), ebenso wie Espresso (4 mg/Tasse). Hingegen sind die Konzentrationen der Diterpene in gefiltertem Kaffee eher gering (0,2-0,6 mg/Tasse) [De Ross et al., 1998; Gross et al., 1997; Urget et al., 1995].

Die Absorption und Ausscheidung der Diterpene wurde in einer Studie von De Roos et al. (1998) untersucht. Neun Ileostomapatienten konsumierten 1-3 Tassen Kaffee nach französischer Zubereitung (French Press). Hierbei wurden 70 % des aufgenommenen Kahweols und Cafestols resorbiert, hauptsächlich im Duodenum (Zwölffingerdarm). Über den Urin wurden 1,2 % Cafestol und 0,4 % Kahweol ausgeschieden, wobei diese nicht als Aglyka sonder in konjugierter Form als Glucuronide oder Sulfat vorlagen.

2.9.1.2 Koffein

Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) zählt zur Substanzklasse der Purinalkaloide, kommt originär in der Kaffeebohne vor und wird beim Rösten kaum verändert [Illy und Viani, 1995].

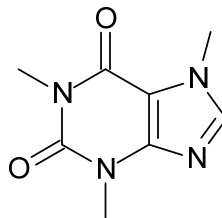


Abbildung 18: Chemische Struktur von Koffein.

Aufnahme und Bioverfügbarkeit

Eine normale Tasse (240 ml) Kaffee enthält ca. 100 mg Koffein. Allerdings zeigt eine Studie in den USA mit 14 verschiedenen Kaffees in 240 ml Kaffeegetränk eine Variation des Koffeingehaltes von 72-130 mg. Der Gehalt an Koffein in einer kleinen Tasse Espresso liegt zwischen 58-76 mg [McCusker et al., 2003].

Koffein wird schnell, nach etwa 20 min, und fast vollständig (90 %) im Magen und Dünndarm aufgenommen und gelangt nach 60 min bis 90 min ins Plasma [Nawrot et al., 2003; Chvasta und Cooke 1971]. Der Metabolismus von Koffein findet fast ausschließlich

(99 %) in der Leber statt. Unter Demethylierung entstehen hierbei die drei Hauptmetabolite Paraxanthin (84 %), Theobromin (12 %) und Theophyllin (4 %). In weiteren Demethylierungs- und Oxidationsreaktionen können Urat- und Uracilderivate gebildet werden. Im Urin sind verschiedene Koffein-Metabolite zu finden, aber weniger als 3 % des ursprünglich aufgenommenen Koffeins. Hauptausscheidungsprodukte im Urin sind Di- und Monomethylxanthin sowie Mono-, Di und Trimethylharnsäure [Safranow und Machoy, 2005; Mandel, 2002].

2.9.1.3 Trigonellin und *N*-Methylpyridinium (NMP)

Trigonellin ist das zweithäufigste Alkaloid in der grünen Kaffeebohne, wobei es während der Röstung Abbaureaktionen unterliegt. Trigonellin ist die Vorläufersubstanz, aus der im Laufe der Hitzebehandlung der Kaffeebohne aromagebende Pyridine gebildet werden können [Stennert et al., 1994; Viani et al., 1974]. Im Vordergrund stehen hierbei zwei Abbauwege von Trigonellin (Abbildung 19). Durch Demethylierung kann Nicotinsäure (Niacin) entstehen. Eine Decarboxylierung führt zur Bildung von *N*-Methylpyridinium (NMP), das unter Umlagerung von Methylgruppen zu flüchtigen Pyridinen und Alkylpyridinen abgebaut werden kann [Stadler et al., 2002a].

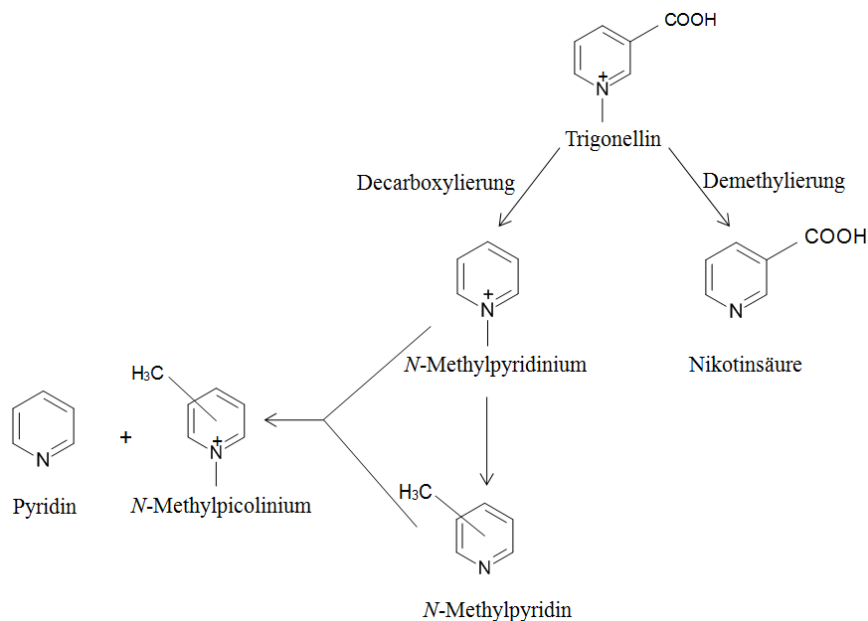


Abbildung 19: Thermischer Abbau von Trigonellin [modifiziert nach Stadler et al., 2002a und b].

Aufnahme und Bioverfügbarkeit

Der Gehalt an Trigonellin liegt laut Studien von Viani (1974) bei 40-55 mg pro Tasse Kaffee. NMP, ein thermisches Zersetzungsprodukt von Trigonellin (Abbildung 19), wird nach Untersuchungen von Stadler et al. (2002a) in Konzentrationen von 30 bis 125 mg aufgenommen, wenn von einem durchschnittlichen Konsum pro Person von fünf Tassen Kaffee pro Tag ausgegangen wird. Da es sich bei Trigonellin sowie bei NMP um stark hydrophile Moleküle handelt, kann von einer fast vollständigen Extraktion aus dem Kaffeepulver in das lösliche Kaffeegetränk ausgegangen werden. Untersuchungen zu Plasmagehalten und der renalen Ausscheidung von Trigonellin und NMP wurden vom Projektpartner (AG Hofmann, TUM) durchgeführt. Sechs weibliche und sieben männliche Probanden konsumierten 350 ml eines Kaffeegetränkes, nachdem sie sich 10 Tage lang kaffeefrei ernährten. Der Plasmagehalte von Trigonellin stieg innerhalb von 6 h von 160 nmol/l auf eine Maximalkonzentration von 5479 (männliche Probanden) bzw. auf 6547 nmol/l (weibliche Probanden). Der geschlechtsspezifische Unterschied wurde hierbei auf das verminderte Körpergewicht sowie das geringere Blutvolumen bei Frauen zurück geführt. Dieser Unterschied zeigte sich ebenso bei der Ausscheidung von Trigonellin über den Urin, wobei männliche Probanden $57,4 \pm 6,9 \%$ und weibliche Probanden $46,2 \pm 7,4 \%$ Trigonellin 8 h nach oraler Aufnahme ausschieden. Für NMP konnte ein Anstieg im Blutplasma von null auf maximal 777 nmol/l (weibliche Probanden) und auf 804 nmol/l (männliche Probanden), 1,67 h bzw. 1,05 h nach Kaffeekonsum beobachtet werden. Die renale Ausscheidung 8 h nach Kaffeekonsum betrug bei Frauen $61,9 \pm 12,2 \%$ bzw. bei Männern $69,1 \pm 6,25 \%$. Die hohen Gehalte im Urin, insbesondere bei NMP verdeutlichten in dieser Studie, dass die renale Ausscheidung im Vergleich zur Ausscheidung über die Leber bevorzugt stattfindet. In diesen Untersuchungen wurden hohen Plasmagehalte von NMP sichtbar, infolgedessen ein Eintreten des Kations NMP in das vaskuläre System gezeigt werden konnte. Weiterhin wurde anhand der Untersuchungsergebnisse vermutet, dass die Plasmagehalte durchaus noch höher sein könnten, unter der Voraussetzung, dass mehrfach am Tag eine Tasse Kaffee konsumiert wird, was für einen durchschnittlichen Kaffeetrinker durchaus zutreffen kann [Lang et al., 2010].

2.9.1.4 Chlorogensäure

Die reichhaltigste Quelle an phenolischen Verbindungen in Kaffee stellen die Chlorogensäuren dar. Chemisch betrachtet handelt es sich hierbei um eine Veresterung von *trans*-Zimtsäuren wie Kaffeesäure, Ferula- oder p-Cumarsäure mit Chinasäuren. Unter den Chlorogensäuren hat die 5-*O*-Kaffeoylchinasäure (*n*-Chlorogensäure) im Kaffee die wichtigste Bedeutung [Higdon et al., 2006; Ky et al., 2001]. Ihre Struktur sowie ihre monomeren Bestandteile sind in Abbildung 20 dargestellt.

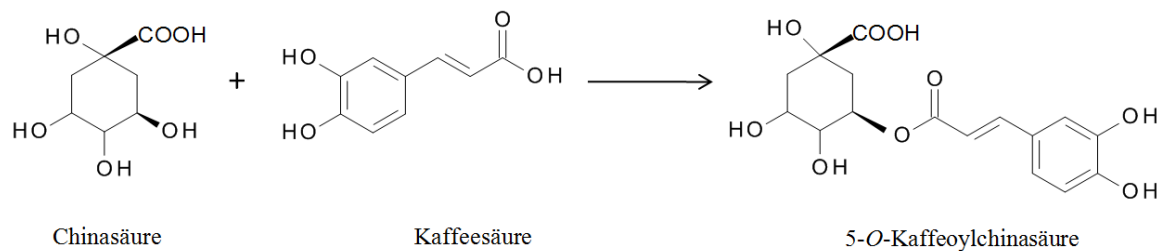


Abbildung 20: Chemische Struktur der 5-*O*-Kaffeoylchinasäure und ihre Monomer

Der aus dem Röstvorgang der Kaffeebohnen resultierende teilweise Abbau der *n*-Chlorogensäure führt im ersten Schritt zu einer Spaltung in die Monomereinheiten Chinasäure und Kaffeesäure. In weiteren Reaktionen kann die Bildung von u. a. Catechol, Pyrogallol, Hydroxyhydrochinon, 4-Ethylcatechol und 4-Methylcatechol erfolgen, die Vorläufersubstanzen von Aromastoffen darstellen [Müller et al., 2006].

Aufnahme und Bioverfügbarkeit

Trotz der Verminderung des *n*-Chlorogensäuregehaltes im Laufe der Röstung sind im Kaffeegetränk noch Konzentrationen von 500-800 mg/l enthalten. Es wird vermutet, dass Kaffeetrinker pro Tag durchschnittlich 0,5-1 g *n*-Chlorogensäure zu sich nehmen [Clifford et al., 1999]. Die bisherige Datenlage über die Bioverfügbarkeit der *n*-Chlorogensäure lässt noch kein klares Bild über die Resorption und Biotransformation zu. Fraglich ist, ob bzw. zu wie vielen Teilen Chlorogensäure in intakter Form oder gespalten, also die Monomere Kaffeesäure und Chinasäure im Plasma, vorliegen. In einer Studie an sechs Probanden wurde deren Plasma nach Konsum von Kaffee auf den Gehalt an phenolischen Verbindungen untersucht. Vier Stunden nach Kaffeekonsum ließ sich für *n*-Chlorogensäure unter den untersuchten Phenolen die höchsten Konzentrationen im Plasma feststellen [Monteiro et al., 2007]. Die Absorption der intakten *n*-Chlorogensäure schließen ebenso Olthof et al. (2003

und 2001) nicht aus. In ihren Untersuchungen mit Ileostomapatienten wurde nach Gabe von *n*-Chlorogensäure die Ileostomaflüssigkeit untersucht. Es ließ sich beobachten, dass ein Drittel der intakten *n*-Chlorogensäure in der Ileostomaflüssigkeit wiederzufinden ist. Ebenso können Spuren von *n*-Chlorogensäure im Urin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gehen Nardini et al. (2002) davon aus, dass *n*-Chlorogensäure im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert wird. Sie konnten im Plasma keine *n*-Chlorogensäure nach Konsum von Kaffee detektieren, sondern nur freie Kaffeesäure bzw. Kaffeesäureglucuronide/sulfate. Da freie Kaffeesäure nicht im Kaffeegetränk vorkommt, kann von einer Spaltung der *n*-Chlorogensäure ausgegangen werden. Die Spaltprodukte der *N*-Chlorogensäure scheinen im Dünndarm resorbiert zu werden. So zeigte eine Studie mit Ileostomapatienten hohe Gehalte der Chinasäure in der Ileostomaflüssigkeit nach Gabe von chlorogensäurereichem Apfelsaftextrakt, wonach auf eine Esteraseaktivität sowie Resorption im Dünndarm geschlossen wird [Kahle et al., 2007]. Weiterhin können im Dünndarm nicht aufgenommene phenolische Verbindungen über den Dickdarm durch die dort vorhandene Darmflora gespalten, metabolisiert und resorbiert werden [Scalbert und Williamson, 2000]. Der Aufnahme der phenolischen Verbindungen kann eine Metabolisierung in der Leber folgen, deren entstehende Metabolite eine andere Bioverfügbarkeit zeigen können, als die Vorläufersubstanz. In einigen Studien wurde berichtet, dass *n*-Chlorogensäure nach der Spaltung zu Kaffeesäure und Chinasäure zu Benzeosäure und in einem weiteren Schritt zu Hippursäure metabolisiert werden kann, dem eine Ausscheidung über den Urin folgt [Gonthier et al., 2003; Olthof et al., 2003]. In aktuellen *in vivo* Untersuchungen über den Metabolismus der Chlorogensäure nach Kaffeekonsum konnte gezeigt werden, dass *n*-Chlorogensäure zu Kaffeesäure abgebaut wird, wobei anschließend eine große Anzahl an Sulfatierungs- und Glucuronidierungsreaktionen folgt (Abbildung 21) [Stalmach et al., 2010]. In einer Studie wurde das Plasma von zehn Probanden untersucht, welche polyphenolreiche Beeren zu sich genommen haben. Es zeigte sich nach 30 min die Mandelsäure sowie zum Teil die *p*-Cumarsäure in unkonjugierter Form. Ferula-, Vanillin- und Kaffeesäure kamen überwiegend als Konjugate im Plasma vor, wobei die Sulfate im Vergleich zur den Glucuroniden leicht überwogen [Nardini et al., 2006].

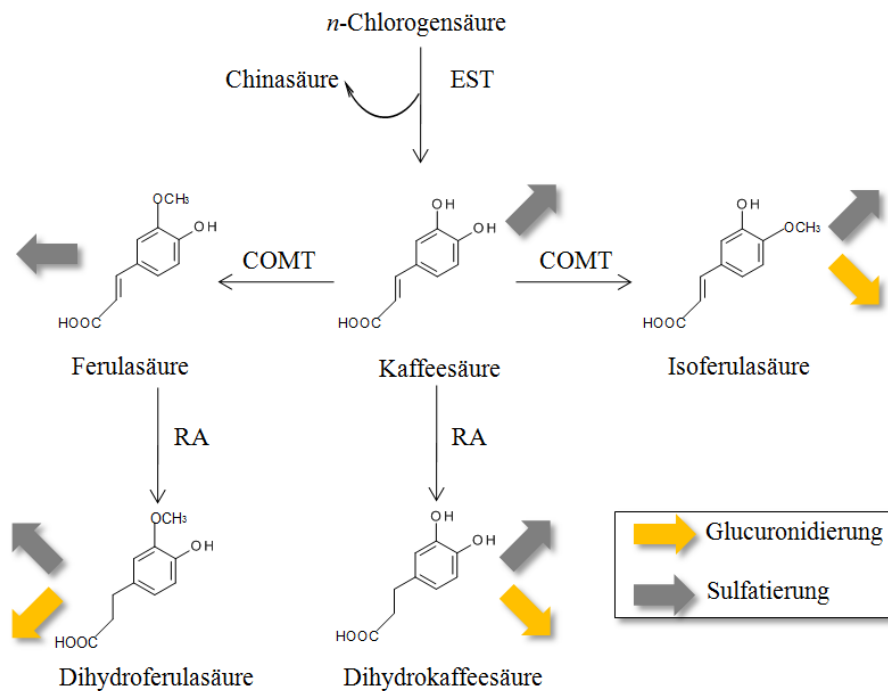


Abbildung 21: Möglicher Metabolismus der *n*-Chlorogensäure nach Kaffeekonsum [modifiziert nach Stalmach et al., 2010]. COMT: Catechol-O-methyltransferase, EST: Esterase, RA: Reduktase.

Ebenso konnten Wong et al. (2009) beobachten, dass die Metabolisierung der Hydroxyzimtsäuren *in vitro* sowie in einer *in vivo* Studie nach Verabreichung von Kaffee durch Glucuronidierungs- und Sulfatierungsreaktionen abzulaufen scheint. Eine Beeinträchtigung der biologischen Wirkung ist hierbei durchaus denkbar, da eine starke antioxidative Kapazität der Hydroxyzimtsäuren in Verbindung mit dem Vorhandensein von freien Hydroxylgruppen steht [Giacomelli et al., 2004], welche bei Glucuronidierungs- und Sulfatierungsreaktionen gebunden werden können [Scalbert und Williamson, 2000].

2.9.2 Biologische Wirkung von Kaffee und ausgewählten Inhaltsstoffen

Der hohe Konsum von Kaffee geht neben dem wohlschmeckenden Aroma vor allem auf seine belebende Wirkung auf das zentrale Nervensystem zurück, bei dem der Kaffeeinhaltsstoff Koffein als Adenosinrezeptorantagonist wirkt [Pettenuzzo et al., 2008; Dunwiddie und Mansino, 2001]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Koffein mit Adenosin (Abbildung 22), die sich in einer vergleichbaren Ringstruktur darstellt, kann Koffein an den Adenosinrezeptor A₁ und A₂ binden.

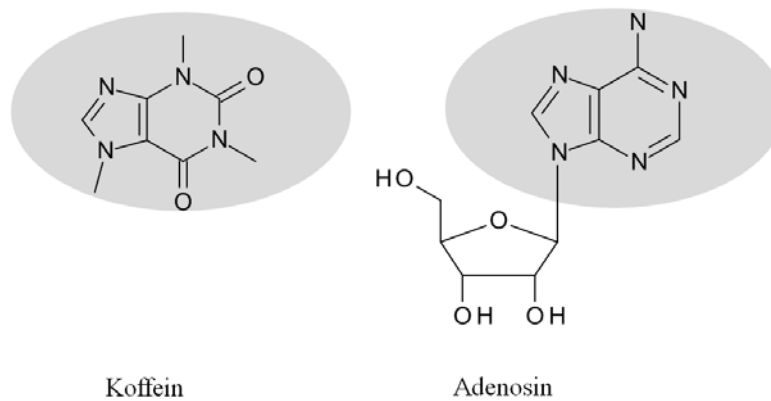


Abbildung 22: Vergleich der chemischen Struktur von Koffein und Adenosin.

Dadurch wird der Rezeptor blockiert, was zu einer Hemmung der Umwandlung von ATP zu cAMP führt. Der cAMP-Spiegel wird also gesenkt und die Wirkung des cAMP als second messenger herabgesetzt bzw. unterdrückt. Durch den gleichzeitigen Anstieg des ATP-Spiegels wird eine Erhöhung des Wachheitsgrades hervorgerufen [Löffler, 2007]. Der Konsum von Kaffee und die sich daraus ergebenden Einflüsse auf die menschliche Gesundheit unterliegen einer seit Jahrzehnten andauernden kontroversen Diskussion, wobei sowohl positive als auch negative biologische Eigenschaften von Kaffee beschrieben werden. In der Diskussion sind hierbei zum einen Einflüsse von Kaffee auf das Herz-Kreislauf-System. Die Diterpene Cafestol und Kahweol zeigen einen Einfluss auf dem Serumcholesterolspiegel. Eine Studie von Rustan et al. (1997) ließ eine Verminderung der LDL-Rezeptoraktivität durch die Diterpene erkennen, wodurch eine extrazelluläre Akkumulation von LDL hervorgerufen wurde, einem Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen. Der Konsum von gekochtem Kaffee führte in einer weiteren Studie zu einem um 40-60 % erhöhten Herzinfarkttrisiko im Vergleich zum Konsum von gefiltertem Kaffee. Dieser Unterschied, der sich allein durch die Zubereitung von Kaffee ergeben hat, zeigte sich allerdings nicht mehr, bei einem Konsum über 1000 ml Kaffee pro Tag. Hierbei stieg das Herzinfarkttrisiko auf das zweifache, unabhängig von der Zubereitung [Hammar et al., 2003]. Van Dam (2008) rät deshalb zur Vorbeugung von kardiovaskulären Erkrankungen auf einen hohen Konsum von ungefiltertem Kaffee zu verzichten. Ein Hauptrisikofaktor für koronare Herzerkrankungen ist Hypertonie (Bluthochdruck). Untersuchungen zeigten, dass Koffein im Plasma zu einer Zunahme der blutdruckerhöhenden Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol führen kann [Lane et al., 1990; Robertson et al., 1978]. Der

Zusammenhang zwischen Langzeitkonsum von Kaffee und die Gefahren von Bluthochdruck konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Higdon und Frei (2006) sehen anhand der Datenlage epidemiologischer Studien eher einen marginalen Beitrag von Kaffee an Bluthochdruck. Allerdings sollten bestimmte Risikogruppen, wie etwa Personen die an Bluthochdruck leiden, ihren Kaffeekonsum reduziert. Viele ältere Studien, welche negative gesundheitliche Einflüsse durch Kaffeekonsum postulierten, konnten in jüngeren Studien widerlegt werden [Alpert et al., 2009]. Das Bild über die Einflüsse von Kaffee auf die menschliche Gesundheit wurde im Laufe der Jahre einem kompletten Wandel unterzogen und so geht man nach aktuellen Einschätzungen von einer großen Anzahl an gesundheitsfördernden Wirkungen von Kaffee aus. In einem Review mit 16 Studien unter Beteiligung von 200.000 Frauen und Männern konnte bei der Mehrzahl der Untersuchungen ein inverser Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und Typ 2 Diabetes festgestellt werden [van Dam und Hu, 2005]. Greenberg et al. (2006) gehen von einer positiven Korrelation zwischen Gewichtsverlust und Kaffeeinhaltsstoffen wie Koffein und Chlorogensäure aus. Eine frühe Untersuchung von MacMahon et al. (1981) postuliert eine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und der Entstehung von Pankreaskrebs. Dieser Zusammenhang konnte widerlegt werden und es scheint allgemein nachgewiesen, dass der Konsum von Kaffee nicht zu der Entstehung von Krebs, einschließlich Blasen-, Gastrointestinal-, Nieren-oder Brustkrebs, beiträgt [Ganmaa et al., 2008; Lee et al., 2007; Botelho et al., 2006; Zeegers et al., 2004]. Einzig in der Schwangerschaft sollte die generelle Koffeinaufnahme reduziert werden, da Koffein die Plazenta passieren kann und der Fötus Koffein nur langsam zu metabolisieren scheint [Dlugosz und Bracken, 1992]. Kaffee scheint ein chemopräventives Potential zu besitzen, was möglicherweise auf antioxidative Eigenschaften zurückgeführt werden kann. Ein Wirkmechanismus kann hierbei die Induktion von Phase-II-Enzymen beinhalten. Eine Untersuchung mit 10 Probanden, die fünf Tage lang jeweils 1 Liter ungefilterten Kaffee konsumierten, zeigte eine signifikante Induktion der GSTP im Blutplasma [Steinkellner et al., 2005]. In Übereinstimmung damit stehen Studien, die einen Schutz gegenüber DNA-Schäden durch Kaffeekonsum postulieren. Hierbei wurde die Schutzwirkung auf die Induktion von antioxidativen Enzymen zurückgeführt, da Kaffeekonsum zu einem signifikanten Ansteigen der Superoxiddismutase in den Lymphozyten führte [Bichler et al., 2007]. Eine genaue Zuordnung der gesundheitsfördernden Wirkung von Kaffee auf einzelne Verbindungen scheint schwierig, da ein breites Spektrum an Kaffeeinhaltsstoffen und Substanzklassen Phase-

II-Enzyme zu beeinflussen scheinen. So vermittelten die Diterpene Kahweol und Cafestol eine Aktivierung der GSTs sowie von NQO1 [Higgins et al., 2008; Cavin et al., 1998; Lam et al., 1982].

Chlorogensäure

Der weitaus bekannteste Kaffeeinhaltsstoff, der mit gesundheitsfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht wird, ist Chlorogensäure bzw. *n*-Chlorogensäure (CGA). In frühen Studien konnte für CGA eine tumorhemmende Wirkung beobachtet werden. Mäuse, deren Tumorstadium mit 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) promoviert wurde, zeigten über einen Zeitraum von 19 Wochen ein vermindertes Tumorstadium durch Auftragung von 20 µmol CGA auf die Haut [Huang et al., 1988]. In weiterführenden Studien wurde der Mechanismus der krebsthemmenden Wirkung durch CGA untersucht. 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OH-dG) kann als Marker für oxidativen Stress im Zuge der Kanzerogenese betrachtet werden und lässt sich zur Identifizierung von Antioxidantien in Lebensmitteln heranziehen. Die Zunge von Ratten wurde mit 4-NQO behandelt, einem Auslöser von oxidativen DNA-Schäden. Der 8-OH-dG Gehalt in der Zunge der Ratte war in der Gruppe der mit CGA behandelten Tiere signifikant niedriger und demonstrierte damit die DNA-schützende Wirkung der CGA *in vivo* [Kasai et al., 2000]. In Untersuchungen von Iwai et al. (2004) wurde die antioxidative Effektivität von Hydroxyzimtsäurederivaten, isoliert aus der grünen Kaffeebohne, untersucht. Hierbei wurden in einem zellfreien System Superoxidradikalanionen durch den Zusatz von Xanthin-XOD erzeugt sowie die Testsubstanzen zugesetzt. Es zeigte sich für die Fähigkeit, das Superoxidradikalanion abzufangen, folgende Reihenfolge, beginnend mit der höchsten Potenz:

Dikaffeoylchinasäuren > Kaffeesäure > CGA > 5-Feruloylchinasäure

Demnach besitzt Kaffeesäure eine stärkere antioxidative Wirkung *in vitro* im Vergleich zur CGA. Kaffeesäure kommt originär nicht im Kaffeegetränk vor, allerdings wird vermutet, dass für die Resorption und Metabolisierung der CGA zumindest teilweise eine Spaltung in Chinasäure und Kaffeesäure erfolgen kann [vgl. 2.9.1.4]. Infolgedessen ist eine antioxidative Wirkung sowohl von Chlorogensäure, als auch von deren möglichem Metabolit, der Kaffeesäure, zu erwarten, was das gesamte antioxidative Potential der CGA noch steigern könnte. Die Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch CGA wurde in verschiedenen Studien untersucht. Durch die Behandlung von Mausepithelzellen (JB6) mit

CGA konnte eine Aktivierung der Enzymaktivität der GST sowie NQO1 beobachtet werden. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CGA die nukleäre Translokation von Nrf2 sowie die GSTA1-ARE Luciferaseaktivität zu stimulieren scheint. Das antioxidative Potential der CGA könnte demnach auf der Induktion von Phase-II-Enzymen über den Nrf2/ARE Signalweg begründet sein [Feng et al., 2005]. Hierzu bestätigend zeigten aktuelle Untersuchungen einen Anstieg des nukleären Nrf2-Proteingehaltes nach 3 h Inkubation mit CGA und in Weiterleitung daran, eine potente Induktion der Gentranskripte ausgewählter Phase-II-Enzyme in HT29-Zellen. Darauf aufbauend wurde ein CGA-reicher Kaffee in einer humanen Interventionsstudie eingesetzt, wobei eine potente Transkriptzunahme der Phase-II-Enzyme HO1, NQO1, γ -GCL und Nrf2 in peripheren Blutlymphozyten festgestellt wurde [Dissertation Böttler, 2009; Böttler et al., 2010].

N-Methylpyridinium (NMP)

In neueren Studien wird berichtet, dass die bioaktive Wirkung von Kaffee auch auf das Trigonellin-Abbauprodukte *N*-Methylpyridinium (NMP) zurückgeführt werden kann. NMP (0,025 g/100 ml) zeigte in *in vitro* Untersuchungen eine Zunahme der GST-Aktivität um $22,4 \pm 3,79$ %. In weiterführenden *in vivo* Studien wurde die Beeinflussung der Enzymaktivität verschiedener Phase-II-Enzyme durch Kaffee und von NMP anhand einer Fütterungsstudie mit Ratten getestet. Die Enzymaktivität der GST und UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) stieg in der Leber durch Fütterung von Kaffee auf 24 % bzw. 40 %. Durch NMP stieg die UDP-GT Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 65 % an. Passend dazu erhöhte sich im Plasma sowohl durch Kaffee als auch durch NMP die zwei antioxidativen Marker, die „totale antioxidative Kapazität“ sowie die „Tocopheroläquivalente“ [Somoza et al., 2003]. Aktuelle Untersuchungen ließen nach einer 3 h Inkubation von HT29-Zellen mit NMP eine erhöhte Nrf2-Kerntranslokation erkennen [Böttler et al., 2010]. Weiterführende Untersuchungen ergaben eine gesteigerte Transkriptmenge verschiedener Phase-II-Enzyme nach 3 h und 24 h *in vitro*. Im Rahmen einer humanen Interventionsstudie, in der Probanden für vier Wochen einen NMP-reichen Kaffee konsumierten, ließ sich nach der Kaffeeintervention eine potente Induktion der Gentranskripte der HO1 und Nrf2 *in vivo* erkennen [Dissertation Böttler, 2009]. Hinweise für eine antioxidative Wirkung von NMP konnten weiterhin Arbeiten von Zill et al. (2003) geben. NMP zeigte eine Aktivierung von p44/42 (ERK1/2). Eine Induktion von ERK1/2 durch NMP

könnte mit einer Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges in Zusammenhang stehen (vgl. Abschnitt 2.5.1). Allerdings zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass der *tert*-Butylhydroperoxid (TBH) induzierte ROS-Gehalt nach 24 h in HT29-Zellen über einen Konzentrationsbereich von 1 μM bis 250 μM durch NMP nicht vermindert wurde [Dissertation Bakuradze, 2010].

Trigonellin

Die bioaktive Wirkung von Trigonellin wird derzeit kontrovers diskutiert. Es zeigte sich im Bakterien-Mutations-Assay mit *Salmonella typhimurium* (Stamm TA98, YG 1024 und YG 1029) eine mutagene Aktivität für Trigonellin [Wu et al., 1997]. Weiterhin beschrieben Allred et al. (2009) eine durch den Estrogenrezeptor vermittelten Wachstumsstimulus von humanen Brustadenokarzinomzellen (MCF-7) durch Inkubation mit Trigonellin (100 pmol/l). Weiterführende Untersuchungen mit Trigonellin zeigten in MCF-7-Zellen eine Aktivierung im „estrogen response element reporter assay“ und eine erhöhte Expression verschiedener Estrogenrezeptor-Zielgene, wonach eine Wirkung von Trigonellin als Phytoestrogen postuliert wurde. Allerdings sind in der Literatur auch gesundheitsfördernde Wirkungen durch Trigonellin beschrieben. Die Erkrankung an Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson kann auf den Abbau oder den Verlust von Neuronen in bestimmten Gehirnregionen zurückgeführt werden. Die neuronale Zusammenarbeit kann durch die Aktivierung der vorhandenen Neuronen wieder aufgebaut werden, wobei ein neuritisches Auswachsen den hierfür entscheidenden Schritt darstellt. Durch Trigonellin konnte *in vitro* ein neuritisches Auswachsen in humanen Neuroblastomzellen (SK-N-SH) beobachtet werden [Tohda et al., 1999]. Trigonellin wird weiterhin als antibakteriell beschrieben, da es wie Kaffeesäure, zu einem verminderten bakteriellen Wachstum führen kann [Almeida et al., 2006]. Ebenso scheint Trigonellin das Diabetes-Risiko zu minimieren, da in diabetischen Ratten durch Trigonellin die Blutglukosekonzentration gesenkt wurde und im Oral-glukose-Toleranz-Test (OGTT) durch Trigonellin, neben Chlorogensäure und Nikotinsäure, der Insulin- und Glukosespiegel reduziert werden konnte [Van Dijk et al., 2009; Yoshinari et al., 2009; Van Dam et al., 2006]. Fraglich ist die antioxidative Wirkung von Trigonellin. Studien von Ogata et al. (2002) untersuchten mit der Elektronen-Spin-Resonanz-Methode im zellfreien System 23 Niacin verwandte Stoffe auf ihre Fähigkeit, Radikale abzufangen. Hierbei zeigte Trigonellin keine Radikalfänger-Aktivität. Des Weiteren beobachteten Yen et al. (2005) eine geringe Beteiligung von Trigonellin an der Hemmung der Liposomenoxidation, wodurch die

antioxidative Aktivität von Trigonellin im Vergleich zu anderen Kaffeeinhaltsstoffen, wie etwa Chlorogensäure, geringer scheint. Allerdings berichteten weitere Veröffentlichungen von einer Minimierung der ROS-ausgelösten, invasiven Aktivität in Krebszellen. Hepatomzellen, die mit einem ROS-generierenden System kultiviert wurden, zeigten eine erhöhte invasive Aktivität. Die gleichzeitige Behandlung mit Trigonellin konnte die invasive Kapazität durch ROS in Leberhepatomzellen (AH109A) der Ratte senken. Allerdings zeigten weiterführende Studien, dass diese Wirkung von Trigonellin nicht auf dessen Eigenschaft Radikale abzufangen, zurückgeführt werden kann [Hirakawa et al., 2005]. Konträr hierzu zeigten Studien, dass Trigonellin nach 24 h bei 30 μM und 100 μM den TBH induzierte ROS Spiegel in HT29-Zellen minimieren kann [Dissertation Bakuradze, 2010]. Letztlich lässt sich erkennen, dass weiterführende Untersuchungen notwendig sind, um das bioaktive Potential von Trigonellin einordnen zu können.

2.9.3 Die Studienkaffees CGA-Kaffee, NMP-Kaffee und Kaffee Brazil Blend

Im Rahmen des BMBF geförderten Projekt "Coffee prevention: Identifizierung, Prüfung und Optimierung der gesundheitsfördernden Eigenschaften von Kaffee" wurden drei Studienkaffees bzw. daraus gewonnene Kaffeeextrakte untersucht, die als Charakteristikum voneinander abweichende Gehalte der Leitverbindungen *n*-Chlorogensäure (CGA) und *N*-Methylpyridinium (NMP) enthalten. In einer ersten Phase wurden von der AG Eggers (TU Hamburg-Harburg) zwei spezielle, nicht im Handel erhältliche Studienkaffees der Sorte *Coffea Arabica* geröstet, die jeweils einen hohen Anteil von CGA bzw. NMP aufweisen. Diese beiden Kaffees können als Extremröstungen bezeichnet werden, da sie nur geringe Anteile der jeweiligen anderen Leitverbindung besitzen. So ist der sogenannte CGA-Kaffee reich an CGA und relativ arm an NMP. Der zweite Kaffee, im weiteren Verlauf als NMP-Kaffee bezeichnet, enthält im Gegensatz dazu vergleichsweise hohe Konzentrationen an NMP und ist CGA-arm. Wie in Abschnitt 2.9 bereits erwähnt, sinkt mit der Röstzeit der Gehalt an CGA. Folglich werden hohe Gehalte an CGA durch eine kurze Röstzeit erreicht. Bei NMP handelt es sich um ein Abbauprodukt von Trigonellin, das sich während der Röstung bildet und bei längerer Röstzeit ansteigt. Demnach besteht eine inverse Korrelation zwischen dem CGA- und NMP-Gehalt im Kaffee. In einer zweiten Phase wurde der dritte Kaffee entwickelt, welcher im Wesentlichen zwei Merkmale aufweist. Der dritte Kaffee, genannt „Brazil Blend“, besitzt im Hinblick auf konsumrelevante Faktoren einen angenehmen Geschmack. Von

weitaus größerer Bedeutung ist weiterhin der Gehalt der beiden Leitverbindungen CGA und NMP. Kaffee Brazil Blend enthält annähernd gleich hohe NMP-Gehalte wie der NMP-Kaffee, gleichzeitig jedoch deutlich höhere Gehalte an CGA. Da sich die beiden Leitverbindungen CGA und NMP jedoch konträr in ihrer gebildeten Menge beim Rösten verhalten war es ohne weiteres nicht möglich, ein Röstkaffeeprodukt herzustellen, das gleichzeitig beide Komponenten in hoher Konzentration enthält. Bei Kaffee Brazil Blend handelt es sich folglich um eine Mischung, bezeichnet als „Blend“, aus zwei unterschiedlich gerösteten Kaffees im Verhältnis 25 % Anteil Kaffee A zu 75 % Anteil Kaffee B. Als Ausgangsware wurde hierbei *Coffea Arabica*, genaue *Arabica Brazil*, verwendet. Kaffee Brazil Blend zeichnet sich durch einen interessanten Espresso-Charakter, durch wenig Säure und ein zufriedenstellendes Aroma aus und erfüllt somit die konsumrelevanten Vorgaben. Um die Studienkaffees zu charakterisieren, können die Gehalte der Leitverbindungen CGA und NMP sowie des bioaktiven Kaffeeinhaltsstoffes Trigonellin herangezogen werden (Tabelle 6).

Tabelle 6 Zusammensetzung von CGA-Kaffee, NMP-Kaffee und Kaffee Brazil Blend [AG Hofmann, TUM]. CGA: 5-O-Kaffeoylchinasäure; NMP: *N*-Methylpyridinium.

	CGA [mg/l]	NMP [mg/l]	Trigonellin [mg/l]
CGA-Kaffee	819,2	5,3	444,1
NMP-Kaffee	82,6	73,7	96,9
Kaffee Brazil Blend	287,4	71,7	263,6

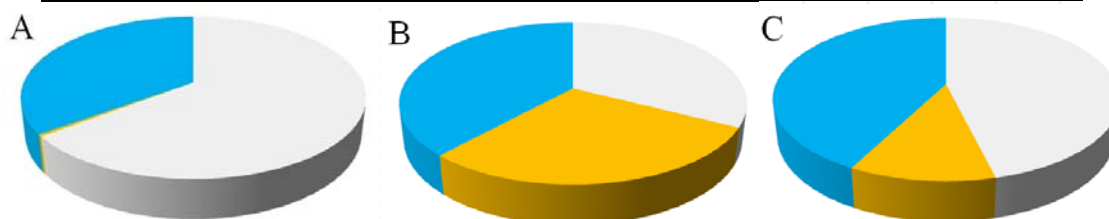


Abbildung 23: Verhältnisse von CGA-Kaffee (A), NMP-Kaffee (B) und Kaffee Brazil Blend (C) im Hinblick auf die zwei Leitverbindungen CGA und NMP sowie des bioaktiven Kaffeeinhaltsstoffes Trigonellin.

In Abbildung 23 ist weiterhin aufgeführt, wie sich ausschließlich die drei Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin in den entsprechenden Studienkaffees zueinander verhalten.

Dieses Verhältnis veranschaulicht das markante Unterscheidungsmerkmal der drei Studienkaffees.

2.10 Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Polyphenole sind in der Lage, mit noch unbekannten Bestandteilen des Zellkulturmediums zu reagieren und auf diese Weise Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu bilden, die sich dann im Medium anreichert [Kern et al., 2007; Hou et al., 2005; Dashwood et al., 2002; Halliwell et al., 2000]. Als Mechanismus wird die Autooxidation von Polyphenolen postuliert, wobei die Reaktion von im Zellkulturmedium vorhandenen Metallionen wie Cu^{2+} katalysiert werden soll [Hou et al., 2005; Lapidot et al., 2002]. In einer aktuellen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ebenso Maillardprodukte im Kaffee eine vermehrte H_2O_2 Bildung unter Zellkulturbedingungen verursachen können, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch unklar scheint [Hegele et al., 2009]. Abhängig vom eingesetzten Zellkulturmedium akkumulieren unterschiedliche Konzentrationen an H_2O_2 . Beim Vergleich von drei verschiedenen Zellkulturmedien konnte bei „Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ (DMEM) die höchste Konzentration an H_2O_2 festgestellt werden [Long et al., 2000]. Weiterhin ist die Bildung von H_2O_2 im Zellkulturmedium abhängig von der Substanzinkubationszeit und auch der Substanzkonzentration [Long et al., 2000]. Der Nrf2/ARE-Signalweg kann durch ROS wie H_2O_2 aktiviert werden [Ding et al., 2008]. Zellkulturuntersuchungen im Rahmen des Nrf2/ARE-Signalweges bei denen die Möglichkeit besteht, dass es im Medium zu einer H_2O_2 Bildung kommt scheinen kritisch, da ein Rückschluss auf substanzvermittelte Effekte erschwert wird. Jedoch disproportioniert H_2O_2 unter dem Zusatz von Katalase in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) und eine Akkumulation kann so unterdrückt werden.

3 Problemstellung

Schätzungen der World Health Organisation (2002) gehen davon aus, dass ein Drittel der jährlichen Krebsneuerkrankungen zu verhindern seien, wobei ein wichtiger Beitrag durch einen erhöhten Schutz des Körpers gegenüber oxidativen Einflüssen geleistet werden könnte. Lebensmitteln, deren Konsum zu einer Aktivierung antioxidativ wirksamer Enzyme führt und die dadurch über ein chemopräventives Potential zu verfügen scheinen, kommt folglich eine besondere Bedeutung zu.

Im BMBF geförderten Projekt "Coffee prevention: Identifizierung, Prüfung und Optimierung der gesundheitsfördernden Eigenschaften von Kaffee" wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Teilprojekt untersucht mit dem Ziel, die Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch Kaffee sowie ausgewählten Kaffeeinhaltsstoffen und deren zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzuklären. Im Mittelpunkt standen drei Studienkaffees bzw. deren Extrakte (KE) die durch Röstung unterschiedliche Gehalte der Leitverbindungen *n*-Chlorogensäure (CGA) und *N*-Methylpyridinium (NMP) enthielten.

In einem ersten Untersuchungsabschnitt sollte das zelluläre Wirkprofil des CGA-KE, NMP-KE und Brazil Blend (BB)-KE anhand unterschiedlicher *in vitro* Testsysteme charakterisiert werden. Der Nrf2/ARE-Signalweg wird als initialer Schritt der Induktion der Gentranskription detoxifizierender und antioxidativ-wirksamer Phase-II-Enzyme betrachtet [Itoh et al., 1997]. Eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges, in dessen Folge Nrf2 aus dem Zytosol in den Zellkern transloziert, kann einerseits durch einen erhöhten intrazellulären ROS-Gehalt, andererseits aber auch durch bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe ausgelöst werden [Jaiswal et al., 2004; Nquyen et al., 2003; Itoh et al., 1999]. Um oxidative von substanzvermittelnden Einflüssen unterscheiden zu können, wurden CGA-KE, NMP-KE und BB-KE mittels DCF-Assay in HT29-Zellen auf ihre ROS-generierenden Eigenschaften untersucht. Mithilfe der Western Blot Analyse sollte im Anschluss daran der nukleäre Nrf2-Gehalt in HT29-Zellen, als Marker für eine Aktivierung von Nrf2 und somit Translokation in den Zellkern, erfasst werden. Der Translokation folgend, kann Nrf2 an „antioxidant responsive element“ (ARE) binden, wobei diese Weiterleitung des Signales auf Transkriptionsebene durch Untersuchung der Transkription ARE-regulierter Phase-II-Enzyme überprüft werden kann. Infolgedessen wurden HT29-Zellen mit den KEs inkubiert und mittels Real Time PCR auf Modulationen der Transkriptgehalte ausgewählter Phase-II-Enzyme

untersucht. Glutathion-S-Transferasen (GSTs) stellen eine Enzymfamilie dar, die in zentrale Detoxifizierungsprozesse des Körpers involviert sind. In verschiedenen Studien konnte ein Anstieg der GST-Enzymaktivität durch Kaffee beschrieben werden, was als Hinweis für eine chemopräventive Wirksamkeit von Kaffee gedeutet wurde [Huber et al., 2003; Somoza et al., 2003; Wattenberg und Lam, 1984]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob ebenso CGA-KE, NMP-KE und BB-KE eine Modulation der GST-Enzymaktivität in HT29-Zellen bewirken können.

In vorangegangenen Studien zeigten CGA-Kaffee und NMP-Kaffee eine potente Induktion der Gentranskripte von Phase-II-Enzymen und Nrf2 *in vivo* [Dissertation Böttler, 2009]. Als weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob ferner Kaffee Brazil Blend eine Induktion von Phase-II-Enzymen und Nrf2 *in vivo* vermittelt und dadurch dessen Konsum zu einer Verbesserung der enzymatischen Abwehr beitragen kann. Im Rahmen einer humanen Interventionsstudie wurden deshalb, nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend, periphere Blutlymphozyten von Probanden auf eine Steigerung der Gehalte an Gentranskripten ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 untersucht.

Im dritten Untersuchungsabschnitt sollten Kaffeeinhaltsstoffe identifiziert werden, die eine Steigerung antioxidativ-wirksamer Phase-II-Enzyme vermitteln, um so eine Verbesserung der wissenschaftlichen Grundlage für ein optimiertes Kaffeegetränk im Sinne einer Anreicherung gesundheitsfördernder Kaffeebestandteile erreichen zu können. Im Zuge dessen wurde der in der Literatur noch wenig untersuchte Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin, bezüglich der Beeinflussung ausgewählter Phase-II-Enzyme, näher charakterisiert. Als Untersuchungsparameter sollten die Nrf2 Kerntranslokation, die Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 sowie die GST-Enzymaktivität in HT29-Zellen betrachtet werden. Des Weiteren wurden die Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin in unterschiedlichen Kombinationen miteinander in HT29-Zellen kokubiert und anschließend die Gentranskripte ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 erfasst, um deren mögliche synergistische, antagonistische und additive Effekte im Kaffeegetränk zu untersuchen. In Annäherung an die *in vivo* Situation wurden die Konzentrationen von CGA, NMP und Trigonellin in konsumrelevanten Konzentrationen eingesetzt, wie sie nach dem Konsum der Studienkaffees an den Darmepithelzellen, sowie systemisch im Blutplasma vorliegen könnten.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zelluläre Wirkmechanismen von Kaffeeextrakten *in vitro*

Im ersten Abschnitt dieser Dissertation sollten drei Kaffeeextrakte (KE) hinsichtlich ihrer Wirkung auf ARE-regulierte Phase-II-Enzyme in HT29-Zellen untersucht werden. Im Fokus der Untersuchungen lag der Nrf2/ARE-Signalweg als möglicher Wirkmechanismus und darauf folgend die Modulation der Transkription sowie der Enzymaktivität ausgewählter Phase-II-Enzyme. Die Kaffeeextrakte wurden aus verschiedenen Kaffees gewonnen, die durch Unterschiede in der Röstung als Hauptmerkmal voneinander abweichende Zusammensetzungen der als Leitverbindungen bezeichneten Inhaltsstoffe *n*-Chlorogensäure (CGA) und *N*-Methylpyridinium (NMP) enthalten sollten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung von CGA-Kaffee, NMP-Kaffee, Kaffee Brazil Blend sowie eines Standardkaffee [AG Hofmann, TUM]. CGA: *n*-Chlorogensäure; NMP: *N*-Methylpyridinium.

	CGA	NMP	Trigonellin
	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
CGA-Kaffee	819,2	5,3	444,1
NMP-Kaffee	82,6	73,7	96,9
Kaffee Brazil Blend	287,4	71,7	263,6
Standardkaffee	600-700	20-30	170-350

Ziele dieser ersten Untersuchungsreihe waren, zelluläre Mechanismen der drei Kaffeeextrakte zu erfassen, Unterschiede in den Wirkprofilen zu identifizieren um daraus mögliche Rückschlüsse auf den Beitrag der Leitverbindungen CGA und NMP ableiten zu können.

4.1.1 Hemmung des Zellwachstums durch Kaffeeextrakte

Substanzbedingte Veränderungen des Zellwachstums können eine Beeinflussung zellulärer Signalgebung nach sich ziehen. Der Einfluss der drei Kaffeeextrakte (KEs) CGA-KE, NMP-KE und BB-KE auf das Zellwachstums von HT29-Zellen wurden mithilfe des Sulforhodamin B (SRB) Assays nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht.

Eine aktuelle Studie ließ einen Anstieg von extrazellulärem H_2O_2 um das elf-fache nach 24 h Inkubation mit gefiltertem Kaffee sowie Espresso im zellfreien System unter Zellkulturbedingungen (37°C , 5% CO_2) im Vergleich zur frisch zubereiteten Kaffeeprobe in Wasser beobachten [Hegele et al., 2009]. Ebenso konnten die Untersuchungen im Rahmen des Projektes eine deutliche, konzentrationsabhängige H_2O_2 Bildung im extrazellulären Bereich durch eine 24 h Inkubation mit KEs in HT29-Zellen erkennen lassen [Dissertation Bakuradze, 2010]. Um Artefakte einer extrazellulären H_2O_2 Generierung zu vermeiden, wurden Zellkulturuntersuchungen mit KEs unter Zusatz von 100 U/ml Katalase durchgeführt. Die Inkubation mit CGA-KE zeigte in HT29-Zellen nach 24 h einen konzentrationsabhängigen Rückgang des Zellwachstums von 1 $\mu\text{g/ml}$ ($101,3 \pm 5,4$ % Zellwachstum) bis 500 $\mu\text{g/ml}$ ($58,2 \pm 5,1$ % Zellwachstum) (Abbildung 24, A). Im Vergleich dazu scheint NMP-KE von 1-100 $\mu\text{g/ml}$ keine zytotoxischen Effekte hervorzurufen, das Zellwachstum lag über 90 % (Abbildung 24, B). Im höheren Konzentrationsbereich zeigte sich hingegen ein potenter Rückgang des Wachstums von HT29-Zellen auf $49,1 \pm 8,6$ % bei 250 $\mu\text{g/ml}$ bzw. auf $51,4 \pm 4,8$ % bei 500 $\mu\text{g/ml}$ NMP-KE. Ebenso wie NMP-KE war bei BB-KE in den Konzentrationen von 1-100 $\mu\text{g/ml}$ ein Zellwachstum über 90 % zu beobachten (Abbildung 24, C). Bei 250 $\mu\text{g/ml}$ BB-KE ergab sich eine Verminderung des Zellwachstums auf 79,3 %, welches bei 500 $\mu\text{g/ml}$ weiter auf $60,9 \pm 3,3$ % absank. Im Vergleich der drei KE zeigte BB-KE die geringsten zellwachstumshemmenden Effekte, das Zellwachstum sank bei keiner Konzentration unter 60 %. CGA-KE und NMP-KE beeinflussten das Wachstum von HT29-Zellen in vergleichbarem Maße. Zwar trat bei 100 $\mu\text{g/ml}$ CGA-KE im Vergleich zum NMP-KE ein vermehrter Rückgang des Zellwachstums auf, allerdings zeigte NMP-KE in höheren Konzentrationen ausgeprägtere zellwachstumshemmende Effekte. Gemeinsam ist allen drei KEs, dass sie nach 24 h Inkubation zu einer Verminderung des Zellwachstums unter 80 % ab einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ KE führen.

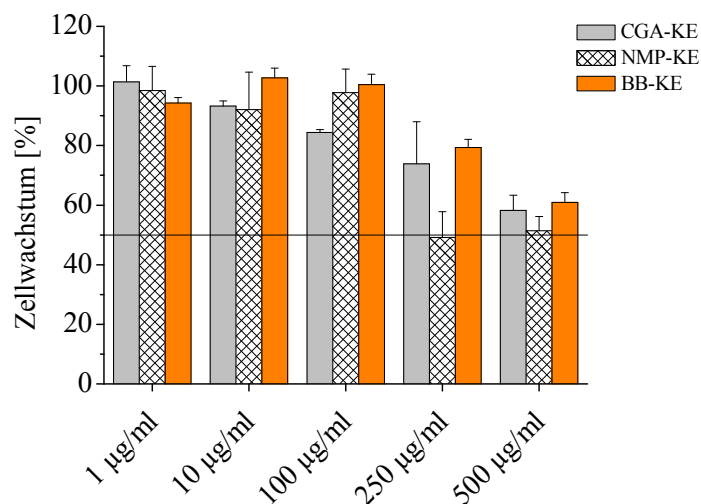


Abbildung 24: Hemmung des Zellwachstums von HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE und BB-KE mittels SRB-Test. Serumhaltige Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung. KE: Kaffeeextrakt.

Im Gegensatz dazu konnten Böttler et al. (2010) bei Untersuchungen von Extrakten, hergestellt aus Kaffee aus den handelsüblichen Rohkaffeeprovenienzen Arabica Brazil, Arabica Columbia sowie Robusta India, im Konzentrationsbereich 1-500 µg/ml keine Verminderung des Zellwachstums in HT29-Zellen nach 24 h und 48 h feststellen. Begründet sein könnte diese Diskrepanz durch die stark erhöhten Gehalte von CGA und NMP der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Extrakte im Vergleich zu handelsüblichen Produkten. So zeigen BB-KE und NMP-KE einen mehr als doppelt so hohen Gehalt an NMP gegenüber einem Standardkaffee (vgl. Tabelle 7). Die Beeinflussung des Zellwachstums nach 24 h Inkubation mit NMP wurde im Konzentrationsbereich von 1-500 µM untersucht, wobei sich selbst in der maximal eingesetzten Konzentration nur eine marginale Verminderung auf $92,1 \pm 12,8$ % beobachten ließ [Dissertation Böttler, 2009]. 250 µg/ml BB-KE enthalten 12,5 µM NMP, womit wachstumshemmende Einflüsse des KE unter Mitwirkung von NMP unwahrscheinlich erscheinen. Aufgrund des vergleichbaren NMP-Gehaltes in NMP-KE gilt hierfür die gleiche Einschätzung. Ebenso liegen für die Kaffeeinhaltsstoffe CGA und Trigonellin, beide Substanzen im Vergleich zum Standardkaffee überdurchschnittlich erhöht in CGA-KE, Daten zur Wachstumshemmung in HT29-Zellen für 24 h vor. Trigonellin zeigte einen marginalen Rückgang des Zellwachstums bei 500 µM ($89,9 \pm 11,4$ % Zellwachstum)

(vgl. Abschnitt 4.3.1), wobei der Gehalt an Trigonellin in 250 µg/ml CGA-KE mit 56 µM jedoch weitaus geringer liegt. Weitere Daten über Effekte von Trigonellin auf das Zellwachstum sind in der Literatur nicht bekannt. Allerdings zeigten toxikologische Untersuchungen bei Mäusen nach oraler Gabe von Trigonellin, dass erst ab einer verhältnismäßig hohen Dosis von 40 mg/kg die Darmbeweglichkeit signifikant reduziert wurde [Czok, 1965]. Anhand dessen, sowie dem Resultat, dass im Rahmen dieser Dissertation keine zytotoxischen Effekte durch Trigonellin vermittelt wurden, ist ein Einfluss von Trigonellin am verminderten Wachstum von HT29-Zellen nach Inkubation mit CGA-KE kaum anzunehmen. CGA vermittelte ab einer Konzentration von 250 µM einen Rückgang des Zellwachstums um etwa 25 % [Dissertation Böttler, 2009]. Für die Untersuchung des Wachstums von HT29-Zellen nach 72 h Inkubation mit CGA ließ sich ein IC_{50} -Wert von 205 ± 53 µM ermitteln. [Dissertation Kern, 2006]. Die Gehalte an CGA in 250 µg/ml CGA-KE liegen bei 16,5 µM, somit unterhalb der Bereiche, in denen eine Beeinflussung des Zellwachstums beobachtet werden konnte, weshalb ein Beitrag von CGA an den wachstumshemmenden Eigenschaften im KE nicht anzunehmen ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien von Glei et al. (2006), die die Zellzahl von HT29-Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h untersuchten. Die Inkubation mit CGA (0-500 µM) verminderte das Zellüberleben nur marginal, während ein Extrakt von Antioxidantien gewonnen aus Kaffee (600 µg/ml) signifikant die Zellzahl verminderte. Ein direkter Einfluss der Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin an den zytotoxischen Effekten der drei KEs ist anhand der vorliegenden Daten nicht anzunehmen. Allerdings kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass durch ein Zusammenspiel mehrerer Kaffeeinhaltsstoffe zellwachstumshemmende Effekte auftreten können. Ebenso muss in Betracht gezogen werden, dass bisher nicht identifizierte Inhaltsstoffe zur Verminderung des Zellwachstums durch KE ab Konzentrationen > 100 µg/ml beitragen können.

Eine aktuelle Untersuchung von Hegele et al. (2009) konnte einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität von bovinen Aortaendothelzellen (GM-7373) durch gefilterten Kaffee und Espresso nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle um 90 bzw. 81 % beobachten. In weiterführenden Messungen zeigte sich, dass der Zusatz von Katalase die Zytotoxizität vermindern konnte, jedoch nicht auf den Gehalt der PBS-Kontrolle. Dazu passend stehen Studien, mit humanen Intestinalzellen (407) nach Inkubation mit Instant-Kaffee (2 mg/ml), wonach das Zellüberleben durch Zusatz von Katalase (1000 U/ml) und in noch potenterer

Weise, durch Peroxidase (1 U/ml) im Vergleich zur Inkubation ohne Enzymzusatz anstieg [Itagaki et al., 1992]. Verschiedene Studien stellten übereinstimmende fest, dass Kaffee *in vitro* hohe Konzentrationen an H_2O_2 im Inkubationsmedium generieren kann [Hegele et al., 2009; Muscat et al., 2007; Itagaki et al., 1992]. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten KEs wurden unter Zusatz von 100 U/ml Katalase inkubiert. Untersuchungen zeigten, dass die durch Apfelextrakte generierte Menge an H_2O_2 in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation unter Katalasezusatz (100 U/ml) bis auf den Gehalt der DMSO-Kontrolle unterdrückt werden kann [Diplomarbeit Volz, 2007]. Der Einfluss von extrazellulär gebildetem H_2O_2 auf das Wachstum von HT29-Zellen durch KE scheint aufgrund des Katalasezusatzes von 100 U/ml unwahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigen die drei KEs eine Verminderung des Zellwachstums in HT29-Zellen nach 24 h ab Konzentrationen $> 100 \mu\text{g/ml}$. Die Inhaltsstoffe CGA und NMP scheinen eher einen untergeordneten Beitrag an den wachstumshemmenden Effekten der KEs zu leisten. Das Zusammenspiel mehrerer Kaffeeinhaltsstoffe als Modulatoren auf zelltoxischer Ebene ist denkbar. Festzuhalten bleibt allerdings, dass das Zellwachstum nach der Inkubation mit KE erst in Konzentrationen $> 100 \mu\text{g/ml}$ einen kritischen Rückgang unter 80 % Zellwachstum erreichte. Die Untersuchungen an HT29-Zellen in Konzentrationsbereichen $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ scheinen demnach unter Ausschluss von wachstumshemmende Effekten durchführbar zu sein.

4.1.2 *Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies*

Der Nrf2/ARE-Signalweg kann als antioxidativer Abwehrmechanismus infolge der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert werden. Andererseits sind exogene oder endogene Elektrophile in der Lage, über den Nrf2/ARE-Signalweg Phase-II-Enzyme zu induzieren [Kensler et al., 2010]. Die gesundheitsschädlichen Wirkungen von oxidativem Stress, verursacht durch ROS, sind hinlänglich bekannt [vgl. Kapitel 2.1]. Eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges und darauf folgend die Induktion von Phase-II-Enzymen im Sinne einer chemopräventiven Wirkung durch Kaffeeinhaltsstoffe kann nur dann postuliert werden, wenn der zugrundeliegende Wirkmechanismus unter Ausschluss von intrazellulär gebildeten ROS abläuft. Mithilfe des Dichlorofluorescein (DCF) Assays kann intrazellulär gebildetes ROS bestimmt werden. CGA-KE, NMP-KE [Dissertation Böttler, 2009] und BB-KE wurden nach einer 3 h Inkubation von HT29-Zellen auf ihre ROS-generierenden Einflüsse

untersucht. Extrazellulär gebildetes H_2O_2 ist in der Lage die Zellmembran zu passieren und so Effekte im Zellinneren zu beeinflussen [Hegele et al., 2009]. Um extrazellulär gebildetes H_2O_2 abzufangen, wurden 100 U/ml Katalase zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten 20 μM 2-Methylnaphtochinon (Menadion), das unter Redox-Cycling ROS bilden kann [Eisenbrand, 2005].

Für CGA-KE konnte eine signifikante, intrazelluläre ROS Bildung ab 100 ng/ml ($129,5 \pm 6,9 \%$) bis zu einem Maximum von 100 $\mu\text{g/ml}$ ($189,2 \pm 21,8 \%$) beobachtet werden (Abbildung 25, A). Im Gegensatz dazu zeigte NMP-KE lediglich bei 100 $\mu\text{g/ml}$ einen leichten, nicht signifikanten Anstieg des ROS Gehaltes auf $135,2 \pm 25,8 \%$ (Abbildung 25, B). Ebenso konnte für BB-KE keine signifikante Bildung von ROS im intrazellulären Bereich festgestellt werden (Abbildung 25, C). Der höchste Anstieg war mit $128,9 \pm 19,3 \%$ bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ BB-KE zu beobachten.

Im Vergleich der drei KEs trat der CGA-KE durch eine deutliche ROS Bildung hervor. CGA-KE wurde mittels DCF-Assay auf eine Modulation des zellulären ROS-Gehaltes in HT29-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht [Dissertation Bakuradze, 2010]. Dabei nahm der TBH-induzierte intrazelluläre ROS-Gehalt durch CGA-KE (1-250 $\mu\text{g/ml}$) nur leicht ab. Möglicherweise deutet sich hierbei an, dass die Generierung von intrazellulären ROS durch CGA-KE nach 3 h auch nach 24 h noch sichtbar ist, so dass durch CGA-KE kein vermindertes antioxidatives Potential nach 24 h detektiert werden kann. Fraglich bleibt, welche Inhaltsstoffe in CGA-KE zu dessen ROS-generierenden Einflüssen nach 3 h beitragen. Wie Tabelle 7 zeigt, besitzt CGA-KE deutlich erhöhte Gehalte an CGA. Allerdings zeigte eine 3 h Inkubation mit CGA in HT29-Zellen im DCF Assay keine erhöhten ROS-Gehalte im Bereich von 10 nM bis 500 μM . Hingegen kam es zwischen 10 μM bis 100 μM zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Abnahme an ROS [Böttler et al., 2010]. CGA wird vielmehr in Verbindung gebracht, als Radialfänger zu reagieren. CGA zeigte, ebenso wie sechs weitere, aus der grünen Kaffeebohne isolierten Hydroxyzimtsäurederivate, die Fähigkeit Superoxidradikalanione abzufangen [Iwai et al., 2004].

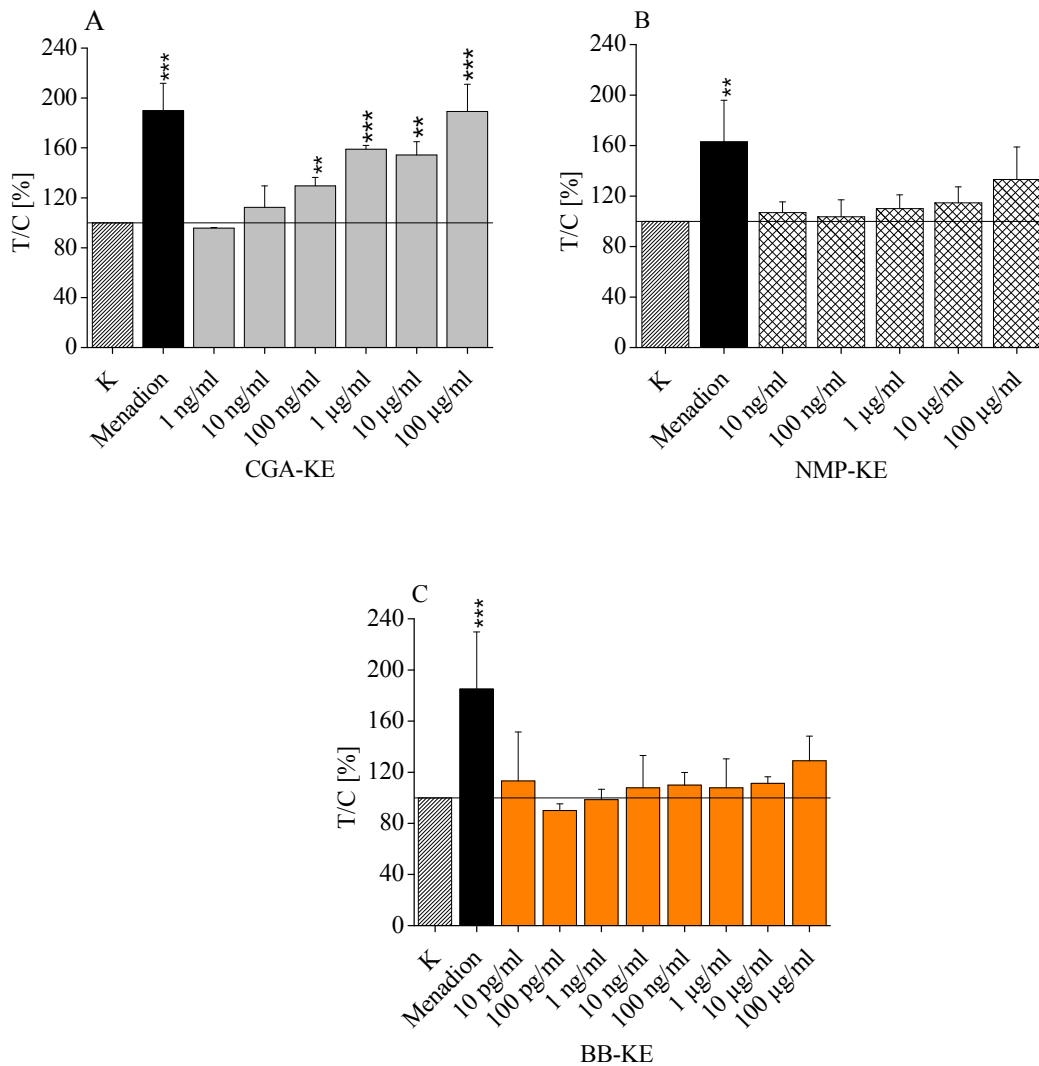


Abbildung 25: Generierung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach 3 h Inkubation mit (A) CGA-KE, (B) NMP-KE [Dissertation Böttler, 2009] und (C) BB-KE in HT29-Zellen mittels DCF-Assay. Serumfreie Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). Positivkontrolle: Menadion (20 µM). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. KE: Kaffeeextrakt; K=Kontrolle.

Weiterhin wurde mittels DCF Assay getestet, ob CGA die durch H_2O_2 induzierte intrazelluläre ROS Akkumulation in Phäochromozytomzellen (PC12) modulieren kann. Es ließ sich beobachten, dass die Zugabe von 1 und 5 µM CGA nach 15 min Inkubation mit H_2O_2 (200 µM) signifikant den ROS-Gehalt, im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz, minimierte [Cho et al., 2009]. Bestätigt wird dies durch Untersuchungen über den TBH-induzierten ROS-Gehalt in HT29-Zellen, der durch den Zusatz von CGA (10-30 µM) effektiv

vermindert werden konnte [Dissertation Bakuradze, 2010]. Anhand der aktuellen Datenlage scheint CGA die ROS-generierenden Eigenschaften von CGA-KE nicht zu verantworten. Neben CGA ist weiterhin Trigonellin in erhöhtem Maße in CGA-KE enthalten. Es liegen keine Daten zur intrazellulären ROS-Generierung von Trigonellin vor. Mehrere Studien konnten für Trigonellin keine Radikalfänger-Aktivität nachweisen [Hirikawa et al., 2005; Ogata et al., 2002]. Allerdings zeigten Studien zum antioxidativen Potential von Trigonellin in Konzentrationen von 30 und 100 μM eine Reduzierung des TBH-induzierten ROS-Gehaltes [Dissertation Bakuradze, 2010]. Hinweise darauf, dass Trigonellin an der ROS Bildung von CGA-KE beteiligt ist, lassen sich folglich nicht finden. Ein Kaffeeinhaltsstoff, dem eine ROS-bildende Wirkung zugesprochen wird, ist 1,2,4-Trihydroxybenzol (Hydroxyhydrochinon) [Hiramoto et al., 1998]. Allerdings sind die Gehalte an 1,2,4-Trihydroxybenzol in CGA-KE (2,7 mg/l) um mehr als die Hälfte geringer im Vergleich zu NMP-KE (7,0 mg/l), der bekanntlich keine ROS-generierenden Eigenschaften besitzt. Ein Beitrag von 1,2,4-Trihydroxybenzol zu den ROS-generierenden Effekten von CGA-KE erscheint damit eher unwahrscheinlich. Es ist somit fraglich, welche Kaffeeinhaltsstoffe zur ROS-Bildung von CGA-KE beitragen. Denkbar ist, dass synergistische Effekte mehrerer Kaffeeinhaltsstoffe für die hier erfasste prooxidative Wirkung verantwortlich sind.

In ihrer Eigenschaft, intrazelluläre ROS zu generieren, lässt sich für NMP-KE und BB-KE ein vergleichbares Resultat beobachten. Erst ab 100 $\mu\text{g/ml}$ war ein Anstieg zu detektieren, der jedoch keine Signifikanz erkennen ließ. Der NMP-Gehalt von NMP-KE (73,7 mg/l) und BB-KE (71,7 mg/l) ist annähernd gleich, so dass sich die Frage stellt, ob NMP in diesem Zusammenhang einen Beitrag leistet. Eine 3 h Inkubation mit NMP in HT29-Zellen zeigte im DCF Assay bei 100 μM ($73,5 \pm 21,4 \%$) einen Rückgang der ROS Bildung im Vergleich zur DMSO Kontrolle [Dissertation Böttler, 2009]. 100 $\mu\text{g/ml}$ BB-KE enthalten 5 μM NMP und somit eine NMP Konzentration, in der die Reinsubstanz keine Modulation des intrazellulären ROS-Gehaltes zeigte. Der Anstieg der ROS-Bildung bei 100 $\mu\text{g/ml}$ BB-KE scheint somit nicht auf NMP zurückgeführt werden zu können. Eine ähnliche Annahme scheint für NMP-KE aufgrund der nahezu gleichen Konzentrationen an NMP postulierbar. Weiterhin kann der Frage nachgegangen werden, ob NMP in der Lage ist, ROS abzufangen und somit für die unterschiedliche Wirkung des NMP-armen CGA-KE im Vergleich zum den NMP-reichen NMP-KE bzw. BB-KE mitverantwortlich ist. Eine TBH-induzierte ROS-Erhöhung wurde nach 24 h in HT29-Zellen über einen Konzentrationsbereich von 1 bis 250 μM durch NMP

intrazellulär nicht reduziert [Dissertation Bakuradze, 2010]. Im Vergleich dazu postulieren Votavova et al. (2009), dass NMP ein wichtiges Antioxidans im Kaffee ist. Sie beziehen ihre Vermutungen auf die Messung der totalen antioxidativen Kapazität (TAC) von Kaffee, welche im Laufe des Röstens einen annähernd gleichbleibenden Status behält, während bekannte Antioxidantien wie Chlorogensäuren oder andere Polyphenole abnehmen. Weiterhin beziehen sie sich auf Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von Kaffee in Abhängigkeit des Röstgrades, wobei gezeigt werden konnte, dass die antioxidative Kapazität im Kaffee mit steigendem Röstgrad ansteigt [Del Castillo et al., 2002]. Es ist bekannt, dass der Gehalt von Röstprodukten, aber auch von NMP, mit der Röstzeit zunimmt [Stadler et al., 2002a]. Allerdings ist die maximale antioxidative Kapazität bei medium geröstetem Kaffee zu beobachten und nicht bei stark gerösteten Kaffee. Deshalb scheinen neben den Röstprodukten noch weitere Kaffeeinhaltsstoffe die TAC von Kaffee beeinflussen zu können. Zusammenfassend lässt sich in der Literatur kein Anhaltspunkt dafür finden, dass NMP die Fähigkeit besitzt, intrazellulär als Radikalfänger zu wirken.

Modulationen des intrazellulären ROS-Gehaltes in HT29-Zellen nach Inkubation mit den drei KEs scheinen anhand der vorliegenden Daten nicht ausschließlich durch einzelne Kaffeeinhaltsstoffe verursacht zu werden. Der Inkubation mit den KEs wurde 100 U/ml Katalase zugesetzt, um extrazellulär gebildetes ROS abzufangen. Fraglich ist, ob diese Enzymmenge für den CGA-KE ausreichend war und nicht extrazellulär gebildetes H_2O_2 durch die Zellmembran gelangte und den intrazellulär gemessenen ROS-Gehalt modulierte. Untersuchungen zeigten, dass CGA-KE nach 24 h in HT29-Zellen extrazellulär größere Mengen an H_2O_2 bildete im Vergleich zum NMP-KE. In weiterführenden Untersuchungen konnte zwar nachgewiesen werden, dass der Zusatz von 100 U/ml Katalase H_2O_2 bis zum Gehalt der Kontrolle abbaut, allerdings liegen hierzu nur Daten für eine Inkubationszeit von 24 h vor [Dissertation Bakuradze, 2010]. Es scheint denkbar, dass nach 3 h Inkubation mit CGA-KE größere Mengen an H_2O_2 gebildet werden, die durch 100 U/ml nicht vollständig abgebaut werden können. Studien von Hegele et al. (2009) konnten zeigen, dass die Zytotoxizität von Kaffee, allem Anschein nach verursacht von H_2O_2 , durch den Zusatz von Katalase (100 U/ml) zwar minimiert werden konnte, allerdings nicht vollständig eliminiert wurde, weshalb nicht komplett ausgeschlossen werden kann, dass die extrazelluläre H_2O_2 -Generierung von CGA-KE für den erhöhten ROS-Gehalt im intrazellulären Bereich verantwortlich sein könnte.

Zusammenfassend zeigen die drei KEs eine unterschiedliche Modulation des intrazellulären ROS-Gehaltes, mit einer eindeutig stärkeren Potenz von CGA-KE. Die deutlich erhöhten Gehalte an CGA und Trigonellin in CGA-KE scheinen jedoch nicht für die ROS-generierende Effekte mitverantwortlich zu sein. Weiterführende Untersuchungen sollten angeschlossen werden um zu klären, ob der Katalasezusatz von 100 U/ml vollständig extrazelluläres H₂O₂ disproportionieren kann. Aufgrund der ROS-generierenden Effekte von CGA-KE in höheren Konzentrationen müssen die Ergebnisse zur Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweg im Bezug auf eine chemoprotektive Wirkung kritisch betrachtet werden. NMP-KE sowie BB-KE zeigen geringe ROS-bildende Effekte, mit einem annähernd gleichen Wirkprofil. Trotz des annähernd analogen Gehaltes an NMP kann keine Interaktion dieses Kaffeeinhaltsstoffes mit der intrazellulären Modulation von ROS postuliert werden. Insgesamt betrachtet tragen vermutlich weitere Inhaltsstoffe, als jene auf deren Fokus diese Dissertation lag, zu den intrazellulären ROS-generierenden Effekten bei.

4.1.3 *Modulation der Nrf2-Kerntranslokation durch Kaffeeextrakte*

Der Einfluss der KEs auf den Nrf2/ARE-Signalweg wurde mittels Western Blot Analyse untersucht, wobei eine Erhöhung des nukleären Nrf2-Gehaltes auf dessen Translokation in den Zellkern schließen lässt. Die Inkubationszeit in HT29-Zellen betrug 3 h mit dem Zusatz von 100 U/ml Katalase.

In Abbildung 26 ist der Einfluss von CGA-KE auf die Nrf2-Kerntranslokation dargestellt. Über den gesamten Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 500 µg/ml stieg der Nrf2 Kerngehalt nicht über das Kontrollniveau von 100 % an, was auf eine fehlende Kerntranslokation von Nrf2 hinweist. Vielmehr war über einen Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 500 µg/ml eine zum Teil signifikante Abnahme des nukleären Nrf2-Gehaltes festzustellen, welche zwei minimale Werte bei 100 ng/ml ($59,1 \pm 9,2$ %) und 100 µg/ml ($61,7 \pm 8,8$ %) aufwies. CGA-KE modulierte den zytosolischen Nrf2-Gehalt sehr heterogen. Während über den gesamten Konzentrationsbereich sowohl bei niedrigen (10 pg/ml) als auch bei hohen (500 µg/ml) CGA-KE Gehalten insgesamt viermal signifikante Abnahmen an zytosolischem Nrf2-Protein erfasst wurden, waren zwischen 100 pg/ml bis 10 ng/ml erhöhte Gehalte festzustellen.

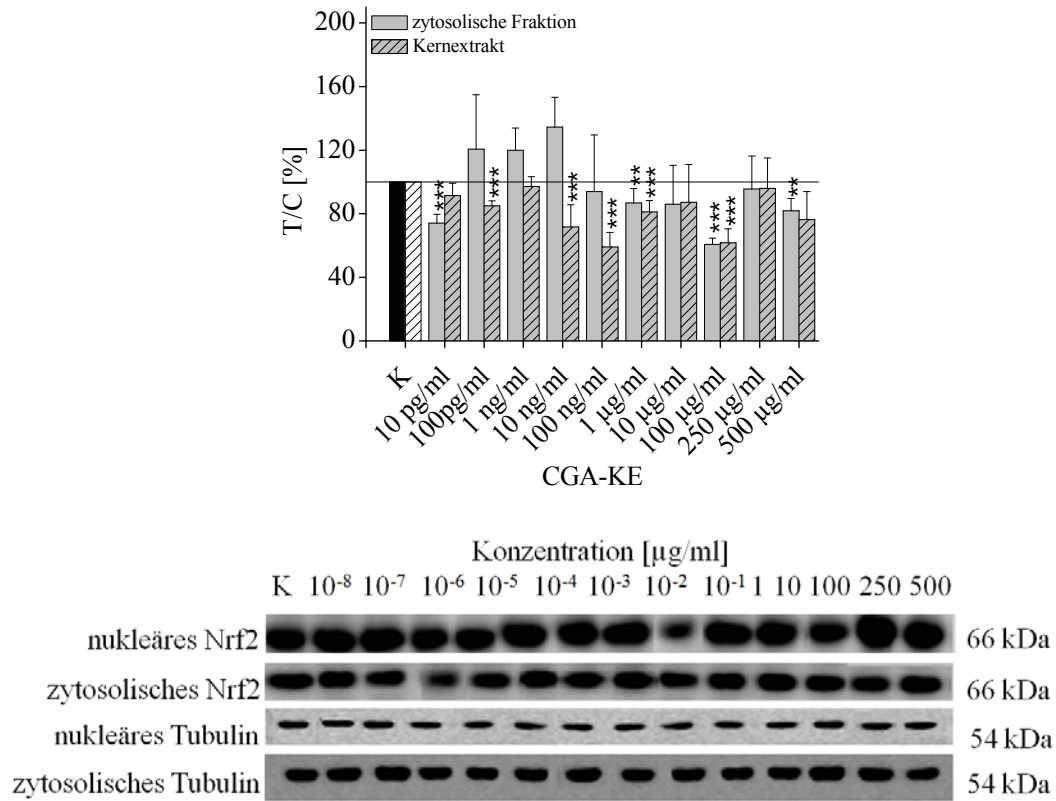


Abbildung 26: Nrf2-Kerntranslokation und repräsentatives Blotbild nach 3 h Inkubation mit CGA-KE in HT29-Zellen mittels Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). Beladungskontrolle: Tubulin. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. 10 fg/ml-1 pg/ml orientierende Messung mit n=2. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle); ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. KE: Kaffeeextrakt, K=Kontrolle.

Die potenteste, jedoch nicht signifikante Zunahme lag bei $134,5 \pm 18,8 \%$ in der Konzentration von 10 ng/ml. Ein Minimum an zytosolischem Nrf2-Protein konnte bei 100 µg/ml CGA-KE ($60,7 \pm 4,0 \%$) festgestellt werden. Eine 3 h Inkubation von HT29-Zellen mit NMP-KE ließ den nukleären Nrf2-Gehalt in den Konzentrationen von 10-250 µg/ml signifikant ansteigen, mit einem Maximum von $158,8 \pm 15,7 \%$ bei 100 µg/ml (Abbildung 27). Niedrigere Substanzinkubationen von 100 ng/ml bis 10 pg/ml führten hingegen zu einer signifikanten Verminderung von Nrf2-Kernprotein, mit einem Minimum bei 100 pg/ml ($62,4 \pm 15,5 \%$). Der Einsatz von 1 pg/ml zeigte in ersten orientierenden Messungen einen Wiederanstieg des nukleären Nrf2-Gehaltes auf den „no effect Level“ bei $103,3 \pm 12,9 \%$.

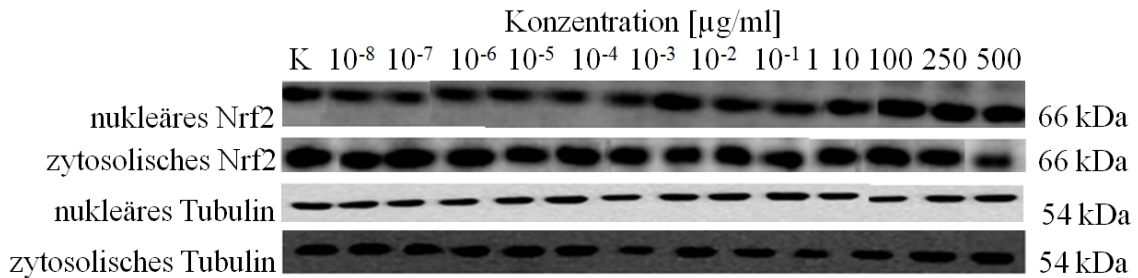
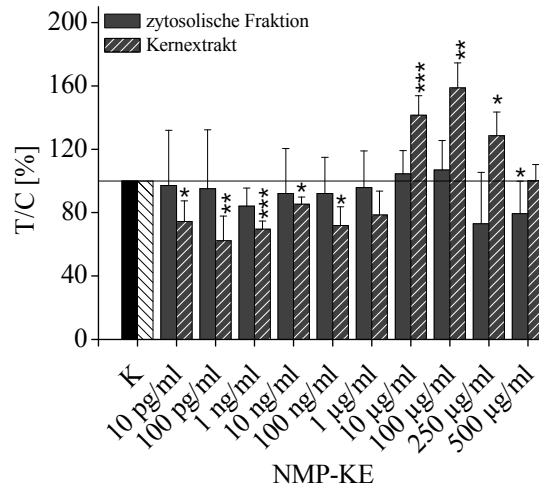


Abbildung 27: Nrf2-Kerntranslokation und repräsentatives Blotbild nach 3 h Inkubation mit NMP-KE in HT29-Zellen mittels Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). Beladungskontrolle: Tubulin. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. 10 fg/ml-1 pg/ml orientierende Messung mit n=2. Student's t-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. KE: Kaffeeextrakt, K=Kontrolle.

Der zytosolische Nrf2-Gehalt ließ nur bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen eine Modulation beobachten. Für 250 µg/ml NMP-KE war ein nicht signifikanter Rückgang auf $73,1 \pm 32,3$ % zu detektieren. 500 µg/ml verminderten zytosolisches Nrf2-Protein signifikant auf $79,3 \pm 20,6$ %. Der nukleäre Nrf2-Gehalt nach Inkubation mit BB-KE wies zwischen 1 ng/ml bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 100 µg/ml einen signifikanten Anstieg auf (Abbildung 28). Ein konzentrationsabhängiger Anstieg konnte in den eingesetzten Gehalten von 100 ng/ml bis 100 µg/ml BB-KE festgestellt werden, wobei der potenteste Effekt auf die nukleäre Translokation von Nrf2 bei 10 ng/ml ($225,3 \pm 10$ %) lag. Eine signifikante Abnahme an Nrf2 Kernprotein auf $72,8 \pm 18$ % war bei 10 pg/ml BB-KE zu

beobachten. Der zytosolische Nrf2-Gehalt zeigte im gesamten Konzentrationsbereich keine signifikante Modulation.

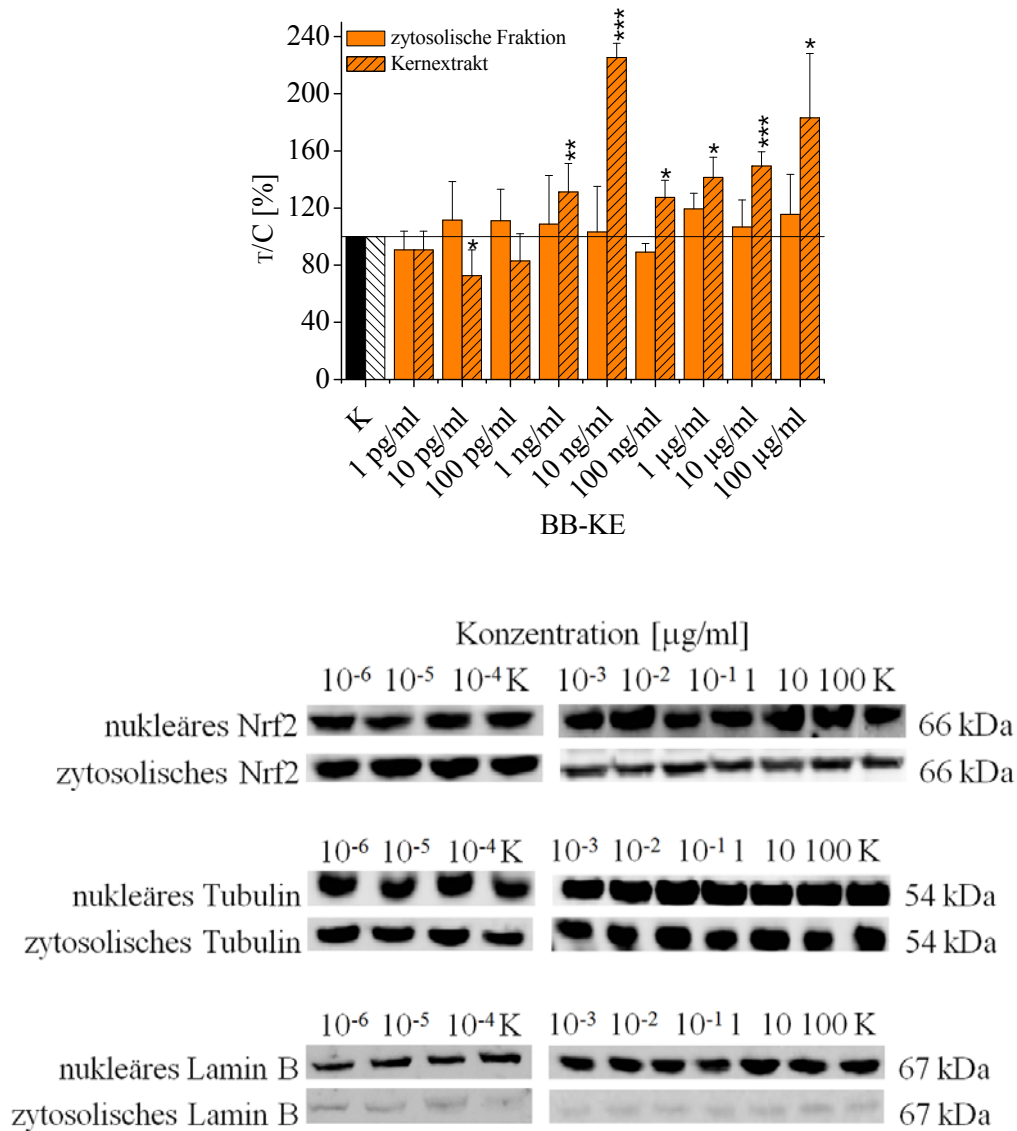


Abbildung 28: Nrf2-Kerntranslokation und repräsentatives Blotbild nach 3 h Inkubation mit BB-KE in HT29-Zellen mittels Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). Beladungskontrolle: Tubulin, Kontrolle der Trennung von zytosolischer Fraktion und Kernextrakt: Lamin B. MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,005. KE: Kaffeeextrakt, K=Kontrolle.

Die dargestellten Untersuchungen sollten klären, ob die drei KEs den Nrf2/ARE-Signalweg beeinflussen können. Während NMP-KE und BB-KE zu einer Erhöhung der Nrf2-Kerntranslokation führten, konnte für CGA-KE eine potente und über weite Konzentrationsbereiche signifikante Abnahme an Nrf2-Gesamtprotein beobachtet werden. In

der Literatur berichten einige Studien von einer Modulation des Nrf2/ARE-Signalweges durch Kaffee bzw. Kaffeeinhaltsstoffen [Tinh et al., 2010; Cavin et al., 2008; Tao et al., 2008]. So wird die Nrf2-Luciferase-Reporteraktivität nach 24 h durch Kaffee in Konzentrationen von 800 µg/ml in humanen Lungen-AREc32-Zellen signifikant erhöht [Cavin et al., 2008]. Eine Translokation von Nrf2 in den Zellkern wurde vor allem durch die Kaffeeinhaltsstoffe Cafestol und Kahweol gezeigt [Higgins et al., 2007]. Ein erhöhter Nrf2-Kernextrakt konnte nach 1 h, 3 h und 6 h Inkubation von 10 µM Kahweol in humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) im Western Blot detektiert werden [Hwang et al., 2008].

Anhand dieser vielversprechenden Literatur im Bezug auf die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch Kaffee stellt sich die Frage, weshalb CGA-KE in diesem Zusammenhang keine Translokation in den Zellkern vermittelt. Bei den höher eingesetzten Konzentrationen (ab 250 µg/ml) könnten wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, zytotoxische Einflüsse eine Rolle spielen und insbesondere für den Rückgang des Gesamtproteingehaltes von Nrf2 bei 500 µg/ml erklärend sein. Die Leitverbindung CGA liegt in 100 µg/ml CGA-KE in Gehalten von 6,6 µM vor. Die Reinsubstanz CGA zeigte keine signifikante Abnahme an nukleärem oder zytosolischem Nrf2, sondern ließ eine signifikante Kerntranslokation von Nrf2 in Konzentrationsbereichen von 10 nM bis 500 µM nach einer 3 h Inkubation in HT29-Zellen erkennen [Böttler et al., 2010]. Anhand dessen kann zumindest im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 100 µg/ml der Inhaltsstoff CGA nicht für die zum Teil signifikante Verminderung des Gesamtproteingehaltes an Nrf2 durch CGA-KE verantwortlich sein. In Übereinstimmung hierzu ist in der Literatur ein Anstieg an nukleärem Nrf2-Protein nach Inkubation mit CGA zu finden. Eine 3 h Inkubation mit 40 µM CGA in Mausepithelzellen (JB6) sowie eine 3 h, 6 h und 9 h Inkubation von murinen Hepatomzellen (Hepa1c1c7) mit einem Derivat der CGA, 3-Kaffeoyl-4-dihydrokaffeoylchinasäure, ließen eine potente Zunahme der Nrf2-Kerntranslokation mittels Western Blot Analyse beobachten [Hwang et al., 2009; Feng et al., 2005].

Der Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin ist im Vergleich zu einem Standardkaffee in erhöhtem Maße in CGA-KE enthalten. Abschnitt 4.3.2 zeigt, dass eine 3 h Inkubation mit Trigonellin in HT29-Zellen im Konzentrationsbereich von 10 pM bis zu 100 nM eine teilweise signifikante Verminderung an zytosolischem sowie nukleärem Nrf2-Protein verursacht. 100 µg/ml CGA-KE enthalten 22,75 µM Trigonellin. Der Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 10 ng/ml CGA-KE enthält folglich kritische Gehalte an Trigonellin, bei denen in HT29-Zellen eine

Verminderung des Gesamtproteingehaltes an Nrf2 erfasst wurde. Eine Mitwirkung von Trigonellin am Rückgang des Gesamtproteingehaltes von Nrf2 durch Inkubation mit CGA-KE ist demnach möglich. Beachtet werden muss allerdings, dass der potenteste Rückgang an nukleärem Nrf2 bei 100 ng/ml sowie 100 µg/ml CGA-KE zu beobachten war. Die Konzentrationen liegen hierbei außerhalb der Effektkonzentrationen von Trigonellin, weshalb noch weitere Inhaltsstoffe in CGA-KE den potenten Rückgang von nukleärem Nrf2 zu bewirken scheinen. Eine Inkubationszeit von 3 h mit CGA-KE zeigte für 100 pg/ml bis 10 ng/ml weiterhin eine Zunahme an zytosolischem Nrf2-Protein. Wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, vermuteten Copple et al. (2008), dass der Translokation und Akkumulation von Nrf2 in den Zellkern bei Stimulation des Signalweges eine vermehrte *de novo* Synthese sowie ein verminderter proteosomaler Abbau im Zytosol, vorgeschaltet ist. Daher könnte postuliert werden, dass in Konzentrationen mit erhöhtem zytosolischem Nrf2 der anfängliche Schritt der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch eine vermehrte *de novo* Synthese sichtbar wird. Um diese Theorie zu bestätigen, fehlen allerdings weiterführende Untersuchungen des nukleären Nrf2-Gehaltes nach längerer Inkubationszeit mit CGA-KE.

Die NMP-reichen Extrakte, NMP-KE und BB-KE, bewirkten eine potente Erhöhung an nukleärem Nrf2, die bei beiden Extrakten bei 10 µg/ml und 100 µg/ml signifikant war. Untersuchungen ließen für 0,01 µM und 0,1 µM NMP eine potente und signifikante Zunahme des Kern-Nrf2-Gehaltes erkennen [Dissertation Böttler, 2009]. In den Konzentrationen von 10 µg/ml und 100 µg/ml BB-KE sind 0,5 µM bzw. 5 µM NMP enthalten. Vergleichbares gilt aufgrund des annähernd analogen Gehaltes an NMP für NMP-KE. Die signifikante Translokation von Nrf2 bei 10 µg/ml kann somit für beide KEs auf den Einfluss von NMP zurückgeführt werden. Weiterhin scheint der Anstieg von nukleärem Nrf2 durch BB-KE in niedrigen Konzentrationen (100 ng/ml bis 1 µg/ml) ebenso durch NMP bedingt zu sein, da in diesen Konzentrationen NMP im BB-KE in Gehalten vorliegt, in der NMP als Reinsubstanz potente Effekte zeigte. In Übereinstimmung mit den hier dargestellten Ergebnissen wird in verschiedenen Veröffentlichungen eine Beteiligung des Kaffeeinhaltsstoffes NMP an der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges angedeutet. Paur et al. (2010) untersuchten den Einfluss des Röstgrades auf die ARE-Aktivität mittels Luciferase-Reporterassays in humanen Leberkarzinomzellen (HepG2). Die ARE-Aktivität stieg mit dem Röstgrad signifikant an. Der Gehalt von NMP steigt mit zunehmender Röstung an [Stadler et al., 2002a]. Weiterhin zeigte NMP im Konzentrationsbereich von 0,018 µg/ml-18 µg/ml in humanen Kolonkarzinomzellen

(Caco-2) einen dosisabhängigen Anstieg des Phosphorylierungsstatus von p44/42 MAPK 10 min nach Substanzinkubation [Zill et al., 2003]. Die Induktion der MAPK Signalkaskade über p44/42 (EKR) kann zur Aktivierung von Nrf2 und ARE führen [Lin et al., 2010; Lim et al., 2007; Manandhar et al., 2007; Keum et al., 2006; Yu et al., 1999].

Im Unterschied zum BB-KE konnte für NMP-KE über ein Konzentrationsbereich von 1 pg/ml bis 100 ng/ml ein signifikanter Rückgang des nukleären Nrf2-Gehaltes beobachtet werden. In 100 ng/ml NMP-KE sind 4 nM Trigonellin enthalten, wodurch ersichtlich wird, dass Trigonellin von 1 pg/ml bis 100 ng/ml NMP-KE in Gehalten vorliegt, in denen der isolierte Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin eine Verminderung am Gesamt-Nrf2-Gehalt beobachten ließ (Abschnitt 4.3.2). Infolgedessen ist eine Beteiligung von Trigonellin am Rückgang des nukleären Nrf2-Gehaltes durch NMP-KE denkbar. BB-KE wurde ebenso in Konzentrationen eingesetzt, in denen Trigonellinkonzentrationen enthalten waren, die bei der Untersuchung der isolierten Kaffeeverbindung minimierende Effekte auf den Gesamt-Nrf2-Gehalt zeigten. Allerdings lässt die Inkubation mit BB-KE keinen Rückgang des Nrf2-Kerngehaltes feststellen. Dies könnte andeuten, dass BB-KE im Gegensatz zum NMP-KE Inhaltsstoffe enthält, welche die verminderten Effekte von Trigonellin überdecken können.

Im Vergleich der drei KEs ergibt sich ein unterschiedliches Bild im Bezug auf ihre Potenz, den Nrf2/ARE-Signalweg zu aktivieren. Im Gegensatz zum CGA-KE zeigen NMP-KE und BB-KE einen Anstieg an nukleärem Nrf2. Allerdings war BB-KE, trotz annähernd gleicher NMP-Gehalten, deutlich potenter als NMP-KE. Neben dem Einfluss von NMP müssen somit noch weitere Kaffeeinhaltsstoffe zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern beitragen. Der CGA-reiche CGA-KE zeigt möglicherweise durch die hohen Gehalte an Trigonellin sowie antagonistischer Effekte weiterer Kaffeeinhaltsstoffe keine erhöhte Nrf2-Kerntranslokation. BB-KE hat im Vergleich zum CGA-KE deutlich weniger Trigonellin, im Unterschied zu NMP-KE enthält BB-KE allerdings mehr als dreimal soviel CGA. Vermutet werden kann, dass die Kombination aus NMP und CGA additiv zur potenten Translokation von Nrf2 in BB-KE beiträgt. Um dies zu manifestieren, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wobei der Einfluss der Koinkubation von NMP und CGA auf den nukleären Nrf2-Gehalt weitere Anhaltspunkte liefern könnte.

4.1.4 Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch vorgeschaltete Signalelemente

Der Nrf2/ARE-Signalweg kann durch eine Reihe vorgeschalteter Signalelemente aktiviert werden (vgl. Abschnitt 2.5). Um zu überprüfen, ob bei der durch KEs induzierte Kerntranslokation von Nrf2 eine Beteiligung weiterer Signalwege vorliegt, wurde in orientierenden Messungen exemplarisch in HT29-Zellen mit NMP-KE der nukleäre Nrf2-Gehalt durch Zusatz spezifischen Hemmstoffe für zentrale Elemente vorgeschalteter Signalwege untersucht.

Im Vorfeld sollte mittels Trypanblaufärbung überprüft werden, ob die eingesetzten Konzentrationen der spezifischen Hemmstoffe Wortmannin (PI3K-Inhibitor, 10 μ M), PD98059 (ERK-Inhibitor, 40 μ M) und GF109203X (PKC-Inhibitor, 100 nM) die Zellviabilität beeinträchtigen können. Die 3 h Inkubation von HT29-Zellen unter Zusatz von jeweils einem der drei Hemmstoffe ergab eine Zellviabilität von je über 90 % (Abbildung 29, A). Demnach scheinen Effekte aufgrund von zytotoxischen Einflüssen der Hemmstoffe im untersuchten Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden zu können.

Die Ergebnisse zur 3 h Inkubation mit 100 μ g/ml NMP-KE ohne Hemmstoffzusatz in HT29-Zellen konnte die in Abschnitt 4.1.1 beobachteten Effekte auf die Kerntranslokation von Nrf2 bestätigen, der nukleäre Nrf2-Gehalt stieg im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf $174,4 \pm 39,5$ % an (Abbildung 29, B und C). Der Zusatz von 10 μ M des spezifischen Inhibitors der PI3K, Wortmannin, minimierte den nukleären Nrf2-Gehalt auf $56,2 \pm 6,2$ %. Ebenso zeigte die Koinkubation von 100 μ g/ml NMP-KE mit 40 μ M des ERK-Inhibitor PD98059 einen Rückgang des nukleären Nrf2 Gehaltes auf $68,4 \pm 8,3$ %. Der Hemmstoff der PKC, GF109203X, verminderte den Gehalt von nukleärem Nrf2-Protein um 96 % im Vergleich zur Inkubation mit NMP-KE ohne Hemmstoffzusatz.

Die Unterdrückung der durch 100 μ g/ml NMP-KE ausgelösten Nrf2-Kerntranslokation durch die drei Hemmstoffe scheinen auf eine Beteiligung der vorgeschalteten Signalelemente PI3K, ERK1/2 und PKC am Nrf2/ARE-Signalweg hinzuweisen.

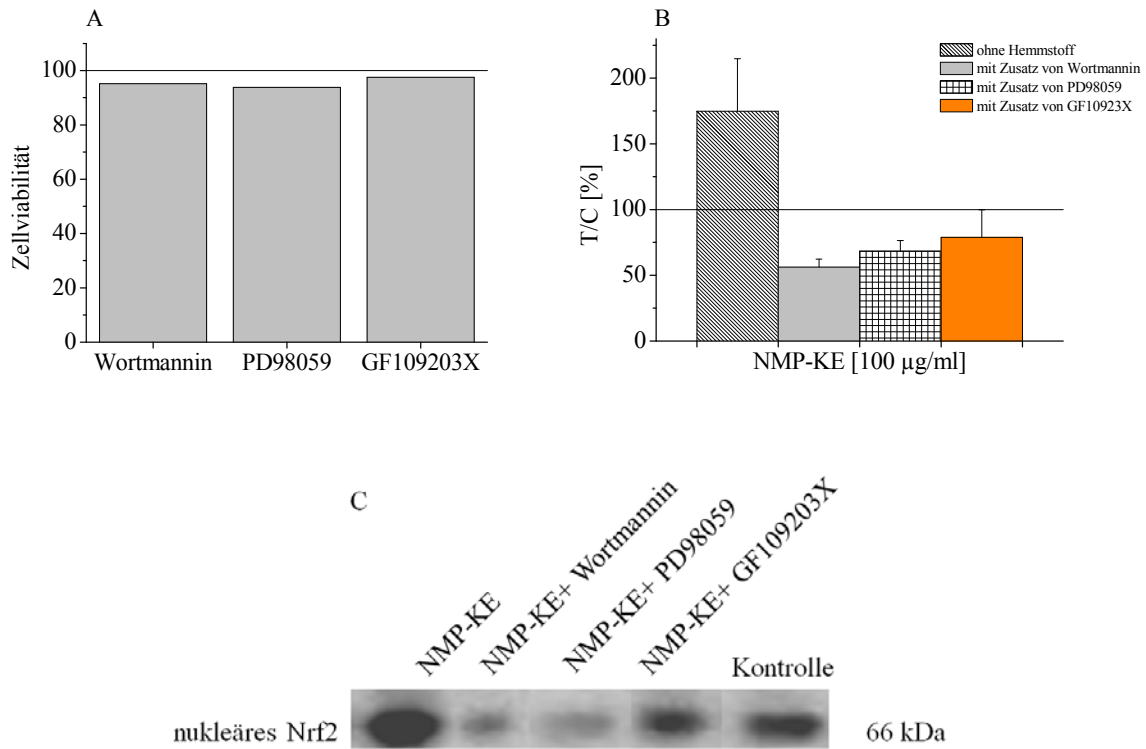


Abbildung 29: Beeinflussung der Nrf2-Kerntranslokation von NMP-KE durch die Hemmstoffe vorgeschalteter Signalelemente. (A) Zellviabilität durch Trypanblaufärbung nach 3 h Inkubation in HT29-Zellen mit den Hemmstoffen Wortmannin (10 μ M), PD98059 (40 μ M), GF109203X (100 nM); (B) und Western Blot Analyse und repräsentatives Blotbild (C) nach 3 h Inkubation mit NMP-KE in HT29-Zellen sowie ohne und mit Zusatz der Hemmstoffe Wortmannin, PD98059, GF109203X. Serumfreie Inkubation mit Zusatz von 100 U/ml Katalase. Orientierende Messungen n=2. KE: Kaffeeextrakt, Kontrolle: DMSO.

Einen Rückschluss auf ERK als vorgeschaltetes Signalelement des Nrf2 Signalweges zeigten Arbeiten von Manandahar et al. (2007), die eine durch 3H-1,2-Dithiole-3-thione (D3T) ausgelöste Akkumulation von Nrf2 im Zellkern durch den Einsatz des Hemmstoffes PD98059 unterdrücken konnten. Verschiedene Studien berichten weiterhin von einer Interaktion der PI3K mit dem Nrf2/ARE-Signalweg unter Beteiligung verschiedener Kaffeeinhaltsstoffe. Hwang et al. (2008) zeigten, dass der Anstieg des nukleären Nrf2-Gehaltes durch Inkubation mit 10 μ M des Kaffeeinhaltsstoffes Kahweol, durch den Zusatz von 10 μ M des PI3K-Inhibitors LY294002, potent reduziert werden konnte. Eine 3 h Inkubation mit 5 μ M CGA zeigte in Mausepithelzellen (JB6) einen Anstieg an nukleärem Nrf2, wobei der Zusatz von LY294002 diesen Effekt komplett unterdrückte [Feng et al., 2005]. Immunblotuntersuchungen mit Rattenhepatomzellen (H4IIE) zeigten ebenso für den PI3K

Hemmstoff Wortmannin eine Unterdrückung der Translokation von Nrf2 in den Zellkern sowie eine verminderte Induktion der GSTA2, weshalb auf eine Beteiligung der PI3K an der Aktivierung von Nrf2 geschlossen wurde [Kang et al., 2000]. Einen Einfluss der PKC an der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges zeigten Untersuchungen einer Nrf2-abhängigen Induktion der HO1 Expression an murinen Makrophagenzellen (RAW264.7), die durch die Inkubation mit einem Hemmstoff der PKC, GF109203X, signifikant vermindert wurde [Kim et al., 2007]. GF109203X hemmt die PKC jedoch relativ unspezifisch. Beachtet werden sollte hierbei, dass die PKC elf Isoformen besitzt und eine detailliertere Aussage über die Rolle einzelner PKC Isoformen am Nrf2/ARE-Signalweg durch den Einsatz von Hemmstoffen mit höherer Spezifität erlangt werden könnte. Eine kritische Auseinandersetzung mit den Resultaten einer Hemmung durch GF109203X fordert eine Studie von Alessi (1997). Er zeigte, dass neben der PKC ebenso zwei weitere Proteinkinasen durch GF109203X gehemmt werden können. Die in dieser Untersuchung dargestellte Hemmung der Nrf2-Kerntranslokation durch den Zusatz von GF109203X könnte demnach nicht nur eine Beteiligung der PKC, sondern auch eine Mitwirkung weiterer Proteinkinasen anzeigen. Zusammenfassend deuten die hier durchgeführten, orientierenden Messungen an, dass die Translokation von Nrf2 durch NMP-KE unter Beteiligung der vorgeschalteten Signalelemente ERK1/2, PI3K und verschiedenen Isoformen der PKC ablaufen könnte.

4.1.5 *Beeinflussung ARE-regulierter Gentranskripte durch Kaffeeextrakte*

Die Untersuchungen der nukleären Nrf2-Gehalte mittels Western Blot Analyse konnten zeigen, dass KEs zur Translokation und Akkumulation von Nrf2 in den Zellkern führen können. Im Anschluss daran sollte geklärt werden, ob KEs weiterführend auf Transkriptionsebene ARE-regulierte Phase-II-Enzyme modulieren können. Hierzu wurden die Gentranskripte der HO1, GSTA1, GSTA2, NQO1, Nrf2 und γ -GCL nach 3 h bzw. 24 h Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE [Dissertation Böttler, 2009] und BB-KE in HT29-Zellen mit Hilfe quantitativer Real Time PCR untersucht.

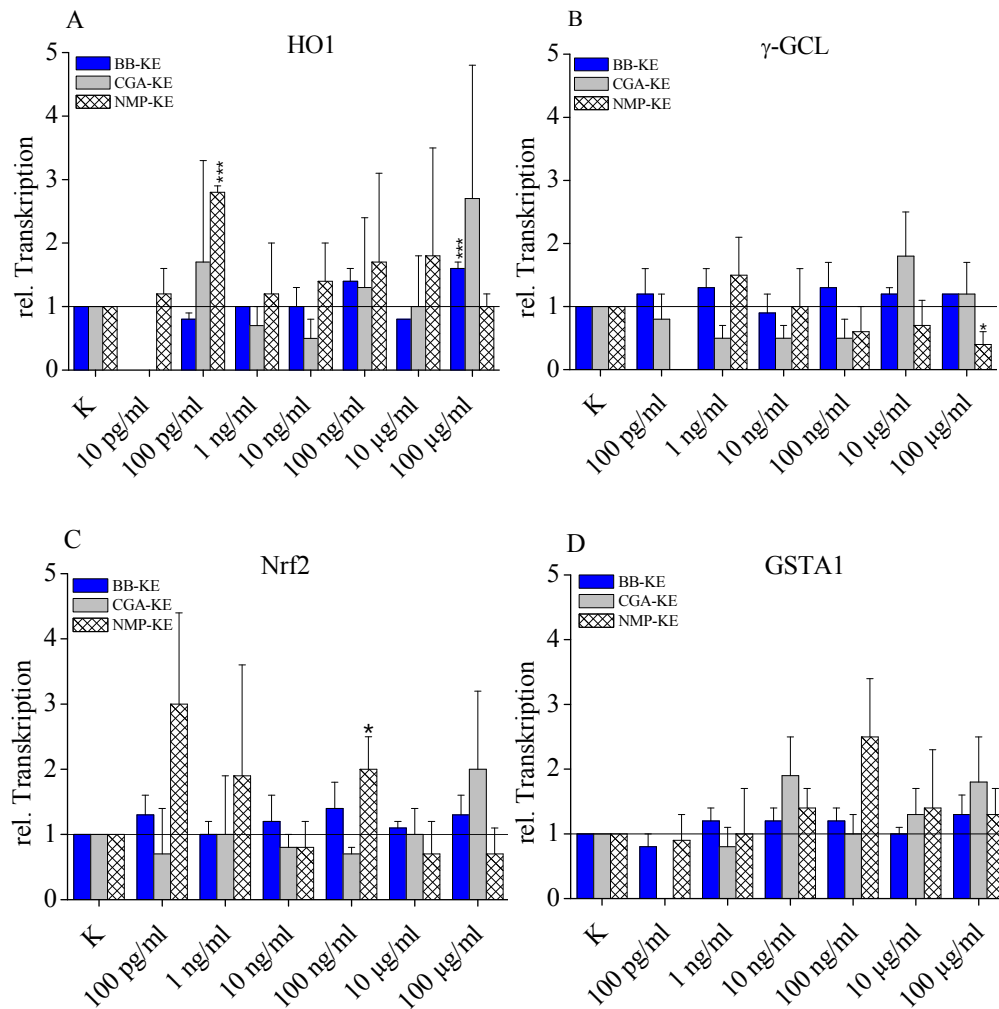


Abbildung 30: Beeinflussung der Gentranskripte der (A) HO1, (B) γ-GCL, (C) Nrf2, (D) GSTA1 nach 3 h Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE [Dissertation Böttler, 2009] und BB-KE in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumfreie Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β-Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle),* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. GST: Glutathion-S-Transferasen; γ-GCL: γ-Glutamylcysteinyligase; HO1: Hämoxygenase 1; KE: Kaffeeextrakt; K: Kontrolle; Nrf2: Transkriptionsfaktor „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“.

Eine 3 h Inkubation mit CGA-KE zeigte eine nicht signifikante Induktion der Gentranskripte der HO1 bei 100 µg/ml auf $2,7 \pm 2,1$ (Abbildung 30, A). In niedrigeren Konzentrationen (10 ng/ml) konnte weiterhin eine Abnahme der Transkription der HO1 auf $0,5 \pm 0,3$ beobachtet werden. 100 pg/ml NMP-KE zeigte die potentesten Effekte auf die HO1-Transkription nach 3 h, mit einem signifikanten Anstieg der Transkripte auf $2,8 \pm 0,1$. In Konzentrationen von 100 ng/ml ($1,7 \pm 0,4$) und 100 µg/ml ($1,8 \pm 1,7$) NMP-KE ließ sich eine

leichte Erhöhungen der Gentranskripte mit großen Schwankungen erkennen. HO1 zeigte über den Konzentrationsbereich von 100 pg/ml bis 10 µg/ml keine signifikante Modulation durch BB-KE. Ein vergleichsweise geringer, jedoch signifikanter Anstieg der HO1 Transkription konnte für 100 µg/ml BB-KE ($1,6 \pm 0,1$) erfasst werden. Nach einer Inkubationszeit von 3 h zeigte keiner der drei KEs einen signifikanten Anstieg der γ -GCL Gentranskripte (Abbildung 30, B). In Konzentrationen von 1 ng/ml – 100 ng/ml CGA-KE verminderte sich die Transkriptmenge der γ -GCL auf 0,5 allerdings unterlag die Verminderung einer recht großen Schwankung. Ebenso wurden die γ -GCL Gentranskripte durch 100 µg/ml NMP-KE signifikant auf $0,4 \pm 0,2$ minimiert. BB-KE scheint die γ -GCL auf Transkriptionsebene nach 3 h nicht signifikant zu modulieren. Die Transkripte von Nrf2 zeigten durch 100 µg/ml CGA-KE nach 3 h Inkubation eine Zunahme auf $2,0 \pm 1,2$, allerdings mit relativ großer Standardabweichung (Abbildung 30, C). NMP-KE induzierte die Transkription von Nrf2 nach 3 h von den drei KEs am potentesten. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnten dreimal Werte $\geq 1,5$ für die rel. Transkriptmenge von Nrf2 beobachtet werden. Es zeigten sich zwar für 100 pg/ml ($3,0 \pm 1,4$) und 1 ng/ml ($1,9 \pm 1,7$) große Schwankungen, jedoch konnte eine signifikante Zunahme der Nrf2-Transkription bei 100 ng/ml NMP-KE auf $2,0 \pm 0,5$ detektiert werden. Eine Beeinflussung der Nrf2-Transkriptmenge durch BB-KE wurde nach einer Inkubationszeit von 3 h nicht beobachtet (Abbildung 30, C).

Die Untersuchung der GSTA1 Gentranskription nach 3 h Inkubation mit CGA-KE weist zwei Zunahmen bei 10 ng/ml ($1,9 \pm 0,6$) und 100 µg/ml ($1,8 \pm 0,7$) auf, die jedoch keine Signifikanzen zeigten. Nicht signifikant, allerdings trotzdem auf $2,5 \pm 0,9$ erhöht, war die Transkriptmenge der GSTA1 bei 100 ng/ml NMP-KE. Wie schon für die Transkripte der γ -GCL und Nrf2 beobachtet, ließ die Untersuchung der GSTA1 nach 3 h Inkubation mit BB-KE keine Modulation feststellen.

Um die Langzeiteffekte der drei KEs auf die Transkripte ARE-regulierter Gene zu untersuchen, wurde neben einer Kurzzeitinkubation von 3 h auch ein 24 h Inkubationsintervall gewählt. Wie in Abbildung 31, A dargestellt, zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 100 µg/ml nur für die zwei höchsten Konzentrationen an KE eine Modulation der HO1 Transkriptmenge. CGA-KE bewirkte für die Transkription der HO1 nach 24 h sowohl eine signifikanten Abnahme bei 10 µg/ml ($0,5 \pm 0,1$), als auch einen marginalen Anstieg bei 100 µg/ml ($1,7 \pm 0,3$).

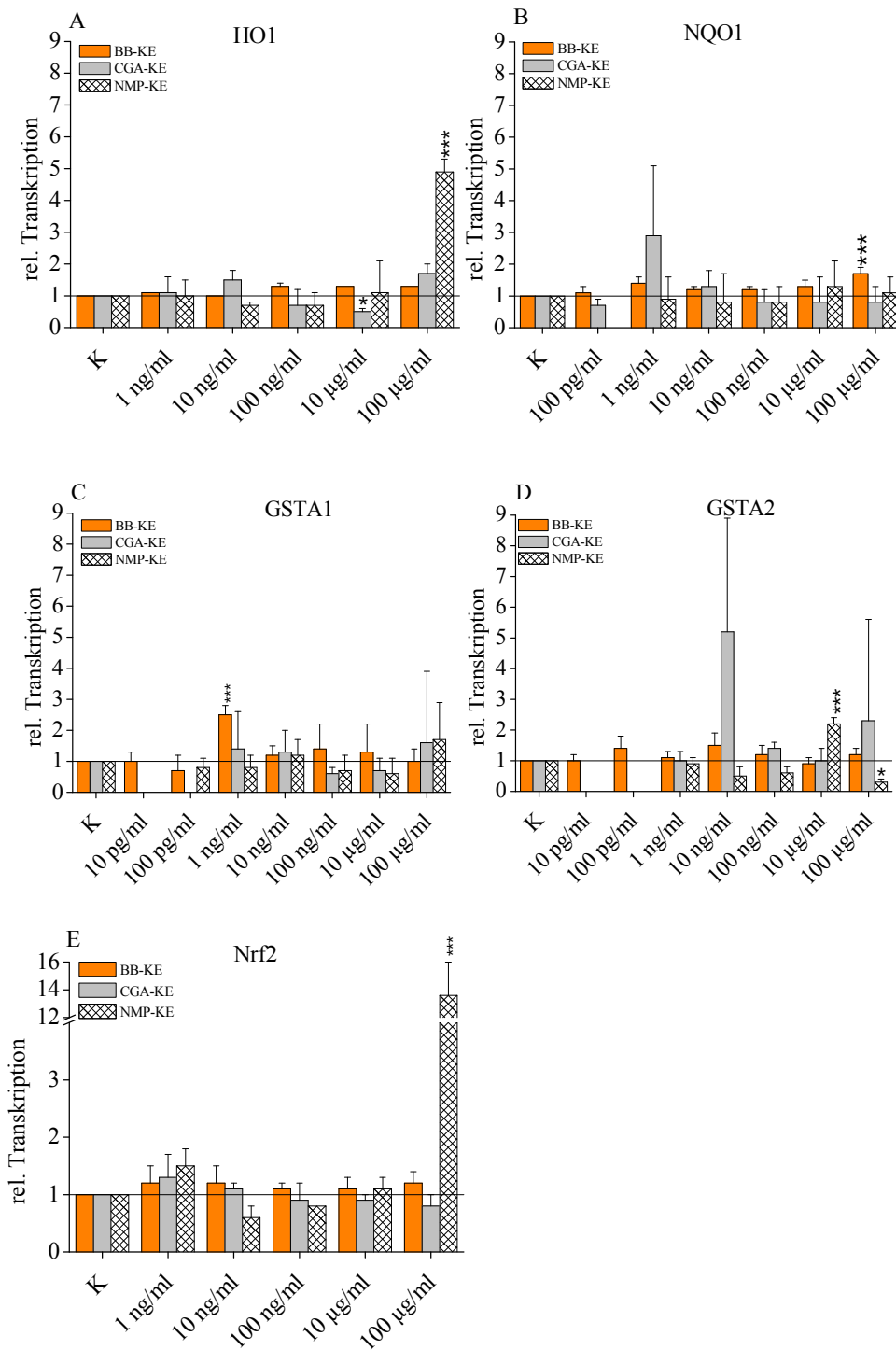


Abbildung 31:

Beeinflussung der Gentranskripte der (A) HO1, (B) NQO1, (C) GSTA1, (D) GSTA2, (E) Nrf2 nach 24 h Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE [Dissertation Böttler, 2009] und BB-KE in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$. GST: Glutathion-S-Transferasen; HO1: Hämoxygenase 1; KE: Kaffeeextrakt; K: Kontrolle; Nrf2: Transkriptionsfaktor „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxidoreduktase.

Ebenso ließ sich für 100 µg/ml NMP-KE ($4,9 \pm 0,4$) eine Zunahme an HO1 Transkripten beobachten, die sich jedoch im Vergleich zum CGA-KE wesentlich ausgeprägter und signifikant darstellte. BB-KE modulierte die HO1 Transkripte nach 24 h nicht. Die Transkription der NQO1 zeigte einen Anstieg auf $2,9 \pm 2,2$ durch die Inkubation mit 1 ng/ml CGA-KE, wobei sich jedoch eine große Standardabweichung erkennen ließ (Abbildung 31, B). 100 µg/ml BB-KE führten zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptmenge der NQO1 auf $1,7 \pm 0,2$. Eine 24-stündige Inkubation mit CGA-KE ließ in der Konzentration von 100 µg/ml einen leichten Anstieg der GSTA1 Transkripte erkennen, jedoch mit einer großen Schwankungsbreite (Abbildung 31, C). 100 µg/ml NMP-KE führten zu einem geringen Anstieg der GSTA1, ebenso mit großen Standardabweichungen ($1,7 \pm 1,2$). Eine signifikante Zunahme der GSTA1-Transkription war für 1 ng/ml BB-KE ($2,5 \pm 0,3$) zu verzeichnen. Wie in Abbildung 31, D dargestellt, zeigte die Inkubation von HT29-Zellen mit CGA-KE nach 24 h für die GSTA2 zwei Maxima, welche allerdings starken Schwankungen unterlagen. 10 ng/ml CGA-KE erhöhen die GSTA2 Transkriptmenge auf $5,2 \pm 3,7$ und 100 µg/ml auf $2,3 \pm 3,3$. In den gleichen Konzentrationen war eine Abnahme der GSTA2 Transkription durch Inkubation mit NMP-KE festzustellen, wobei die Transkriptmenge bei 10 ng/ml NMP-KE auf $0,5 \pm 0,3$ und bei 100 µg/ml NMP-KE signifikant auf $0,3 \pm 0,1$ abgesenkt wurde. Im Gegensatz dazu war bei 10 µg/ml NMP-KE eine Erhöhung der GSTA2 Transkription zu beobachten. BB-KE zeigte keine Beeinflussung der GSTA2 Transkripte nach 24 h Inkubation. Eine Modulation der Nrf2-Transkription nach Langzeitinkubation war allein durch NMP-KE sichtbar (Abbildung 31, E). So erhöhten 1 ng/ml NMP-KE ($1,5 \pm 0,3$) vergleichsweise gering und 100 µg/ml ($13,6 \pm 2,4$) signifikant die Transkripte von Nrf2.

Die Ergebnisse der Modulation ARE-regulierter Gene nach 3 h (Tabelle 8) sowie 24 h (Tabelle 9) Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE und CGA-KE wurden tabellarisch zusammengefasst. Berücksichtigt wurden hierbei nur Veränderungen der Transkription im Verhältnis zur DMSO Kontrolle (= 1), deren Wert signifikant oder $\geq 1,5$ bzw. $\leq 0,5$ im Vergleich zur Kontrolle war. Da im Rahmen dieser Dissertation nur der BB-KE untersucht wurde, beschränkt sich die Diskussion auf einen Vergleich der Ergebnisse des BB-KE mit NMP-KE oder CGA-KE.

Durch eine 3 h Inkubation zeigen die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Gentranskripte die meisten signifikanten Modulationen durch NMP-KE. Die Transkripte der Gene HO1, Nrf2 und GSTA1 wiesen im niedermolekularen Konzentrationsbereich

(100 pg/ml bis 100 ng/ml) eine Induktion über 1,5 auf. BB-KE zeigte die geringste Beeinflussung der Gentranskripte nach 3 h, drei der vier untersuchten Gene ließen keine Modulation erkennen. Gemeinsam ist allen drei KEs nach 3 h Inkubationszeit eine Induktion der HO1 Transkription, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationen. Während CGA-KE sowie BB-KE bei 100 µg/ml die induzierenden Effekte aufweisen, ist durch NMP-KE die potenteste und signifikante Erhöhung an HO1 Transkripten im niedermolekularen Bereich (100 pg/ml) sichtbar. Aufgrund der annähernd gleichen NMP Konzentrationen in NMP-KE und BB-KE und die hier gezeigten unterschiedlichen Effektkonzentrationen ist eine Beeinflussung der Gentranskription der HO1 durch ausschließlich NMP nach 3 h in HT29-Zellen unwahrscheinlich. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Untersuchung der Reinsubstanz NMP, die nach 3 h keine Modulation der HO1 Transkription in HT29-Zellen aufwies [Dissertation Böttler, 2009].

Tabelle 8: Vergleich der Modulation ARE-regulierter Gene in HT29-Zellen nach Inkubation für 3 h mit CGA-KE, NMP-KE und BB-KE.

	CGA-KE	NMP-KE	BB-KE
HO1	↑ 100 µg/ml ↓ 10 ng/ml	↑↑ 100 pg/ml ↑ 100 ng/ml ↑ 10 µg/ml	↑↑ 100 µg/ml
γ-GCL	↓ 1 ng/ml ↓ 10 ng/ml ↓ 100 ng/ml	↓↓ 100 µg/ml	-
Nrf2	↑ 100 µg/ml	↑ 100 pg/ml ↑ 1 ng/ml ↑↑ 100 ng/ml	-
GSTA1	↑ 10 ng/ml ↑ 100 µg/ml	↑ 100 ng/ml	-

↑= Erhöhung auf $\geq 1,5$ im Vergleich zur Kontrolle ; ↑↑ = signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle; ↓= Verminderung auf $\leq 0,5$ im Vergleich zur Kontrolle; ↓↓=signifikante Verminderung im Vergleich zur Kontrolle; - = keine Modulation im Vergleich zur Kontrolle.

Weiterhin kann die Rolle von CGA bei der Induktion der HO1 Transkription durch BB-KE und CGA-KE hinterfragt werden. Die Gehalte bei der Effektkonzentration von 100 µg/ml liegen in vergleichbaren Konzentrationsbereichen bei 16,5 µM (CGA-KE) sowie 5,3 µM (BB-KE). Untersuchungen der 3 h Inkubation in HT29-Zellen mit CGA in Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 µg/ml konnten allerdings nur bei 0,1 µM eine Erhöhung der HO1 Gentranskripte feststellen [Dissertation Böttler, 2009]. Demnach ist ein direkter Beitrag von

CGA an der Modulation der HO1-Transkription durch CGA-KE und BB-KE nicht eindeutig. Die Beeinflussung ausgewählter Gentranskripte von Phase-II-Enzymen nach 3 h Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE und BB-KE könnte demnach unter Mitwirkung von weiteren Kaffeeinhaltsstoffen.

Tabelle 9: Vergleich der Modulation ARE-regulierter Gene in HT29-Zellen nach Inkubation für 24 h mit CGA-KE, NMP-KE und BB-KE.

	CGA-KE	NMP-KE	BB-KE
HO1	↓↓ 10 µg/ml ↑ 100 µg/ml	↑↑ 100 µg/ml	-
NQO1	↑ 1 ng/ml	-	↑↑ 100 µg/ml
GSTA1	↑ 100 µg/ml	↑ 100 µg/ml	↑↑ 1 ng/ml
GSTA2	↑ 10 ng/ml ↑ 100 µg/ml	↓ 10 ng/ml ↑↑ 10 µg/ml ↓↓ 100 µg/ml	-
Nrf2	-	↑ 1 ng/ml ↑↑ 100 µg/ml	-

↑ = Erhöhung auf $\geq 1,5$ im Vergleich zur Kontrolle ; ↑↑ = signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle; ↓ = Verminderung auf $\leq 0,5$ im Vergleich zur Kontrolle; ↓↓ = signifikante Verminderung im Vergleich zur Kontrolle; - = keine Modulation im Vergleich zur Kontrolle.

Vergleichbar mit der Kurzzeitinkubation ließ die 24 h Inkubation von HT29-Zellen ein unterschiedliches Wirkprofil der KEs erkennen. Während die potenteste Erhöhung der GSTA2 Gentranskripte durch 10 ng/ml und 100 µg/ml CGA-KE erzielt werden konnte, war ein signifikanter Anstieg der HO1- und Nrf2-Transkription nach Inkubation mit 100 µg/ml NMP-KE zu verzeichnen. BB-KE induzierte in signifikantem Maße die Gentranskripte der NQO1 und GSTA1 in den Konzentrationen von 1 ng/ml bzw. 100 µg/ml. In der Literatur wird bestätigend beschrieben, dass 800 µg/ml Kaffee nach 24 h die mRNA der Gene NQO1, HO1 und GSTA in primären Hepatozyten der Ratte induzierte [Cavin et al., 2008]. Es stellt sich die Frage, ob die antioxidative Wirkung durch die Induktion ARE-regulierter Phase-II-Enzyme auf einzelne Inhaltsstoffe im Kaffee zurückgeführt werden kann.

Die NQO1 wurde nach 24 h sowohl durch CGA-KE sowie BB-KE in ihrer Gentranskription erhöht (Abbildung 31, B). Bestätigend hierzu zeigten Untersuchungen vom Projektpartner der

AG Eisenbrand (TU Kaiserslautern) eine konzentrationsabhängige Induktion der NQO1 Proteinexpression nach 24 h Inkubation mit CGA-KE in HT29-Zellen mittels Western Blot Analyse. Die Expression wurde im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1 µg/ml bis 100 µg/ml auf max. 220 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht. Weiterhin zeigte CGA eine signifikante Erhöhung der NQO1-Proteinexpression in Konzentrationen von 1 bis 30 µM [Dissertation Bakuradze, 2010]. Eine Modulation der NQO1 durch CGA konnte weiterhin durch Untersuchungen von Feng et al. (2005) gezeigt werden. Die Enzymaktivität der NQO1 stieg signifikant in Mausepithelzellen (JB6) nach einer 18-stündigen Behandlung mit 40 bzw. 80 µM CGA. Im Gegensatz dazu zeigte CGA als Reinsubstanz nach einer 24 h Inkubation in HT29-Zellen im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 µM keine Modulation der NQO1 Gentranskription [Dissertation Böttler, 2009]. Weiterhin sind die Konzentrationen, in denen CGA-KE (1 ng/ml = 1,6 µM CGA) und BB-KE (100 µg/ml = 5,3 µM CGA) eine Induktion der NQO1 Gentranskription vermitteln, unterschiedlich in ihrem Gehalt an CGA. Ein Beitrag der CGA an der Induktion der NQO1 Transkripte nach 24 h durch CGA-KE und BB-KE ist möglich, allerdings liegt keine ausschließliche Modulation durch CGA nahe, weshalb eine Mitwirkung anderer Kaffeeinhaltsstoffe sehr wahrscheinlich ist. In der Literatur wird eine Beeinflussung der NQO1 durch weitere Kaffeeinhaltsstoffe beschrieben. Die Diterpene Cafestol und Kahweol lösten eine Erhöhung der NQO1 mRNA nach 24 h Inkubation in murinen, embryonalen Fibroblastenzellen (MEF) aus [Higgins et al., 2008]. Weiterhin scheint ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten NQO1-Gentranskription und NMP möglich. Untersuchungen mittels Real Time PCR von Pour et al. (2010) zeigten einen signifikanten Anstieg der Genexpression der NQO1 nach Behandlung von humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) mit stark geröstetem Kaffee im Vergleich zur Kontrolle und zu grünem Kaffee. Zu betonen ist hierbei, dass neben den Gehalten der Maillardprodukte ebenso die Konzentration an NMP mit der Röstung zunimmt [Stadler et al., 2002a]. Bestätigend hierzu zeigte die Behandlung von HT29-Zellen für 24 h mit NMP in einer Konzentration von 10 µM einen signifikanten Anstieg der Transkripte der NQO1 [Dissertation Böttler, 2009]. Die Konzentration an NMP liegt in der Effektkonzentration von 100 µg/ml BB-KE bei 5 µM, weshalb es möglich scheint, dass der Anstieg der NQO1-Gentranskription hierbei durch NMP beeinflusst wird. Bestätigend hierzu zeigte sich eine signifikante Zunahme der NQO1-Proteinexpression nach Inkubation von 1 µM NMP in HT29-Zellen nach 24 h [Dissertation

Bakuradze, 2010], was auf eine erfolgreiche Weiterleitung des Signales von der Transkriptionsebene bis zur Proteinbiosynthese schließen lässt.

Tabelle 9 führt weiterhin auf, dass die beiden NMP-reichen KEs, NMP-KE und BB-KE, die Transkription der GSTA1 erhöhten, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Weiterhin zeigte CGA-KE eine marginale Erhöhung der GSTA1-Transkription, allerdings mit starken Schwankungen. Ebenso wie für die NQO1 sind einige Kaffeeinhaltsstoffe beschrieben, die eine Modulation der GSTA1-Expression bewirken können. Die Diterpene Cafestol und Kahweol zeigten im Immunblot eine Zunahme der GSTA1/2 Expression im murinen Dünndarm [McMahon et al., 2001]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in der Promotorregion der GSTA1 die ARE-Luciferaseaktivität nach einer 18 h Inkubation mit 20 μ M und 40 μ M CGA in Mausepithelzellen (JB6) aktiviert wird [Feng et al., 2005]. Allerdings ließ CGA im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 μ M nach 24 h in HT29 Zellen keine signifikante Modulation der GSTA1 Gentranskripte beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte NMP unter den gleichen Untersuchungsbedingungen bei einer Konzentration von 10 μ M und 100 μ M eine signifikante Zunahme der GSTA1 Transkriptmenge [Dissertation Böttler, 2009]. NMP-KE weist in seiner Effektkonzentration von 100 μ g/ml 5,1 μ M NMP auf, weshalb eine Beteiligung von NMP an der Induktion der GSTA1 Transkription durch NMP-KE möglich scheint. BB-KE zeigte allerdings nur in einer niedrigeren Konzentration (1 ng/ml) einen signifikanten Anstieg der GSTA1 Transkriptmenge. Die Konzentration an NMP (10 pM) liegt hierbei unterhalb des Konzentrationsbereiches, in dem eine Modulation der GSTA1 Transkription durch NMP nach 24 h in HT29-Zellen untersucht wurde. Ob NMP auch einen Beitrag zur Modulation der GSTA1 Transkription bei BB-KE leistet, muss daher in weiteren Untersuchungen ermittelt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen von NMP-KE und BB-KE, in denen eine Induktion der Gentranskription der GSTA1 sichtbar wird, scheinen neben NMP weitere Kaffeeinhaltsstoffe die GSTA1 auf Transkriptionsebene zu beeinflussen.

Ein ähnlicher Rückschluss kann für den Anstieg der Transkriptmenge der HO1 und von Nrf2 durch 100 μ g/ml NMP-KE gezogen werden. Die in 100 μ g/ml NMP-KE enthaltene Menge an NMP ließ ebenso als Reinsubstanz in vergleichbaren Konzentrationen potent die Nrf2- und HO1-Transkription signifikant ansteigen [Dissertation Böttler, 2009]. BB-KE zeigte im Gegensatz dazu nach 24 h keine Modulation von Nrf2 oder HO1 auf Transkriptionsebene, trotz annähernd identischer NMP-Gehalte wie NMP-KE. Weiterhin bedingte der NMP-arme

CGA-KE bei 100 µg/ml einen leichten Anstieg der HO1-Transkriptmenge. Das im NMP-KE enthaltene NMP scheint folglich nicht alleine die Rolle als Modulator der Gentranskription von Nrf2 und HO1 im komplexen Extrakt zu besitzen und weitere Kaffeeinhaltsstoffe müssen hierbei beteiligt sein.

Abschließend betrachtet zeigten die KEs nach 3 h sowie nach 24 h eine Induktion der Transkripte ARE-regulierter Gene, allerdings mit einem unterschiedlichen Wirkprofil. Der Vergleich der drei KEs sowie der Literaturdaten deuten darauf hin, dass die zwei Leitverbindungen CGA und NMP an der Wirkung auf Gentranskriptionsebene beteiligt sein können. Konkrete Anhaltspunkte lassen sich für NMP finden, was möglicherweise an der Induktion der NQO1-Transkripte durch BB-KE bzw. der GSTA1-, HO1- und Nrf2-Transkripte durch NMP-KE nach 24 h beteiligt scheint. Allerdings zeigte NMP-KE und BB-KE trotz gleicher Gehalte an NMP in den gesamten Untersuchungen mittels Real Time PCR Unterschiede im Bezug auf das induzierte Genprofil sowie den Konzentrationen in denen Effekte zu Tage traten. Demnach scheint eine Beteiligung von NMP an der Wirkung von NMP-KE und BB-KE auf die Transkription ARE-regulierter Phase-II-Enzyme möglich, allerdings müssen weitere, sich in den Extrakten unterscheidende Kaffeeinhaltsstoffe antagonistisch oder synergistisch wirken. Wie in Abschnitt 4.3 dargestellt, zeigen die Inhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin ein komplexes Zusammenspiel bei der Induktion der Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme. Möglicherweise ist die unterschiedliche Wirkung von NMP-KE und BB-KE der hier dargestellten Untersuchungen der Gentranskription auf die voneinander abweichenden Gehalte von CGA und Trigonellin zurückzuführen, was einen vielversprechenden Ausblick für weitere Untersuchungen bieten könnte.

4.1.6 *Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch Glucuronide der CGA ex vivo*

Wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, sind die Leitverbindungen NMP und CGA unterschiedlich bioverfügbar. Während das Kation NMP ohne strukturelle Veränderung in das vaskuläre System eintreten kann, wird die Metabolisierung von CGA kontrovers diskutiert, wobei CGA nicht bzw. nur zum Teil in der ursprünglich aufgenommen Form am Wirkort vorzuliegen scheint. *In vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen nach der Verabreichung von Kaffee ergaben, dass Hydroxyzimtsäuren metabolisch zu Glucuroniden und Sulfaten

umgewandelt werden können [Wong et al., 2009]. Um sich der *in vivo* Situation anzunähern, wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei mögliche Metabolite von CGA auf die Modulation ARE-regulierter Phase-II-Enzyme *ex vivo* untersucht. Hierzu wurden periphere Lymphozyten (PBLs) aus Blutproben von Probanden isoliert und anschließend für 3 h mit Kaffeoil-3-O- β -D-Glucuronid und Kaffeoil-4-O- β -D-Glucuronid inkubiert. Die Untersuchung der Gentranskripte erfolgte mittels quantitativer Real Time PCR. In Abbildung 32 ist der Abbau der Chlorogensäure zu den postulierten isomeren Metaboliten Kaffeoil-3-O- β -D-Glucuronid und Kaffeoil-4-O- β -D-Glucuronid dargestellt.

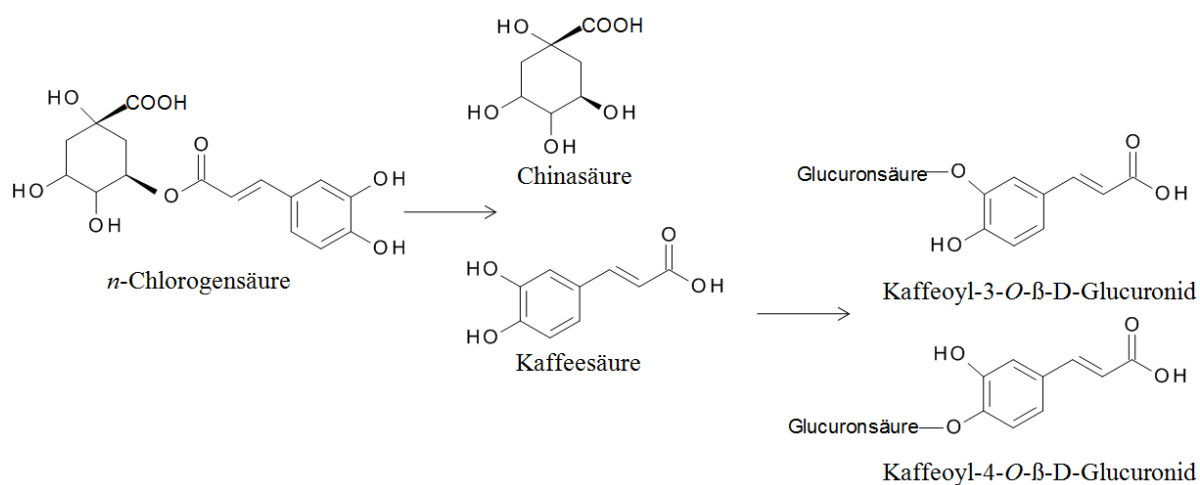


Abbildung 32: Abbau der *n*-Chlorogensäure zu den postulierten Metaboliten Kaffeoil-3-O- β -D-Glucuronid und Kaffeoil-4-O- β -D-Glucuronid.

In Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M bewirkte Kaffeoil-3-O- β -D-Glucuronid sowie Kaffeoil-4-O- β -D-Glucuronid nach einer 3 h Inkubation von PBLs keine Induktion der untersuchten ARE-regulierten Gene (Abbildung 33, A und B). Vielmehr zeigen beide Isomere eine Verminderung der Transkripte der γ -GCL. Für die Vorstufe der Glucuronide, CGA, war hingegen bei der eingesetzten Konzentration von 100 μ M für die HO1 ($1,6 \pm 0,3$), NQO1 ($2,4 \pm 1,5$) und Nrf2 ($1,7 \pm 1,1$) nach 3 h in PBLs ein Anstieg der Gentranskripte zu beobachten. Die Schwankungen könnten auf die unterschiedlichen Probanden der zwei durchgeführten Experimente zurückgeführt werden. Die Inkubation der zwei isomeren Glucuronide in den niedrigeren Konzentrationen bei 0,1 μ M und 1 μ M ergab ein unterschiedliches Bild. Während das Kaffeoil-3-O- β -D-Glucuronid bei 0,1 μ M die GSTP1 ($1,9 \pm 0,8$) und HO1 ($4,4 \pm 3,1$) sowie bei 1 μ M die HO1 ($2,7 \pm 1,1$) und NQO1 ($2,2 \pm 1,0$) Transkription erhöhte (Abbildung 33, A), zeigte sich durch eine 3 h Inkubation mit dem

Kaffeoyl-4-*O*- β -D-Glucuronid keine vermehrte Transkriptmenge dieser Gene (Abbildung 33, B). Vielmehr ist bei 0,1 μ M Kaffeoyl-4-*O*- β -D-Glucuronid keine Modulation der Transkription zu beobachten, während für die Konzentration von 1 μ M die γ -GCL Transkriptmenge vermindert war.

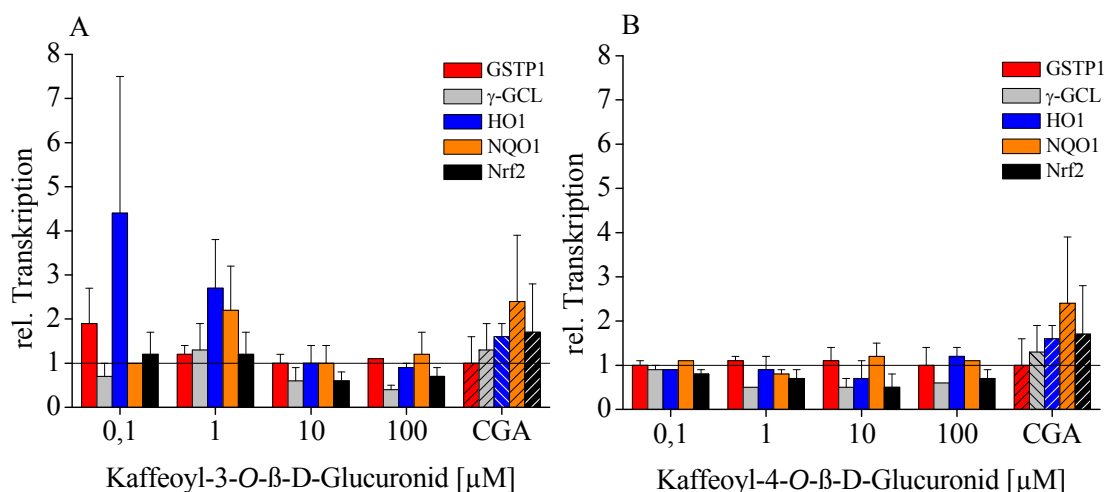


Abbildung 33: *Ex vivo* Beeinflussung der Gentranskripte ARE-regulierter Gene nach einer 3 h Inkubation mit 100 μ M CGA (schaffiert) sowie (A) Kaffeoyl-3-*O*- β -D-Glucuronid (B) Kaffeoyl-4-*O*- β -D-Glucuronid in peripheren Blutlymphozyten mittels Real Time PCR. MW $\pm$ Range von zwei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. GST: Glutathion-S-Transferasen; γ -GCL: γ -Glutamylcysteinyligase HO1: Hämoxxygenase 1; Nrf2: Transkriptionsfaktor „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxidorreduktase.

In der Literatur sind keine Angaben über die beide isomeren Kaffeoyl-3-*O*- β -D-Glucuronid und Kaffeoyl-4-*O*- β -D-Glucuronid im Zusammenhang mit der Beeinflussung von Phase-II-Enzymen beschrieben. Über den Hintergrund dieser interessanten Struktur-Wirkungsbeziehung können folglich nur Vermutungen angestellt werden. Die Bindung der Glucuronsäure an der C3 Position der Kaffeoylgruppe verursacht im Gegensatz zur C4 Position im unteren μ M Konzentrationsbereich eine antioxidative Wirkung im Sinne einer gesteigerten Gentranskription von Phase-II-Enzymen. Ein Zusammenhang zwischen der C3 Position bei Hydroxyzimtsäure-Derivaten, isoliert aus der grünen Kaffeebohne, und einer antioxidativen Wirkung zeigten Iwai et al. (2004). Die Fähigkeit, Radikale abzufangen, wurde durch eine Methoxylierung an der C3 Position der Kaffeoylgruppe um mehr als die Hälfte vermindert, im Vergleich zur Kaffeesäure und CGA, die beide an der C3 Position eine Hydroxygruppe aufweisen. Demnach scheint das Substitutionsmuster an C3 der Kaffeoylgruppe einen Einfluss auf die Wirkung von Kaffeesäuremetabolite zu haben.

Die Ergebnisse der Chlorogensäuremetabolite zeigen weiterhin einen potenten Anstieg der Gentranskripte im unteren μM Konzentrationsbereich. Laut Literatur scheint der Konsum von 190 ml Kaffee zu einem Plasmagehalt von $3,14 \pm 1,64 \mu\text{M}$ CGA zu führen [Monteiro et al., 2007]. Ausgehend von diesen Untersuchungen kann postuliert werden, dass die Plasmakonzentrationen der Chlorogensäuremetabolite im Bereich von $\leq 1 \mu\text{M}$ liegen könnten und somit in Konzentrationen im Plasma vorliegen würden, bei denen im Rahmen dieser Untersuchungen ein Anstieg an Gentranskripten beobachtet wurde. Die geringste eingesetzte Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) des Kaffeoyl-3-O- β -D-Glucuronid zeigte eine potente Induktion der Gentranskripte. Aufgrund der limitierten Substanzmenge war es im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich, die Untersuchungen in niedrigeren Konzentrationen fortzusetzen. Folglich konnte der „no effekt level“ nicht bestimmt werden, allerdings ist nicht auszuschließen, dass der Anstieg der Gentranskripte durchaus noch in Konzentrationen $\leq 0,1 \mu\text{M}$ zu beobachten sein kann. Möglicherweise zeigen die Glucuronide der CGA eine potente antioxidative Wirkung, im Sinne einer Erhöhung der Transkription von Phase-II-Enzymen, in systemisch erreichbaren Konzentrationen.

Die Untersuchungen zur Wirkung der Kaffeoylglucuronide an peripheren Lymphozyten deuten an, dass die induktive Wirkung der CGA auf ausgewählte ARE-regulierte Phase-II-Enzyme teilweise auch auf deren Metabolite übertragbar zu sein scheinen. Allerdings zeigen sich starke Unterschiede zwischen den hier untersuchten Isomeren Kaffeoyl-3-O- β -D-Glucuronid und Kaffeoyl-4-O- β -D-Glucuronid, wobei nur das Kaffeoyl-3-O- β -D-Glucuronid die ARE-regulierten Gene HO1, NQO1 und GSTP1 potent in ihrer Transkriptmenge erhöht. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die induktiven Effekte auf diese Gene in Konzentrationen zu Tage traten, wie sie möglicherweise unter *in vivo* Situationen am Wirkort erreicht werden könnten.

4.1.7 Modulation der GST-Enzymaktivität durch Kaffeeextrakte und einzelne Kaffeeinhaltsstoffe

Die Glutathion-S-Transferasen (GSTs) gehören zu einer multigenen Enzymfamilie, die in Detoxifizierungsprozesse involviert sind [vgl. Abschnitt 2.7.1]. Die für den Fremdstoffmetabolismus wichtigen GSTs wie GSTA1, -A2, und -P1 liegen im Zytosol der Zelle vor und katalysieren die Übertragung von Glutathion auf elektrophile Substanzen. Die

untersuchten KEs zeigten bereits eine Modulation verschiedener GST-Isoformen auf Transkriptionsebene. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob die vermehrte GST-Transkriptmenge mit einer gesteigerten Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferasen einhergeht, was als zusätzlicher Indikator für eine Steigerung der enzymatischen Abwehr betrachtet werden kann. Hierzu wurde die GST-Enzymaktivität nach der Methode von Habig et al., (1974) nach Inkubation mit je 10 µg/ml CGA-KE, NMP-KE und BB-KE sowie den Leitverbindungen CGA (10 µM) und NMP (10 µM) in den Zeitintervallen 24 h, 48 h und 72 h in HT29-Zellen untersucht.

Nach 24 h Inkubation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der GST-Enzymaktivität für CGA-KE ($112,6 \pm 2,3 \%$) sowie für CGA ($119,7 \pm 4,3 \%$) (Abbildung 34, A). Ein ähnliches Bild wurde nach einer 48-stündigen Inkubationszeit für den CGA-KE und dessen Leitverbindung CGA sichtbar (Abbildung 34, B). Der potenteste Anstieg der GST-Enzymaktivität auf $118,7 \pm 3,1 \%$ trat durch CGA zu Tage. Im Gegensatz zur Inkubationszeit von 24 h ließen sich nach 48 h für CGA-KE allerdings nur eine marginale Modulation auf $105,8 \pm 1,7 \%$ feststellen. Nach 24h Inkubation mit BB-KE ließ sich keine Modulation der GST-Enzymaktivität beobachten (Abbildung 34, A). Im Gegensatz dazu stieg nach 48 h die Aktivität der GST durch Inkubation mit BB-KE signifikant auf $112,2 \pm 2,6 \%$ an. Der NMP-KE und dessen charakteristischer Inhaltsstoff NMP zeigten nach 24 h und 48 h keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der GST. Eine Inkubationszeit von 72 h ließ keine Beeinflussung der GST-Enzymaktivität durch die untersuchten KEs sowie die Kaffeeinhaltsstoffe CGA und NMP beobachten (Abbildung 34, C).

Von den untersuchten KEs konnte durch CGA-KE der potenteste Anstieg der GST-Enzymaktivität festgestellt werden. Nach 24 h sowie nach 48 h stieg die Aktivität der GST im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. In Abschnitt 4.1.5 konnte für CGA-KE nach 24 h unter den untersuchten Genen die potentesten Effekte für die GSTA2 im Sinne einer erhöhten Transkriptmenge beobachtet werden. Eine Modulation der GSTs durch CGA-KE deutet sich demnach nicht nur auf Transkriptionsebene an, sondern scheint ebenso die Enzymaktivität zu beeinflussen. Weiterhin konnte auch für den charakteristischen Inhaltsstoff von CGA-KE, CGA, ein signifikanter Anstieg der GST-Enzymaktivität nach 24 h und 48 h beobachtet werden.

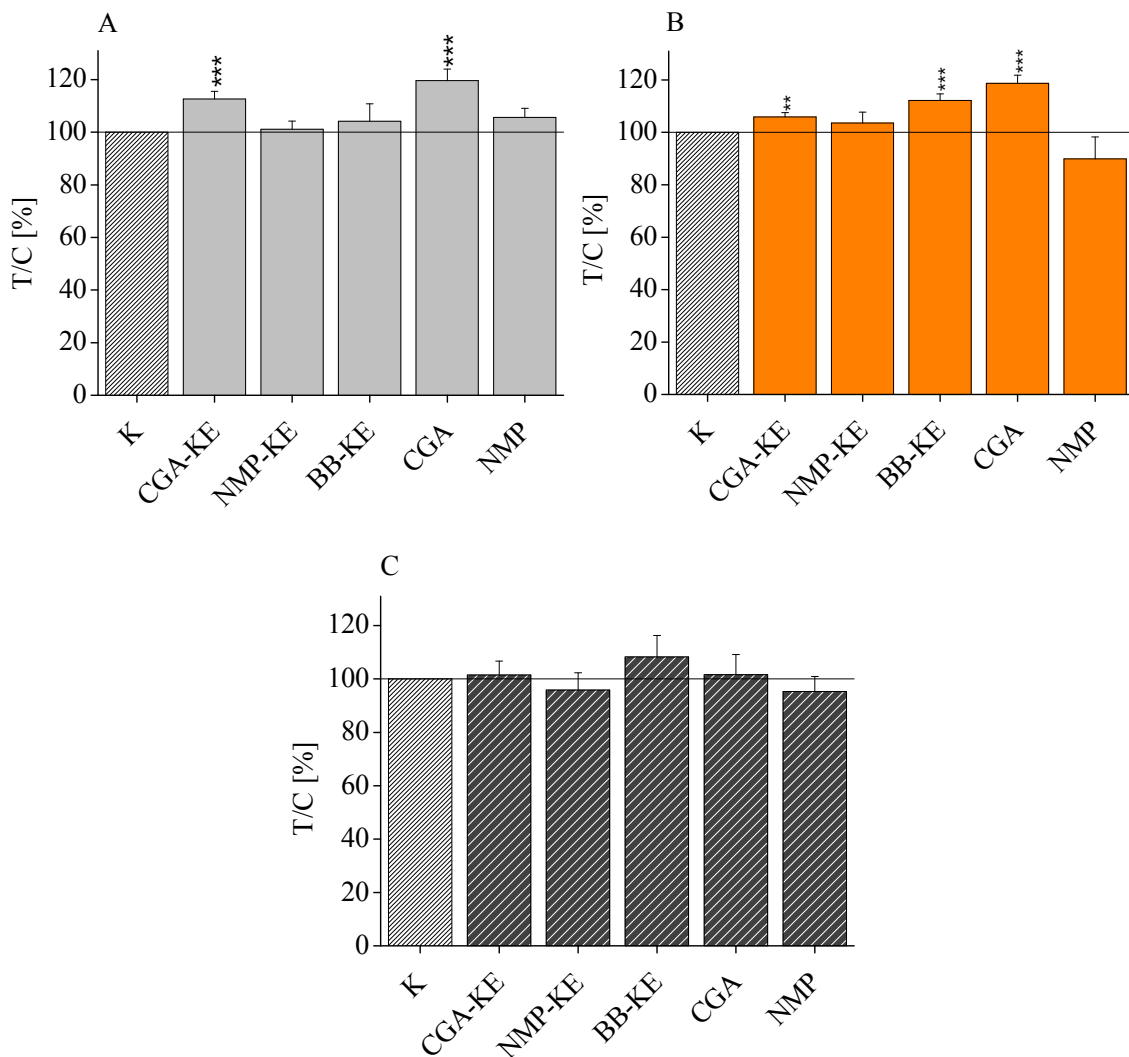


Abbildung 34:

Modulation der GST-Enzymaktivität durch die Kaffeeextrakte (10 µg/ml) und den Kaffeeinhaltsstoffen CGA und NMP (10 µM) nach (A) 24 h, (B) 48 h und (C) 72 h in HT29-Zellen. Serumhaltige Inkubation (10 % FKS) mit 0,1 % DMSO und dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle); ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. KE: Kaffeeextrakt; K = Kontrolle.

Die Konzentration von 10 µg/ml CGA-KE beinhaltet 1,6 µM CGA. Die Konzentrationen, bei denen durch CGA die GST-Enzymaktivität moduliert wurde, lag bei 10 µM, weshalb aufgrund der vergleichbaren Konzentrationsbereiche eine Beteiligung der CGA an der potenten Aktivierung der GST durch CGA-KE vermutet werden kann. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Untersuchung zeigte sich eine signifikante Zunahme der GST-Enzymaktivität nach 18 h Inkubation mit CGA in Konzentrationen von 20 µM und 40 µM in Mausepithelzellen (JB6), wobei der Anstieg bei 20 µM CGA mit vergleichbarer Effektivität

zu Tage trat wie eine 24 h Inkubation mit 10 μ M CGA in der hier durchgeführten Versuchsreihe [Feng et al. 2005]. Die GST-Aktivität in humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2) zeigten ebenso nach Inkubation mit CGA (0,025g/100 ml) eine signifikante Erhöhung nach 72 h [Somoza et al., 2003]. Konträr hierzu konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nach einer 72 h Inkubation keine Modulation der GST-Enzymaktivität beobachtet werden, wobei anzumerken ist, dass die Konzentration von 0,025 g/100 ml (0,7 mM) um den Faktor 70 höher ist, als die eingesetzte Konzentration in der hier vorliegenden Untersuchung. Weiterhin könnte ebenso ein zellspezifischer Unterschied zwischen Caco-2-Zellen und HT29-Zellen zum Tragen kommen. Die Beeinflussung der GST-Enzymaktivität durch Kaffee ist mehrfach in der Literatur beschrieben. In Caco-2-Zellen stieg durch Inkubation mit 0,05 g/100 ml (500 μ g/ml) sowie 0,1 g/100 ml (1 mg/ml) Kaffeeextrakt die GST-Enzymaktivität signifikant nach 72 h an [Somoza et al., 2003]. Weiterhin führte *in vivo* die Verabreichung von grünen Kaffeebohnen, Kaffee oder Kaffeeextrakt in unterschiedlichen Studien zu einer erhöhten Aktivität der GST in der Leber bei Ratten und Mäusen [Huber et al., 2003; Somoza et al., 2003; Wattenberg und Lam, 1984]. Ebenso zeigte eine humane Interventionsstudie einen signifikanten Anstieg der Aktivität der GST im Plasma nach einem Kaffeekonsum von 5 Tagen [Steinkellner et al., 2005]. Entgegen der vielversprechenden Datenlage aus der Literatur sowie der Effektivität des CGA-KE konnte für den NMP-KE keine Modulation der GST-Enzymaktivität in den untersuchten Zeitintervallen von 24 h, 48 h und 72 h beobachtet werden (Abbildung 34 A, B, C). NMP, dessen Gehalte in NMP-KE angereichert wurde, zeigte in der untersuchten Konzentration von 10 μ M gleichermaßen keine Beeinflussung, obgleich in dieser Konzentration auf der Ebene der Gentranskription in vorangegangenen Untersuchungen potent verschiedene Isoformen der GST induziert wurden [Dissertation Böttler, 2009]. Es scheint, dass die Effekte auf Gentranskriptionsebene durch NMP nicht mit einer vermehrten Enzymaktivität, in den im Rahmen dieser Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiten, einhergehen. Der dritte untersuchte KE, BB-KE, zeigte einen potenten Anstieg der GST-Enzymaktivität nach einer 48 h Inkubation, wobei BB-KE und NMP-KE annähernd analoge Gehalte an NMP aufweisen. Ein Vergleich von NMP-KE, BB-KE und der Reinsubstanz NMP lässt vermuten, dass NMP in den KEs keine Modulation der GST-Aktivität bewirkt. Zu beachten ist hierbei, dass NMP in den Gehalten von 10 μ g/ml KE, wie sie in diesen Untersuchungen eingesetzt wurden, in deutlich geringeren Konzentrationen auftritt, als in

denen, in welchen die Modulation der GST-Aktivität durch NMP (10 μ M) als Reinsubstanz getestet wurde. Im Bezug auf die bisher veröffentlichte Literatur ist es allerdings fraglich, ob NMP in Konzentrationen $\leq 10 \mu$ M die GST-Enzymaktivität erhöhen würde. *In vitro* wurde durch eine deutlich höhere Konzentration an NMP (1 mM) eine signifikant gesteigerte GST-Aktivität nach 72 h in Caco-2-Zellen beobachtet. In weiterführenden Untersuchungen wurde für die GST-Enzymaktivität ein geringer Anstieg in der Rattenleber nach Fütterung von NMP beobachtet [Somoza et al., 2003]. NMP scheint somit erst in höheren Konzentrationen die GST-Enzymaktivität zu modulieren. Ebenso ist denkbar, dass NMP unterschiedliche Effekte auf *in vitro* und *in vivo* Ebene ausübt.

Weitere Kaffeeinhaltsstoffe scheinen an der Aktivierung der GST-Enzymaktivität durch BB-KE nach 48 h beteiligt zu sein. Der Gehalt an CGA in BB-KE könnte, wie es beim CGA-KE vermutet wird, die Modulation der GST-Aktivität bewirken. Ein Anstieg der GST-Enzymaktivität *in vivo* könnte weiterhin auch durch die Diterpene Cafestol und Kahweol vermittelt werden [Huber et al., 2003]. Koffein, der Kaffeeinhaltsstoff dem vielseitige biologische Wirkungen zugeschrieben werden, führte hingegen zu keiner Beeinflussung der GST-Aktivität nach einer 10-tägigen Fütterung von Mäusen mit je 0,07 g/100 ml Koffein *in vivo* [Abraham et al., 1999].

Abschließend betrachtet ließ sich für CGA-KE und BB-KE eine signifikante Zunahme der GST-Enzymaktivität feststellen. Eine Beteiligung von CGA scheint hierbei insbesondere für CGA-KE wahrscheinlich. NMP-KE sowie dessen charakteristischer Inhaltsstoff NMP zeigten keine Modulation der Aktivität der GST, was möglicherweise auf geringen Substanzkonzentrationen an NMP oder antagonistisch wirksamen Kaffeeinhaltsstoffe in NMP-KE beruht.

4.2 Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 durch Kaffee *in vivo*

Die vielversprechende Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen des CGA-KE und NMP-KE *in vitro* konnte sich bereits auf die *in vivo* Situation übertragen lassen. Der vierwöchige Konsum des CGA-Kaffees zeigte in einer ersten humanen Interventionsstudie eine leichte Erhöhung der Gentranskripte der γ -CGL, HO1, Nrf2 sowie einen deutlichen Anstieg der NQO1. Weiterhin bewirkte der Konsum des NMP-Kaffees eine potente Zunahme der Gentranskription der HO1 und Nrf2 [Dissertation Böttler, 2009]. Im Rahmen dieser Dissertation sollte geklärt werden, ob die Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 von Probanden nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend moduliert werden kann. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Eisenbrand (TU Kaiserslautern) eine zweite humane Interventionsstudie durchgeführt, deren Studiendesign in Abbildung 35 dargestellt ist.

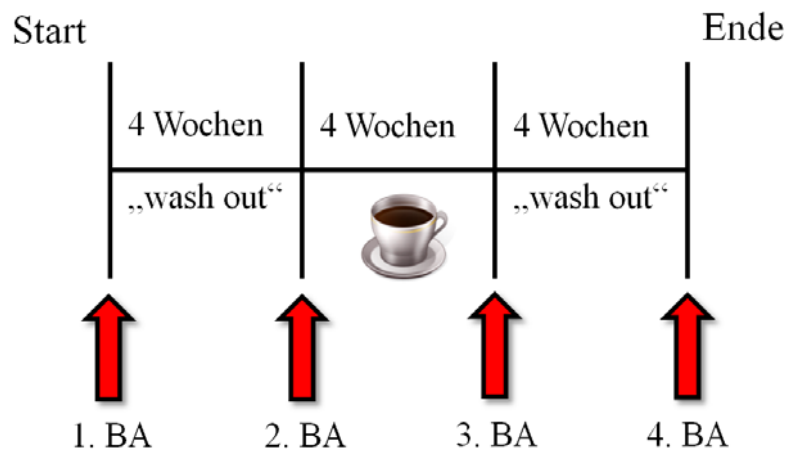


Abbildung 35: Studiendesign der humanen Interventionsstudie II. BA: Blutabnahme.

Die Studie war charakterisiert durch drei Abschnitte über je vier Wochen, wobei das Blut von 35 Probanden zu vier Zeitpunkten entnommen wurde. Die erste Blutabnahme (BA) wurde vor Beginn der Studie durchgeführt. Die zweite und vierte BA wurden nach einer vierwöchigen „wash out“ Phase vorgenommen, in der die Probanden neben dem Verzicht auf Kaffee eine polyphenolarme Diät einhalten mussten. Die dritte BA zeichnete sich durch einen vierwöchigen Konsum von täglich insgesamt 750 ml Kaffee Brazil Blend aus, aufgeteilt in drei Portionen von jeweils 250 ml. Aus dem entnommenen Blut wurden vor Ort die

Lymphozyten isoliert und anhand von sechs exemplarisch ausgewählten Probanden zunächst eine Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray durchgeführt, mit dem Ziel, Modulationen eines weiten Spektrums an antioxidativ wirksamen sowie der als potentielle Biomarker geeigneten Genen zu erfassen. Anschließend wurde aus den Lymphozyten aller Probanden die RNA gewonnen, um die Gehalte der Gentranskripte ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 mittels quantitativer Real Time PCR während der verschiedenen Studienabschnitte zu bestimmen.

4.2.1 *Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray*

Mithilfe des Oligo GEArray® Human Toxicology and Drug Resistance Mikroarrays ist die Kartierung des RNA-Pools eines Gewebes oder einer Zellkultur möglich. Hierbei können Expressionsveränderung von 260 Genen erfasst werden, weshalb der Mikroarray im Vorfeld zur Erfassung noch nicht ausgewiesener, potentieller Markergene für die Untersuchung der peripheren Lymphozyten der humanen Interventionsstudie II mittels Real Time PCR herangezogen wurde.

Der Mikroarray wurde bei sechs exemplarisch ausgewählten Probanden angewandt, wobei das Verhältnis Kaffeephase gegen „wash out“ Phase I betrachtet wurde. Die Auswertung des Mikroarrays ließ erkennen, dass von den 260 auf dem Array erfassten Genen, 76 eine Expression ≥ 1 anzeigten. Eine genauere Betrachtung ergab allerdings, dass diese Induktion mehrfach nur ein einmaliger Effekt war d.h nur bei einem der sechs untersuchten Probanden auftrat. Bei 30 der 260 Gene konnte hingegen eine Expression ≥ 1 bei zwei oder mehr Probanden festgestellt werden. Das Ergebnis ist in Tabelle 10 aufgeführt, Abbildung 36 zeigt eine graphische Darstellung.

Bei 12 Genen konnte eine gesteigerte Expression bei der Hälfte der untersuchten sechs Probanden festgestellt werden (Abbildung 36. schraffierte Balken). Die zwei potentesten Gene waren GSTM5 und Interleukin (IL) 18 (Abbildung 36, orange Balken), ihre Expression zeigte bei vier der sechs Probanden eine erhöhte Expression im Vergleich der Kaffeephase zur „wash out“ Phase I. Die Genexpression der GSTM5 wurde von allen Genen des Mikroarray am potentesten bei der höchsten Anzahl an Probanden induziert. Weiterhin zeigen die Ergebnisse des Mikroarrays, dass eine starke Heterogenität innerhalb der sechs Probanden im Bezug auf ihre Sensitivität nach Kaffeekonsum vorzuherrschen scheint. Wie aus Tabelle 10 und Abbildung 36 ersichtlich wird, zeigten Proband 10 (80 %) und Proband 19 (96 %) unter

den hier dargestellten 30 Genen des Array bei fast allen Genen eine Expression ≥ 1 , während die Genexpression von Proband 6 (10 %) durch den Konsum von Brazil Blend nahezu keine erhöhte Expression der untersuchten Gene beobachten ließ.

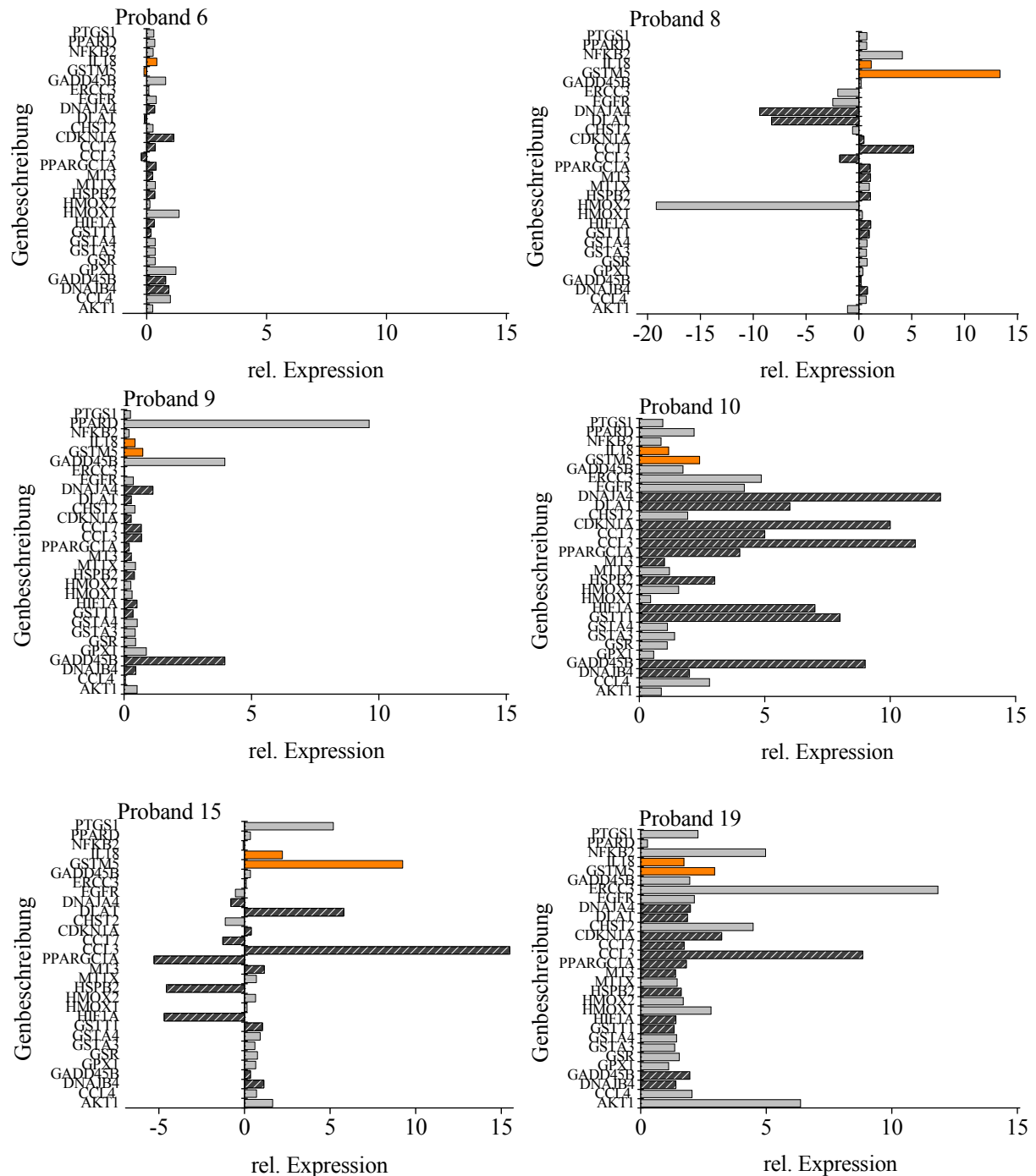


Abbildung 36:

Rel. Expression nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend in peripheren Lymphozyten von sechs Probanden der humanen Interventionsstudie II, gemessen mittels Mikroarray. Dargestellt ist die Expression jener Gene, welche eine Induktion von min. 1,0 zeigten und dieser Effekt bei ≥ 2 Probanden auftrat.

Tabelle 10: Rel. Expression nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend in peripheren Lymphozyten von sechs Probanden gemessen anhand des Mikroarrays. Dargestellt ist die Expression jener Gene, welche eine Induktion von min. 1,0 (dick hinterlegt) zeigen und dieser Effekt bei ≥ 2 Probanden auftrat. P: Proband.

Genbeschreibung (englisch)	P6	P8	P10	P19	P9	P15
AKT1 V (akt murine tymoma viral oncogene homolog 1)	0,26	-1,08	0,88	6,36	0,51	1,65
CCL4 (Chemokine ligand 4)	0,99	0,70	2,80	2,05	0,05	0,71
DNAJB4 (DanJ (HSP40) homolog)	0,92	0,80	1,09	1,40	0,46	1,13
GADD45B *	0,79	0,21	1,74	1,95	3,96	0,35
GPX1 (Gluthione peroxidase 1)	1,21	0,38	0,57	1,11	0,87	0,66
GSR (Glutathion reductase)	0,35	0,78	1,11	1,54	0,45	0,76
GSTA3 (Glutathion-S-Transferase A3)	0,35	0,72	1,40	1,36	0,44	0,61
GSTA4 (Glutathion-S-Transferase A4)	0,35	0,76	1,11	1,43	0,52	0,91
GSTT1 (Glutathion-S-Transferase theta 1)	0,18	0,98	1,40	1,34	0,35	1,05
HIF1A (Hypoxia-inducible factor 1)	0,32	1,11	1,38	1,40	0,51	-4,70
HMOX1 (Heme oxygenase 1)	1,35	0,33	0,45	2,80	0,32	0,15
HMOX2 (Heme oxygenase 2)	0,14	-	1,56	1,70	0,27	0,65
HSPB2 (Heat shock 27 kDa protein2)	0,34	1,09	1,17	1,61	0,40	-4,57
MT1X (Metallothionein 1X)	0,36	0,98	1,20	1,45	0,44	0,70
MT3 (Metallothionein 3 (growth inhibitory factor))	0,25	1,10	1,05	1,38	0,28	1,16
PPARGC1A **	0,39	1,07	1,18	1,82	0,20	-5,29
CCL3 (Chemokine ligand 3)	-	-1,84	4,41	8,84	0,69	15,51
CCT7 (Chaperonin containing TCP1)	0,35	5,17	1,25	1,73	0,67	-1,26
CDKN1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor)	1,12	0,47	3,21	3,23	0,27	0,39
CHST2 (Carbohydrate sulfotransferase 2)	0,26	-0,61	1,93	4,47	0,42	-1,13
DLAT (Dihydrolipoamide S-acetyltransferase)	-	-8,27	1,32	1,86	0,28	5,80
DNAJA4 (DnaJ homolog)	0,33	-9,40	5,44	1,98	1,13	-0,80
EGFR (epidermal growth fractor receptor)	0,40	-2,47	4,18	2,14	0,36	-0,52
ERCC3 ***	0,09	-2,01	4,86	11,84	0,01	0,10
GSTM5 (Glutathione S-transferase M5)	-	13,35	2,41	2,95	0,73	9,23
IL18 (Interleukin 18)	0,42	1,15	1,17	1,72	0,43	2,22
NFKB2 (Nuclear factor of kappa light polypeptide)	0,27	4,12	0,87	4,98	0,20	-0,08
PPARD (Peroxisome proliferative activated receptor)	0,34	0,74	2,19	0,27	9,62	0,35
PTGS1 (Prostagladin-endoperoxide synthase 1)	0,30	0,75	0,94	2,28	0,25	5,19

* (Growth arrest and DNA damage includible,beta)

** (Peroxisome proliferation activated receptor coactivator)

*** (Excision repair cross complaining rodent repair deficiency)

Der Oligo GEArray® Human Toxicology and Drug Resistance Mikroarray wurde ebenso für die Untersuchung der isolierten peripheren Lymphozyten der humanen Interventionsstudie I nach vierwöchigem Konsum von CGA-Kaffee und NMP-Kaffee angewandt. Hierbei wurden nur von vier Probanden die peripheren Lymphozyten untersucht und das Hauptaugenmerk lag auf den 50 stresssensitiven Gene des Arrays. [Dissertation Böttler, 2009]. Es zeigt sich, dass der vierwöchige Konsum von CGA-Kaffee sowie NMP-Kaffee mehr stressensitive Gene in ihrer relativen Expression erhöhte und diese ausgeprägter war, im Verhältnis zum vierwöchigen Konsum des Kaffees Brazil Blend. Von den stresssensitiven Genen konnten bei 11 Genen Überschneidungen im Bezug auf ihre Modulation nach vierwöchigem Kaffee Konsum beobachtet werden. Tabelle 11 zeigt die stresssensitiven Gene, welche übereinstimmend durch den Konsum von Kaffee Brazil Blend sowie CGA-Kaffee und NMP-

Kaffee in ihrer Expression über 1 erhöht wurden und dies gleichzeitig bei ≥ 2 Probanden auftrat. Für die sechs Gene GSTT1, HIF1A, HMOX1 (HO1), MT1X, MT3 und PPARGC1A ließ sich nach Konsum von allen drei Kaffees eine erhöhte Expression (≥ 1) mittels Array feststellen. Für HO1 zeigte sich eine solche Analogie bereits auf *in vitro* Ebene. CGA-KE, NMP-KE und BB-KE induzierten nach einer Inkubationszeit von 3 h die Gentranskripte der HO1 in HT29-Zellen (vgl. Abschnitt 4.1.5).

Tabelle 11: Stresssensitive Gene, die sowohl nach vierwöchigem Konsum von CGA-Kaffee, NMP-Kaffee als auch Kaffee Brazil Blend in ihrer rel. Expression eine Induktion von min. 1 zeigten und dieser Effekt gleichzeitig bei ≥ 2 Probanden auftrat, gemessen in peripheren Lymphozyten mittels Mikroarray. BB: Brazil Blend.

Genbezeichnung (englisch)	CGA-Kaffee	NMP-Kaffee	Kaffee BB
CCL4 (Chemokine ligand 4)	-	✓	✓
GSR (Glutathion reductase)	✓	-	✓
GSTA3 (Glutathion-S-Transferase A3)	✓	-	✓
GSTA4 (Glutathion-S-Transferase A4)	✓	-	✓
GSTT1 (Glutathion-S-Transferase theta 1)	✓	✓	✓
HIF1A (Hypoxia-inducible factor 1)	✓	✓	✓
HMOX1 (Heme oxygenase 1)	✓	✓	✓
HMOX2 (Heme oxygenase 2)	✓	-	✓
MT1X (Metallothionein 1X)	✓	✓	✓
MT3 (Metallothionein 3 (growth inhibitory factor))	✓	✓	✓
PPARGC1A *	✓	✓	✓

✓ = Expression von min. 1,0 bei ≥ 2 Probanden, - = keine erhöhte Expression; *=(Peroxisome proliferation activated receptor, coactivator).

Zusammenfassend ergab die Untersuchung des Oligo GEArray® Human Toxicology and Drug Resistance Mikroarray eine Auswahl an 30 potentiellen Markergenen, die sich für die Untersuchung in peripheren Lymphozyten der humanen Interventionsstudie II mittels Real Time PCR eignen würden. Die relative Expression dieser 30 Gene stieg nach vierwöchigem Konsum des Kaffees Brazil Blend im Vergleich zur „wash out“ Phase I über eins an, wobei diese Effekte bei zwei oder mehreren Probanden sichtbar wurden. Auffallend ausgeprägt war

der Anstieg der Genexpression der GSTM5, weshalb diese in die Untersuchungen der Gentranskription der peripheren Lymphozyten mittels Real Time PCR einbezogen wurde. Allerdings lassen die Ergebnisse des Arrays eine Heterogenität im Probandenkollektiv vermuten, da die Sensitivität der Modulation der Genexpression nach vierwöchigem Konsum des Kaffees Brazil Blend bei den sechs Probanden unterschiedlich war.

4.2.2 *Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 durch vierwöchigen Konsum von Kaffee Brazil Blend*

Anhand der Ergebnisse des Mikroarrays, den *in vitro* Untersuchungen sowie Literaturvergleichen wurde eine Auswahl an Phase-II-Enzymen getroffen, deren Transkripte in den *in vivo* Untersuchungen mittels quantitativer Real Time PCR betrachtet werden sollten. Weiterhin wurde der Transkriptionsfaktor Nrf2, ein Schlüsselement in der Induktion von Phase-II-Enzymen, in die Untersuchungen miteinbezogen. Von 35 Probanden konnten aufgrund schlechter RNA-Qualität nur die peripheren Lymphozyten von 29 Probanden über den gesamten Verlauf der Studie untersucht werden. Für die GSTT waren die Transkripte nur für eine Anzahl von insgesamt 22 Probanden erfassbar. Die Ergebnisse der Gentranskription der ausgewählten Phase-II-Enzyme und Nrf2 über den gesamten Verlauf der Humanstudie sind in Abbildung 37 als Mittelwert aller Probanden sowie in Abbildung 38 als Einzelwerte der einzelnen Probanden darstellt. Normiert wurde auf die rel. Transkription von eins bei der ersten „wash out“ Phase, dies entspricht der Transkriptmenge bei der zweiten Blutabnahme (2. BA). Von einer erhöhten Transkriptmenge wurde bei Werten $\geq 1,5$ ausgegangen.

Zu Beginn der Studie (1. BA) zeigte sich im Mittel aller Probanden ein erhöhter Nrf2-Transkriptgehalt (Abbildung 37). Eine genauere Betrachtung der einzelnen Probanden lässt erkennen, dass dieser Mittelwert aus einer breiten Streuung der Nrf2-Transkription der einzelnen Probanden resultierte (Abbildung 38, A). Bei 13 Probanden war der Wert der rel. Transkription von Nrf2 $\geq 1,5$ und bei 16 Probanden $\leq 1,5$. Der vierwöchige Konsum von Brazil Blend (3. BA) führte im Vergleich zur ersten „wash out“ Phase (2. BA) im Mittel aller Probanden zu einer signifikanten Zunahme der Nrf2-Transkriptmenge (Abbildung 37).

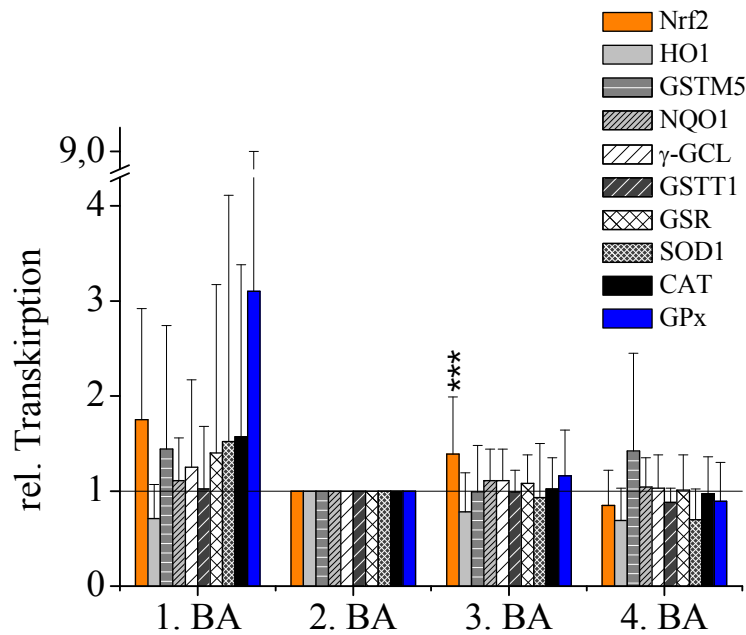
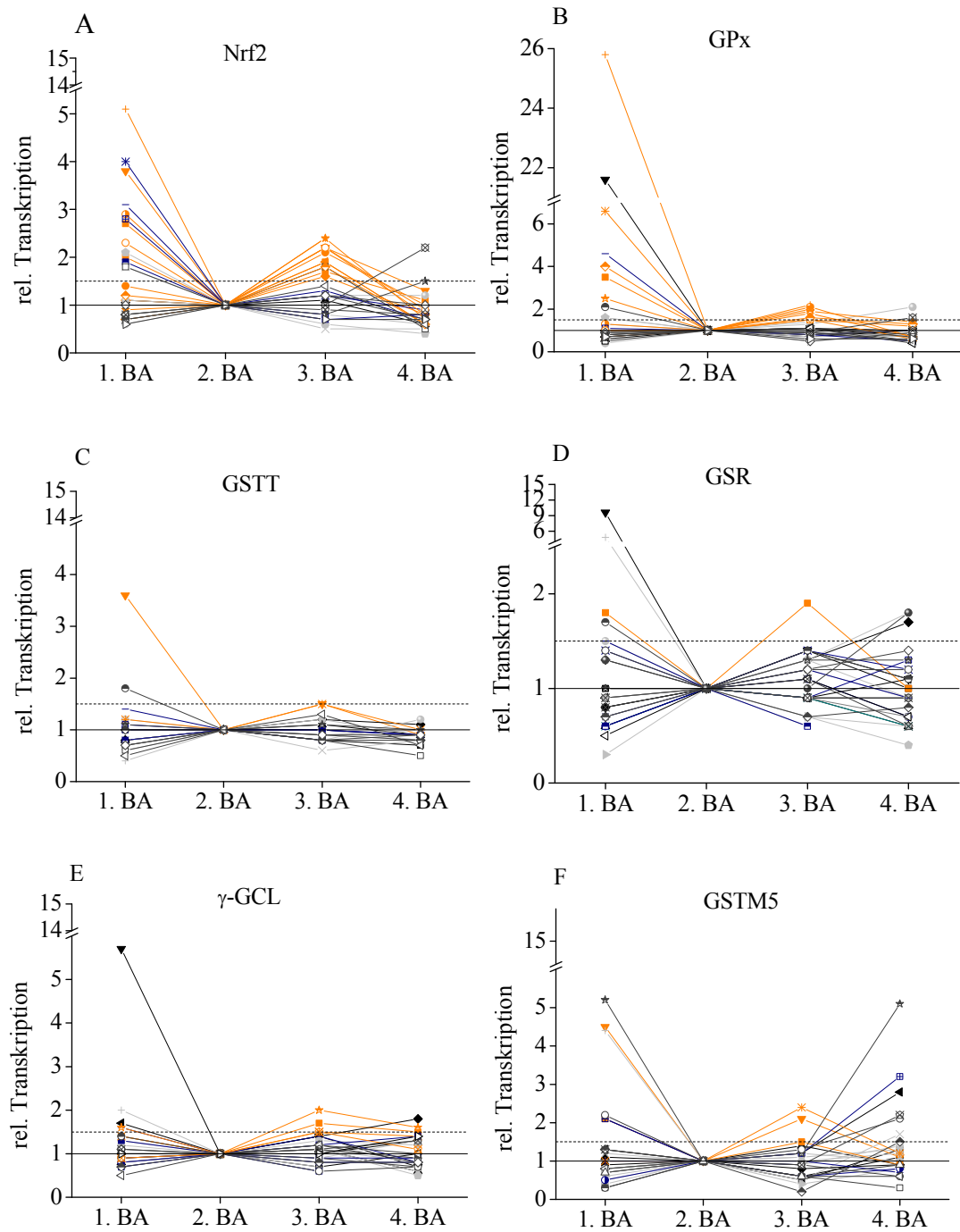


Abbildung 37:

Beeinflussung der rel. Gentranskription antioxidativer Phase-II-Enzyme im Verlauf der humanen Interventionsstudie II in peripheren Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 29 Probanden (bzw. 22 Probanden für GSTT1). Normalisiert wurde auf β -Aktin. 1. BA: Blutabnahme vor Beginn der Studie; 2. BA und 4. BA: Blutabnahme nach vierwöchigem „wash out“; 3. BA: Blutabnahme nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend. Nrf2: NF-E2 p45 subunit-related factor 2. GST: Glutathione-S-Transferase. NQO1: NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase 1; CAT: Katalase; SOD1: Superoxiddismutase 1; GPX: Glutathionperoxidase 1; γ -GCL: γ -Glutamylcyteinsynthase; HO1: Hämoxygenase-1; GSR: Glutathionreduktase. Student's *t*-test (bezogen auf „wash out“ Phase I bei rel. Transkription von 1) *** = $p < 0,005$.

Wie der Verlauf der Einzelwerte in Abbildung 38 (A) zeigt, erhöhte der Konsum von Brazil Blend bei 12 der 29 Probanden (41 %) die Nrf2-Transkription über das rel. Transkriptionslevel von 1,5. Im Gegensatz dazu lässt sich sowohl im Mittel aller Probanden in Abbildung 37 als auch bei der individuellen Betrachtung der Einzelwerte in Abbildung 38 (A) erkennen, dass die „wash out“ Phase II (4. BA) zu keiner erhöhten Nrf2-Transkription führte. Die bei 41 % der Probanden beobachtete Induktion der Nrf2-Transkription durch die Kaffeeintervention war nach einer vierwöchigen Kaffeepause und einer polyphenolarmen Ernährung nicht mehr sichtbar. Die Betrachtung der basalen Transkriptmenge (1. BA) der Phase-II-Enzyme in Abbildung 38 zeigte im Vergleich zu der von Nrf2 eine geringere Streuung, wobei weniger Probanden einen Transkriptgehalt von $\geq 1,5$ aufwiesen. Besonders deutlich traf dies für die Gentranskripte der HO1, NQO1, GSTT1 und SOD1 zu, die

Probandenzahl mit erhöhten Gentranskripten lag bei unter 10 % (1. BA, Abbildung 38 C, G-J).



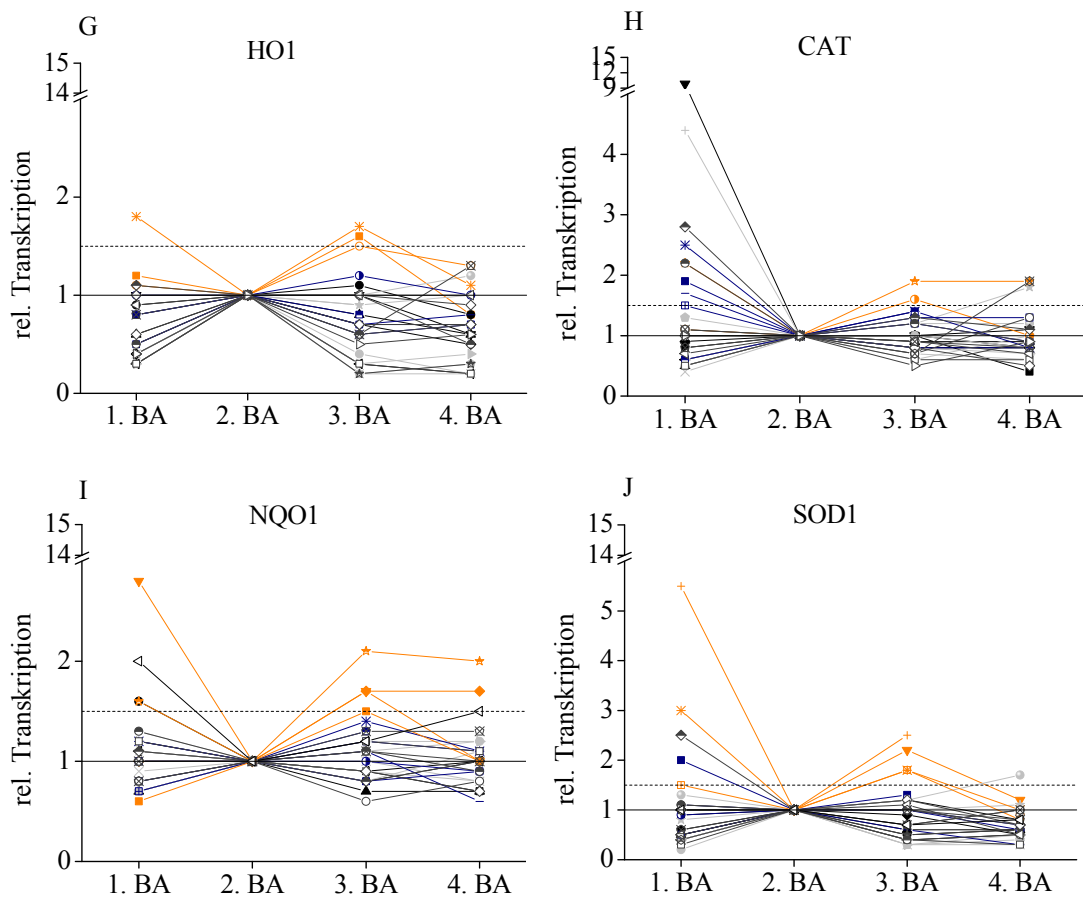


Abbildung 38:

Beeinflussung der rel. Gentranskription antioxidativer Phase-II-Enzyme im Verlauf der humanen Interventionsstudie II in peripheren Lymphozyten. Dargestellt sind die Einzelwerte der jeweiligen 29 Probanden bzw. 22 Probanden für GSTT1. Normalisiert wurde auf β -Aktin. 1. BA: Blutabnahme vor Beginn der Studie; 2. BA und 4. BA: Blutabnahme nach vierwöchigem „wash out“; 3. BA: Blutabnahme nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend. (A) Nrf2: NF-E2 p45 subunit-related factor 2; (B) GPX: Glutathionperoxidase 1; (C) GST: Glutathione-S-Transferase (GST) T; (D) GSR: Glutathione reductase; (E) γ -GCL: γ -Glutamylcysteinsynthase; (F) GSTM5; (G) HO1: Hämoxxygenase-1; (H) CAT: Katalase; (I) NQO1: NAD(P)H: Chinonoxido-reductase 1; (J) SOD1: Superoxiddismutase 1. Orange Linien: rel. Transkription der 3. BA $\geq 1,5$.

Im Mittel aller Probanden lässt sich im Vergleich der Kaffeephase (3. BA) zur „wash out“-Phase I (2. BA) keine erhöhte Transkriptmenge aller neun betrachteten Gene der Phase-II-Enzyme beobachten (Abbildung 37). Ein detaillierteres Bild entsteht bei der Betrachtung der dritten BA der Abbildung 38, B-J. Die prozentuale Anzahl an Probanden, die durch den Kaffeekonsum eine Transkriptmenge $\geq 1,5$ aufwiesen, war für die Gene der Phase-II-Enzyme unterschiedlich und stellt sich wie folgt dar:

GPx (27 %)>NQO1, γ -GCL, SOD1(13 %)>HO1, GSTM5 (10 %)>GSTT1 (9 %)>CAT (7 %)>GSR(3 %)

Obgleich die GPx im Mittel aller Probanden keine erhöhte Transkriptmenge aufwies, war sie unter den untersuchten Genen der Phase-II-Enzyme jenes Gen, das bei den meisten Probanden induziert wurde. Die GSR zeigte hingegen bei der geringsten Anzahl an Probanden eine erhöhte Transkription durch Kaffeekonsum. Die der Kaffeephase angeschlossene vierwöchige „wash out“ Phase II ließ für den größten Teil der Probanden keine Erhöhung der Gentranskripte der Phase-II-Enzyme erkennen. Lediglich bei der GSTM5 war bei fünf Probanden eine Zunahme an Gentranskripten $\geq 1,5$ bei der vierten BA festzustellen (Abbildung 38, F). Analog zu Nrf2 sank der Transkriptgehalt an Phase-II-Enzymen bei Probanden, die im Anschluss der Kaffeephase einen erhöhten Transkriptgehalt aufwiesen, nach der vierwöchigen „wash out“ Phase II wieder ab (Abbildung 38).

Die im Rahmen der humanen Interventionsstudie II erzielten Ergebnisse ergaben eine signifikant vermehrte Transkriptmenge an Nrf2 im Mittel aller Probanden nach dem vierwöchigen Konsum von Kaffee Brazil Blend. In der Literatur konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Transkription von Nrf2 und chemopräventiven und antikanzerogenen Effekten belegt werden. Darüber hinaus scheint eine Verminderung der Nrf2 mRNA in *nrf2*^(-/-) Mäusen zu einem kompletten Verlust der chemoprotektiven Wirkung der Aktivatoren von Phase-II-Enzymen wie Olipraz zu führen und signifikant die Sensitivität von Mäusen gegenüber chemischen Karzinogenen zu erhöhen [Romos-Gomez et al., 2001]. Weiterhin zeigte sich, dass ein Verlust der Nrf2-Expression durch genetische Polymorphismen dazu führte, ein signifikant höheres Risiko zu entwickeln, nach einem Trauma eine akute Lungeninsuffizienz zu entwickeln [Marcez et al., 2007]. Eine aktuelle Studie beschreibt, dass die Expression von Nrf2 und das Risiko einer Krebserkrankung einem U-kurvigen Verlauf folgt. Demnach steigt das Krebsrisiko bei einer zu geringen Nrf2 Expression, wie es durch Polymorphismen im Nrf2-Gen entstehen kann. Eine Hyperexpression an Nrf2, beispielweise durch Mutationen im Nrf2-Suppressor Keap1, fördert gleichwohl das Krebsrisiko. Zwischen diesen zwei Extremen liegt der Bereich mit dem geringsten Krebsrisiko und einer mäßig gesteigerte Nrf2-Expression, von der die Autoren vermuten, dass diese durch ernährungsbedingte Einflüsse erreicht werden könnte [Kensler und Wakabayashi, 2010]. Weiterhin wird berichtet, dass die *de novo*-Synthese von Nrf2 als erster Schritt einer Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges eingeleitet werden kann [vgl. Abschnitt 2.4.2]. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen scheinen darauf hin zu deuten, dass ein vierwöchiger Konsum des Kaffees Brazil Blend die *de novo* Synthese von

Nrf2 einleitet, was weiterführend zur Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges führen kann. Bestätigend zu den Ergebnissen der humanen Interventionsstudie II zeigten Paur et al. (2010) einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges und dem Konsum von Kaffee. *In vivo* führte Kaffee zu einem Anstieg der EpRE Luciferase-Aktivität in der Leber bei transgenen Mäusen mit einem EpRE-Reporter. Darüber hinaus konnte ein Anstieg der Nrf2-Genexpression nach Inkubation mit stark geröstetem Kaffee *in vitro* verzeichnet werden. Eine Modulation von Nrf2 konnte bereits *in vivo* durch die humane Interventionsstudie I beobachtet werden. Der vierwöchige Konsum von CGA-Kaffee sowie von NMP-Kaffee führte im Mittel aller Probanden zu einer erhöhten Nrf2-Transkriptmenge [Dissertation Böttler, 2009]. Rückschlüsse auf eine direkte Beteiligung der Leitverbindungen CGA und NMP auf die erfassten Effekte sind aufgrund der limitierten *in vivo* Datenlage schwierig. Allerdings zeigten die NMP-reichen Kaffees Brazil Blend und NMP-Kaffee im Mittel potentere Effekte auf die Nrf2-Transkription als CGA-Kaffee, weshalb ein Beitrag von NMP an der Nrf2-induzierenden Wirkung von Kaffee vermutet werden kann. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um eine direkte Beteiligung von NMP an einer Induktion der Nrf2-Transkription *in vivo* postulieren zu können.

In der Literatur ist beschrieben, dass ein Anstieg an Nrf2-Protein mit einer vermehrten Genexpression des Phase-II-Enzymes Katalase einhergeht [Radjendirane et al., 1996]. Entgegen dieser Literaturangabe und des vielversprechenden Effektes auf die Nrf2-Transkription zeigte der Konsum von Kaffee Brazil Blend im Mittel aller Probanden keine erhöhte Transkriptmenge der neun untersuchten Phase-II-Enzyme. In der Literatur wurden bereits ein Zusammenhang mit Kaffee und Phase-II-Enzyme *in vivo* beschrieben. In einer Studie wurden transgene Mäuse untersucht, die UGT1A überexprimieren. Hierbei ließ sich eine 10-bis 14-fache Induktion der Gentranskription des Phase-II-Enzymes UGT1A1 in der Leber und im Magen der transgenen Mäusen nach oraler Gabe von Kaffee *in vivo* beobachten [Kalthoff et al., 2010]. Eine 15-tägige Fütterungsstudie mit bis zu 5 % Kaffee im Futter führte in der Rattenleber zu einer Induktion der Proteinexpression verschiedener GST-Isoformen [Cavin et al., 2008]. Bichler et al. (2007) zeigten einen signifikanten Anstieg der SOD1-Enzymaktivität in humanen Lymphozyten nach einem fünftägigem Kaffeekonsum. Obgleich die Literatur mehrfach eine Stimulation von Kaffee auf verschiedene Phase-II-Enzyme nachgewiesen wurde, scheinen die Ergebnisse der ausbleibenden Induktion der Gentranskription der untersuchten Phase-II-Enzyme stimmig mit den Untersuchungen des

Projektpartners des AG Somoza (TUM) im Bereich der Enzymaktivität. Die im Rahmen der humanen Interventionsstudie II untersuchten Erythrozyten zeigten für die SOD1, GPx und Katalase im Mittel aller Probanden eine Abnahme der Aktivität nach vierwöchigem Konsum von Brazil Blend im Vergleich zur ersten „wash out“ Phase [AG Somoza, Kotyczka, unveröffentlichte Daten]. Der Konsum von Kaffee Brazil Blend scheint demnach eine Aktivierung weder auf Transkriptionsebene für die ausgewählten Phase-II-Enzyme noch im Bereich der Enzymaktivität für die SOD1, GPx und Katalase anzudeuten. Lediglich die Aktivität der GSR konnte bei Betrachtung der Gesamtprobandenanzahl vom AG Eisenbrandt (TU Kaiserslautern) eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität nach der Kaffeephase im Vergleich zur ersten und zweiten „wash out“ Phase vorweisen [AG Eisenbrandt, Böhm, unveröffentlichte Daten]. Eine Erhöhung der GSR konnte in den Untersuchungen auf Transkriptionsebene nicht beobachtet werden. Die GSR wurde nach einem vierwöchigen Kaffeekonsum im Vergleich zur „wash out“ Phase I von den untersuchten Phase-II-Enzymen am schwächsten induziert und nur 3 % aller Probanden hatten erhöhte GSR-Transkriptmengen. Es scheint, als induziere der Kaffee Brazil Blend die GSR-Enzymaktivität allerdings ohne einen Anstieg der GSR-Gentranskription zu vermitteln.

Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse zur Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen *in vivo* können des Weiteren mit der humanen Interventionsstudie I verglichen werden. Im Gegensatz zum vierwöchigen Konsum von Brazil Blend ließen sich im Mittel aller Probanden für den CGA-Kaffee erhöhte Transkriptmengen der γ -CGL, HO1 und NQO1, sowie für den NMP-Kaffee eine Zunahme an HO1 Transkripte feststellen [Dissertation Böttler, 2009]. Wie bereits erwähnt, zeigte sich im Unterschied zu den Phase-II-Enzymen für die Transkriptionsveränderungen von Nrf2 übereinstimmend für alle drei Kaffees eine Stimulation. Es stellt sich somit die Frage, weshalb der Konsum von Brazil Blend nicht, wie bei CGA-Kaffee oder NMP-Kaffee beobachtet, im Mittel aller Probanden zu einer Induktion der Transkription der untersuchten Phase-II-Enzyme führt. Hierzu muss das unterschiedliche Studiendesign der zwei humanen Interventionsstudien berücksichtigt werden. Die größten Unterschiede ergeben sich in der Verabreichung des Kaffees, die Dauer der „wash out Phase“ und den verschiedenen Probanden, die an den zwei Studien teilgenommen hatten (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich des Studiendesigns der zwei humanen Interventionsstudien.

Humane Interventionsstudie I	Humane Interventionsstudie II
Bolusgabe von 500 ml Kaffee/Tag	Dreimal je 250 ml Kaffee über den Tag verteilt/Tag
„wash out“ Phase: 2 Wochen	„wash out“ Phase: 4 Wochen
Probandenkollektiv I	Probandenkollektiv II

Ein direkter Vergleich der Wirkung des CGA-, NMP-Kaffees und des Kaffees Brazil Blend bezüglich ihres Einflusses auf die Transkription von Phase-II-Enzymen *in vivo* ist demnach erschwert. Ungeachtet dessen scheint die Zusammensetzung des Brazil Blend mit stark erhöhten Gehalten an NMP und moderaten Anteilen an CGA im Vergleich zu den Wirkungen durch CGA-, NMP-Kaffee nicht additiv auf die Potenz der Erhöhung der Transkription von Phase-II-Enzymen zu wirken.

Der Mikroarray wurde in diesen *in vivo* Untersuchungen als Vorversuch eingesetzt, um eine Tendenz an potenziell, auf Kaffee Brazil Blend Intervention sensitiv reagierende Gene von Phase-II-Enzymen festzustellen. Ein Vergleich der Daten des Mikroarray und den Ergebnissen der Untersuchungen der peripheren Lymphozyten mittels Real Time PCR lässt hierbei jedoch wenige Übereinstimmungen feststellen. Die Gene der GPx, GSR, GSTT1, HO1 und GSTM5 ließen im Mikroarray, im Vergleich der Kaffeephase zur „wash out“ Phase I, unter den sechs exemplarisch ausgewählten Probanden zwölfmal eine Expression ≥ 1 erkennen. Die analogen Gene und die gleichen Probanden zeigten in weiterführenden Untersuchungen im Vergleich der Kaffeephase zur „wash out“ Phase I, per Real Time PCR, nur einmal eine erhöhte Transkription. Demnach scheint die Untersuchungsmethode des Mikroarrays mit der Endpunktmessung der Genexpression und die Gentranskriptionsuntersuchungen mittels Real Time PCR keine übereinstimmenden Effekte anzuzeigen. Allerdings deutete sich die Heterogenität im Probandenkollektiv bereits in den Mikroarray-Untersuchungen an und bestätigte sich nachfolgend bei der Untersuchung aller Probanden mittels Real Time PCR. In Tabelle 13 sind die sogenannten „Responder“ dargestellt, d.h. jene Probanden, die im Vergleich der Kaffeephase zur „wash out“ Phase I eine rel. Transkription $\geq 1,5$ aufwiesen. Deutlich wird hierbei, dass 62 % aller Probanden (18 von 29) bei mindestens einem Gen eine erhöhte Transkription zeigten. Im besonderen Maße

sensitiv scheinen 27 % (8 von 29) aller Probanden zu sein, da bei ihnen bei drei oder mehr Genen eine erhöhte Transkription sichtbar wurde (hervorgehoben in Tabelle 13).

Tabelle 13: Auswahl an Probanden, deren rel. Transkription $\geq 1,5$ im Vergleich der Kaffeephase zur „wash out“ Phase I. P: Proband; - : keine erhöhte Transkription.

	P1	P3	P5	P6	P7	P10	P14	P16	P17	P19	P20	P21	P22	P23	P26	P29	P32	P33
Nrf2	1,7	2,1	2,2	1,6	1,9	2,4	2,4	1,9	-	2,2	-	-	-	1,8	2,2	1,8	-	-
GPx	-	-	-	-	-	-	2,2	1,5	1,8	2,1	-	2	1,9	-	1,5	1,6	-	-
GSTM5	-	-	2,1	-	-	-	-	1,5	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NQO1	-	-	1,7	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	1,5	-
γ-GCL	1,7	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	2	-	-	-	-	1,5
GSTT1	-	-	1,5	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSR	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOD1	-	-	2,2	-	-	-	2,5	-	1,8	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-
CAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	1,9	-	-	-	-	-
HO1	1,6	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-

Eine genauere Betrachtung zeigte allerdings auch, dass bei 37 % (11 von 29) aller Probanden keine Induktion der Transkription der ausgewählten Phase-II-Enzyme sichtbar wurde und diese Probandengruppe wenig sensitiv auf den Konsum von Brazil Blend zu reagieren schien. Eine mögliche Erklärung für die im Probandenkollektiv vorzuliegende unterschiedliche Sensitivität auf Kaffeekonsum könnten genetisch bedingte Polymorphismen sein. Wie in Abschnitt 2.8 dargestellt, werden Polymorphismen für Nrf2 und für fast allen hier untersuchten Phasen-II-Enzyme in der Literatur beschrieben. Polymorphismen der einzelnen Gene und daraus resultierende unterschiedliche Genotypen könnten hierbei für die unterschiedliche Sensitivität einzelner Personen auf die Bioaktivität von Lebensmitteln verantwortlich sein. Ein erhöhter Konsum von grünem Tee steht in Verbindung einen Schutz gegenüber Krebs der Speiseröhre zu bewirken. Eine Studie von Wang et al. (2007) konnte zeigen, dass dies nicht für Personen zutrifft, die einem GSTT1 null Genotyp angehören und denen somit die GSTT1 als detoxifizierendes Enzym fehlt. Grüner Tee konnte bei GSTT1 null Genotypen keinen erhöhten chemopräventiven Schutz bieten im Vergleich zur übrigen Bevölkerung. Eine aktuelle Studie deutet weiterhin eine unterschiedliche Wirkung durch Kaffee in UGT1A7-Wildtypformen im Vergleich zu einer UGT1A7*12 polymorphen Form an. Hierbei ergab die Inkubation mit Kaffee in Speiseröhrenepithelkarzinomzellen (KYSE70) eine signifikant induziertes UGT1A7 Wildtyp Reporterergenkonstrukt, während ein

Polymorphismus (-57 T>G) in UGT1A7 eine signifikante Abnahme der Induktion durch Kaffee erkennen ließ. [Kalthoff et al., 2010]. Möglicherweise stellt die stark unterschiedliche Sensitivität auf den Kaffeekonsum der humanen Interventionsstudie II ein Anzeichen dafür dar, dass verschiedene Genvariationen im Probandenkollektiv vorlagen. Unterstützt wird diese Theorie durch genauere Betrachtung der Gentranskriptmenge der einzelnen Probanden bei der ersten Blutabnahme zu Beginn der Studie (Abbildung 38). Hierbei konnte besonders für die Gene HO1, NQO1, GSTT1 und SOD1 ein auffällig geringer Gehalt an Transkripten festgestellt werden. Die basale Transkriptmenge einzelner Phase-II-Enzyme kann durch die individuelle Ernährung und Lebensgewohnheiten, allerdings auch durch die genetische Grundausstattung der einzelnen Probanden beeinflusst werden.

Die abweichenden Ergebnisse, im Mittel aller Probanden nach vierwöchigem Kaffee Brazil Blend Konsum, auf die Gentranskription von Phase-II-Enzymen im Vergleich zu dessen Redoxsensor Nrf2, der im Mittel aller Probanden in der Transkription erhöht wurde, könnten weiterhin durch unterschiedliche Regulationswege erklärt werden. Für die im Rahmen der humanen Interventionsstudie II untersuchten Phase-II-Enzyme wird in der Literatur eine Induktion der Gentranskription über ARE in dessen Promotorregion beschrieben (vgl. Abschnitt 2.7). Des Weiteren wird auch für Nrf2 selbst ein ARE angenommen, über dies sich Nrf2 selbst zu regulieren scheint [Kwank et al., 2002]. Allerdings kann Nrf2 nicht nur über ARE in seiner Gentranskription induziert werden. Miao et al. (2005) nehmen an, dass Nrf2 über den AhR/XRE-Signalweg in seiner Genexpression induziert wird und in einem Folgeschritt als exprimiertes Protein an ARE bindet und so die Transkription von Phase-II-Enzymen einleitet. Nach dieser Theorie scheint es denkbar, dass der Konsum von Brazil Blend den AhR/XRE-Signalweg aktiviert und zur vermehrten Gentranskription von Nrf2 führt. Der weiterführende Schritt einer Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen über den Nrf2/ARE-Signalweg jedoch nicht aktiviert wird. In der Literatur wird beschrieben, dass einige Gene sowohl ein XRE als auch ein ARE enthalten [Kensler et al., 2007]. Somit stellt sich die Frage, ob bei Phase-II-Enzyme, die über den gleichen Regulationsweg wie Nrf2 aktiviert werden, eine Modulation der Gentranskription durch den Kaffee Brazil Blend Konsum erfasst werden könnte. Nicht auszuschließen ist, dass die im Rahmen dieser Dissertation getroffene Genauswahl nicht optimal war um eine antioxidative Wirkung im Sinne einer gesteigerten Transkriptmenge von Phase-II-Enzymen durch Konsum von Brazil Blend detektieren zu können.

Abschließend betrachtet führte der Konsum von Brazil Blend *in vivo* zu einer gesteigerten Gentranskription des Redoxsensors Nrf2 und könnte demnach das körpereigene Schutzsystem gegen oxidative Einflüsse aktivieren. Ein darüberhinaus vermehrter Anstieg an Gentranskripten für ausgewählte Phase-II-Enzyme unterlag einer sehr heterogenen Verteilung innerhalb des Probandenkollektives, so dass im Mittel aller Probanden keine Modulation beobachtet werden konnte. Als Ursache dieser Varianzen könnten genetische Polymorphismen im Probandenkollektiv postuliert werden, was in künftigen Humanstudien anhand einer Genotypisierung des Probandenkollektives zusätzlich erfasst werden sollte. Weiterhin scheint es denkbar, dass Nrf2 und die von ihm modulierbaren Gentranskripte der im Rahmen dieser Untersuchungen ausgewählten Phase-II-Enzymen, über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Das Bild der Wirkung des Kaffees Brazil Blend *in vivo* auf Gentranskripte von Phase-II-Enzymen scheint noch nicht eindeutig und könnte in weiterführenden Untersuchungen durch eine andere Genauswahl an Phase-II-Enzymen ergänzt werden.

4.3 Modulation ausgewählter Phase-II-Enzyme durch einzelne und miteinander kombinierte Kaffeeinhaltsstoffe

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten KEs konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Beeinflussung von Phase-II-Enzymen erkennen lassen. Um den zugrundeliegenden Wirkmechanismus besser charakterisieren zu können, scheint die Identifizierung bioaktiver Kaffeeinhaltsstoffe von essentieller Bedeutung. Der Fokus der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Untersuchungen lag bisher auf den zwei Leitverbindungen CGA und NMP, die als Einzelverbindungen über ein antioxidatives Potential zu verfügen schienen, indem sie potent die Gentranskription von Phase-II-Enzymen induzierten. Unklar war bisher, welche Rolle dem Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin, an der Modulation von Phase-II-Enzymen, zukommt. Fraglich war weiterhin, wie sich die einzelnen Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin in Kombination miteinander auf die Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme und die GST-Enzymaktivität in HT29-Zellen verhalten bzw. ob antagonistische oder synergistische Effekte zu Tage treten würden. Um eine Annäherung an die *in vivo* Situation zu erreichen, wurden die Koinkubationsuntersuchungen in hypothetisch erstellten Konzentrationen durchgeführt, die sich an der möglichen Aufnahme und Bioverfügbarkeit einzelner Inhaltsstoffe nach Kaffeekonsum orientierten.

4.3.1 Hemmung des Zellwachstums durch Trigonellin

Um die zellwachstumshemmende Wirkungen von Trigonellin zu erfassen, wurde das Zellwachstum von HT29-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h mittels SRB Assay untersucht. In Konzentrationen von 1 μM bis 250 μM konnten keine zellwachstumshemmenden Effekte beobachtet werden (Abbildung 39). Vielmehr war ein leichter Anstieg des Zellwachstums mit einem Maximum bei 10 μM ($110,1 \pm 6,7\%$) zu erkennen. Lediglich die höchste Konzentration von 500 μM zeigte einen marginalen Rückgang des Wachstums von HT29-Zellen auf $85,2 \pm 7,2\%$.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen die Datenlage aus der Literatur, in der keine zytotoxischen Wirkungen durch Trigonellin beschrieben werden. Die Untersuchungen des Projektpartners der AG Eisenbrand (TU Kaiserslautern) zeigten weiterhin keine Modulation der DNA-Strangbrüche und Gesamt-DNA Schäden nach 24 h Inkubation von humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2) mit Trigonellin in den Konzentrationen von 1 μM bis 100 μM

[Dissertation Bakuradze, 2010]. Der marginale Rückgang des Zellwachstums bei 500 μM Trigonellin, der eine beginnende zytotoxische Wirkung anzudeuten scheint, konnte in den folgenden Untersuchungen vernachlässigt werden, da die Konzentrationen, in denen Trigonellin im Kaffeegetränk vorhanden ist, sowie die in denen Trigonellin *in vitro* als Einzelsubstanz eingesetzt wurde, weit unterhalb von 500 μM lagen.

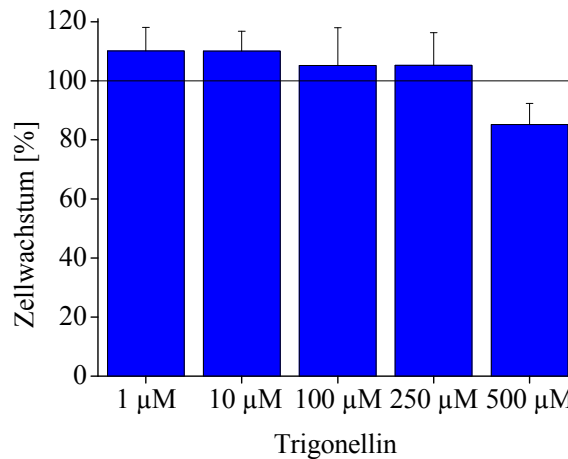


Abbildung 39: Hemmung des Zellwachstums in HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Trigonellin mittels SRB-Test. Serumhaltige Inkubation in 10 % FKS-haltigem Medium mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung.

Durch Trigonellin (1-250 μM) konnte im Rahmen dieser Untersuchungen ein leichter Wachstumsstimulus in HT29-Zellen verzeichnet werden. Eine wachstumsfördernde Wirkung von Trigonellin scheint im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Effekte durch Trigonellin stimmig. Trigonellin vermittelte *in vitro* ein neuritisches Auswachsen in humanen Neuroblastomzellen (SK-N-SH), sowie ein vermehrtes Wachstum von humanen Brustadenokarzinomzellen (MCF-7) [Allred et al., 2009; Tohda et al., 1999].

Zusammenfassend zeigt sich für Trigonellin eine marginale, zytotoxische Wirkung bei 500 μM aufgrund eines leichten Rückganges des Zellwachstums.

4.3.2 Modulation der Nrf2-Kerntranslokation durch Trigonellin

Um den zellulären Wirkmechanismen von Trigonellin beschreiben zu können, wurde der nukleäre Nrf2-Gehalt in den Konzentrationen von 100 fM bis 500 μM mittels Western Blot Analyse in HT29-Zellen untersucht [Diplomarbeit Sommerfeld, 2007]. Die Inkubationszeit betrug 3 h in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Wie in Abbildung 40 dargestellt, zeigte

sich in den höheren Konzentrationen von 1 μM bis 500 μM keine ausgeprägte Modulation des nukleären Nrf2-Gehaltes. Die Nrf2-Proteingehalte lagen im Bereich der DMSO Kontrolle, obgleich Schwankungen auftraten. Der zytosolische Nrf2-Gehalt ließ zwischen 1 μM bis 100 μM eine konzentrationsabhängige Zunahme beobachten, mit einem Maximum bei 100 μM ($124,5 \pm 0,3$). Auffallend war eine potente und zum Teil signifikante Abnahme des zytosolischen sowie des nukleären Nrf2-Gehaltes zwischen 10 pM bis 100 nM Trigonellin. Der nukleäre Nrf2-Gehalt ließ bei 10 pM ($55,8 \pm 5,2$) und 100 nM ($56,2 \pm 3,6$) zwei Minima erkennen. In den niedrigeren Konzentrationsbereichen, bei 1 pM und 100 fM, stieg der zytosolische und nukleäre Nrf2-Gehalt wieder auf die Höhe der DMSO Kontrolle an.

Die Inkubation mit Trigonellin zeigte im pM- und nM-Konzentrationsbereich einen potenten Rückgang an zytosolischem und nukleärem Nrf2 auf fast 50 % im Vergleich zur DMSO Kontrolle. Aufgrund der minimalen zellwachstumshemmenden Wirkung von Trigonellin (vgl. Abschnitt 4.3.1), die zudem erst in einer höheren Konzentration auftrat, ist ein zytotoxischer Einfluss für den potenten Rückgang des Gesamt-Nrf2-Gehaltes unwahrscheinlich. Wie in Abschnitt 2.4 ausführlich beschrieben, wird der Gehalt an Nrf2 durch drei Mechanismen bestimmt: die Translokation von Nrf2 in den Zellkern, dem proteasomalen Abbau von Nrf2 im Zytosol sowie dem *de novo* synthetisierten Nrf2, das im Zytosol gebildet wird und anschließend für eine Translokation in den Zellkern zur Verfügung steht. Postuliert werden könnte demnach, dass eine Hemmung der Translokation sowie der *de novo* Synthese von Nrf2 durch Trigonellin den Gehalt an zytosolischem und nukleärem Nrf2 minimiert. Eine weitere Erklärung für den Rückgang des Gesamt-Nrf2-Gehaltes nach Inkubation mit Trigonellin könnte in einer potenten ROS-abfangenden Wirkung von Trigonellin zu finden sein, die über einen „feedback“ Mechanismus einen allgemeinen Rückgang des ROS-sensitiven Nrf2/ARE-Signalweges vermitteln könnte. In der Literatur werden die ROS-abfangenden Wirkungen von Trigonellin kontrovers diskutiert. Studien von Ogata et al. (2002) untersuchten das Radikale abfangende Potential 23 Niacin verwandter Stoffe mittels Elektronen-Spin-Resonanz. Hierbei zeigte Trigonellin keine Radikalfänger-Eigenschaft. In Übereinstimmung damit zeigten Untersuchungen mit einem ROS-generierenden System in Leberhepatomzellen (AH109A) der Ratte, dass Trigonellin kein erhöhtes Potential besitzt, Radikale abzufangen [Hirakawa et al., 2005].

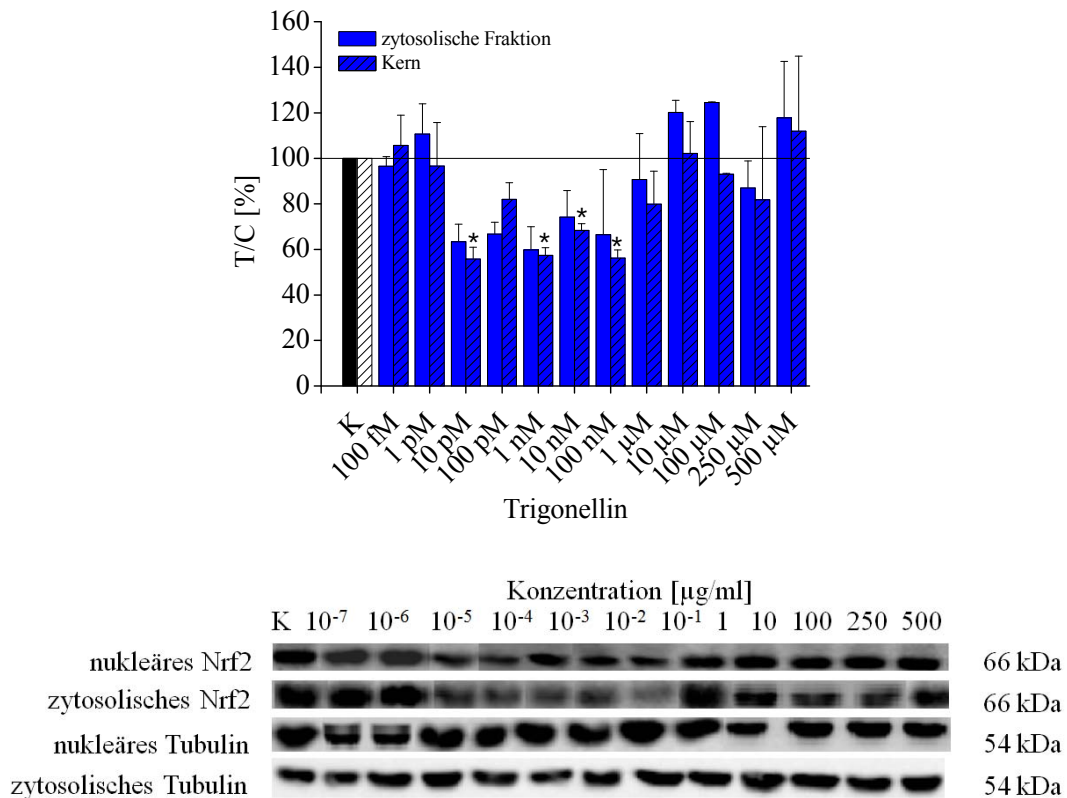


Abbildung 40: Nrf2-Kerntranslokation und repräsentatives Blotbild nach 3 h Inkubation mit Trigonellin in HT29-Zellen mittels Western Blot Analyse [Diplomarbeit Sommerfeld, 2007]. Serumfreie Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). Beladungskontrolle: Tubulin. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle),* = $p < 0,05$. K=Kontrolle.

Im Gegensatz dazu zeigten Studien, dass Trigonellin nach 24 h bei 30 μ M und 100 μ M den TBH induzierte ROS-Spiegel in HT29-Zellen minimiert [Dissertation Bakuradze, 2010]. Wenngleich kein eindeutiges Bild über die ROS-abfangenden Eigenschaften von Trigonellin aus der Literatur hervor geht, so scheint jedoch eine starke antioxidative Wirkung von Trigonellin in niedrigeren Konzentrationsbereichen eher unwahrscheinlich. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus der potenten Verminderung von Nrf2 durch Trigonellin gilt es in weiterführenden Untersuchungen zu klären. Fraglich bleibt, ob die beobachteten Effekte in Konzentrationen auftreten, in denen sie von Relevanz für den Konsumenten sein könnten. In einer Untersuchung konsumierten sechs weibliche und sieben männliche Probanden 350 ml eines Kaffeegetränkes nachdem sie sich 10 Tage koffeinfrei ernährt hatten. Der Plasmagehalt an Trigonellin stieg von 160 nmol/l bis auf eine Maximalkonzentration von 5479 (männliche Probanden) bzw. auf 6547 nmol/l (weibliche Probanden) 6 h nach

Kaffee konsum [Lang et al., 2010]. Demnach scheint gerade in den ersten Stunden nach dem Kaffeekonsum eine nM Konzentration an Trigonellin im Plasma erreichbar zu sein.

Abschließend betrachtet ließ sich für Trigonellin im nM und pM-Konzentrationsbereich eine potente Abnahme des Gesamt-Nrf2-Gehaltes feststellen, der sich durchaus auch nach Kaffeekonsum im Plasma in der *in vivo* Situation einstellen könnte.

4.3.3 *Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch Trigonellin*

Die Untersuchung der Nrf2-Kerntranslokation zeigte nach Inkubation mit Trigonellin eine potente Abnahme an zytosolischen und nukleären Nrf2-Protein (Abbildung 40). Es stellt sich die Frage, ob sich ein Rückgang der Nrf2-Kerntranslokation auch auf Transkriptionsebene für Phase-II-Enzyme und dem Transkriptionsfaktor Nrf2 widerspiegelt und somit direkt die enzymatische Abwehr im Körper beeinflussen könnte. Folglich wurden HT29-Zellen für 3 h und 24 h mit Trigonellin im Konzentrationsbereich von 100 pM bis 10 µM inkubiert und die Gentranskripte der Phase-II-Enzyme NQO1 und HO1 sowie von Nrf2 mittels quantitativer Real Time PCR untersucht.

Nach 3 h Inkubation von HT29-Zellen mit Trigonellin wurden die Transkripte der HO1 und von Nrf2 nicht moduliert, sondern lagen im Bereich der DMSO Kontrolle (Abbildung 41, A). Die NQO1-Transkriptmenge sank hingegen bei 10 µM ($0,7 \pm 0,2$) marginal und bei 1 nM ($0,5 \pm 0,2$) Trigonellin signifikant ab. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Trigonellin konnten im Bereich von 100 pM bis 100 nM signifikante Abnahmen der HO1 und NQO1 Gentranskripte festgestellt werden (Abbildung 41, B). Der potenteste Rückgang war für die Konzentration von 100 nM festzustellen, die Gentranskripte der NQO1 und HO1 lagen bei $0,4 \pm 0,1$. Für die Transkription von Nrf2 ließ sich nach 24 h ein leichter Anstieg beobachten.

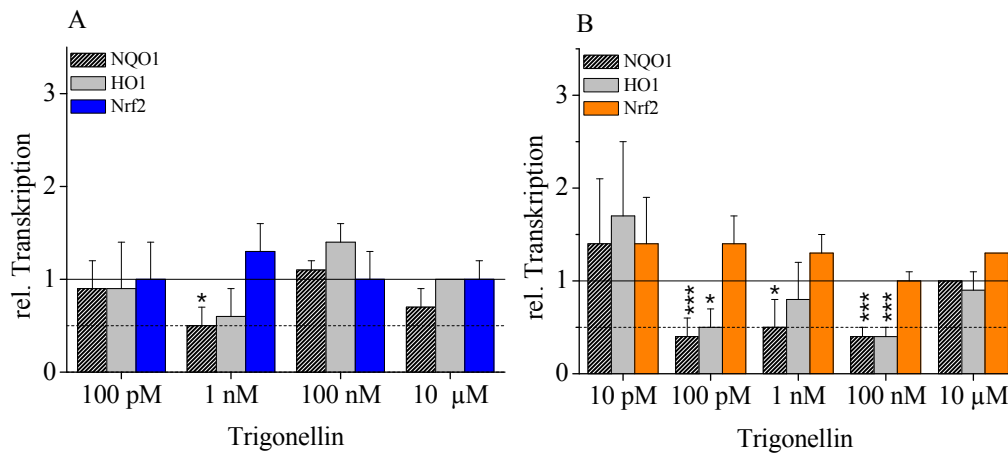


Abbildung 41: Beeinflussung der Gentranskripte der HO1, NQO1 und Nrf2 nach 3 h (A) und 24 h (B) Inkubation mit Trigonellin in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumfreie (3 h) sowie serumhaltige (24 h) Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$. HO1: Hämoxxygenase 1; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxido-reduktase 1.

Die Ergebnisse auf Transkriptionsebene zeigen, dass sich ein Rückgang des Gesamt-Nrf2-Proteingehalts in einem verminderten Transkriptgehalt von Phase-II-Enzymen in ausgewählten Konzentrationen nach 24 h widerspiegelt. Dadurch deutet sich möglicherweise an, dass die Gentranskription der HO1 und NQO1 direkt über den Nrf2/ARE-Signalweg moduliert werden und bei einem Mangel des Transkriptionsfaktors Nrf2 das körpereigene Schutzsystem durch eine verringerte Transkription an antioxidativen Phase-II-Enzymen beeinflusst werden könnte. Hierzu passend zeigte eine *in vivo* Fütterungsstudie mit 6 % Kaffee, dass *nrf2*^(-/-) Mäuse ein signifikant verminderter UGT1A1 und γ -GCL mRNA-Spiegel im Vergleich zu Tieren mit *nrf2*^(+/+) im Dünndarm beobachten ließen [Tao et al., 2008]. Weiterhin war in den vorliegenden Untersuchungen die Transkription von Nrf2 nicht vermindert, sondern bedingte sogar einen leichten Anstieg nach 24 h. Möglicherweise wirkt Trigonellin auf den Transkriptionsfaktor Nrf2, im Vergleich zu den Gentranskripten von Phase-II-Enzymen, über einen anderen Regulationsmechanismus. Wie in Abschnitt 4.3.2 diskutiert, sind die Konzentrationen von 100 pM bis 100 nM Trigonellin durchaus in Bereichen, wie sie durch Kaffeekonsum im Blutplasma erreicht werden können, und somit scheint der Effekt, eine verminderte Transkription von Phase-II-Enzymen, durch Trigonellin unter *in vivo* Bedingungen denkbar.

4.3.4 *Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch Koinkubation verschiedener Kaffeeinhaltsstoffe*

In Abschnitt 4.3.3 konnte in HT29-Zellen gezeigt werden, dass Trigonellin einen kritischen Kaffeeinhaltsstoff darzustellen scheint, da er in ausgewählten Konzentrationen die Transkription von Phase-II-Enzymen nach 24 h senkte und damit möglicherweise zu einer verminderten enzymatischen Abwehr beitragen könnte. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Gentranskripte von Phase-II-Enzymen durch die Kaffeeinhaltsstoffe CGA und NMP ausgelöst werden kann [Böttler et al., 2010]. Es stellte sich die Frage, ob die minimierende Wirkung von Trigonellin auch in Kombination mit CGA und NMP zu Tage treten könnte und somit eine gesundheitsförderliche Steigerung von Phase-II-Enzymen von CGA bzw. NMP durch Trigonellin verringert würde.

In einer ersten Versuchsreihe wurde Trigonellin in den Konzentrationen von 10 pM bis 100 nM mit NMP (10 µM) für 24 h koinkubiert und mittels Real Time PCR untersucht. In Abbildung 42 ist die Modulation der Gentranskripte der NQO1, HO1 und Nrf2 nach Inkubation mit Trigonellin, NMP (10 µM), sowie der Koinkubation beider Substanzen dargestellt. Die Inkubation mit NMP ließ einen Anstieg der NQO1 Gentranskription sowie die Inkubation mit Trigonellin in ausgewählten Konzentrationen eine potente Abnahme der Transkriptmenge der NQO1 erkennen (Abbildung 42, A). Für die Koinkubation in den Konzentrationen von 100 pM ($0,5 \pm 0,1$) und 1 nM ($0,7 \pm 0,2$) Trigonellin zeigte der Zusatz von 10 µM NMP keinen Anstieg der NQO1 Gentranskripte. Lediglich bei 100 nM Trigonellin stieg durch gleichzeitige Inkubation mit NMP der Transkriptgehalt auf den Gehalt der DMSO Kontrolle an. Eine Induktion der NQO1-Gentranskripte, wie durch NMP als Reinsubstanz, konnte allerdings durch den Zusatz von Trigonellin nicht mehr vermittelt werden. Für die Transkripte der HO1 zeigte sich in den Konzentrationen von 100 pM und 100 nM Trigonellin durch den Zusatz von 10 µM NMP im Vergleich zu Trigonellin als Einzelsubstanz ein signifikanter Anstieg der Gentranskripte (Abbildung 42, B), allerdings nur auf den Gehalt der DMSO Kontrolle.

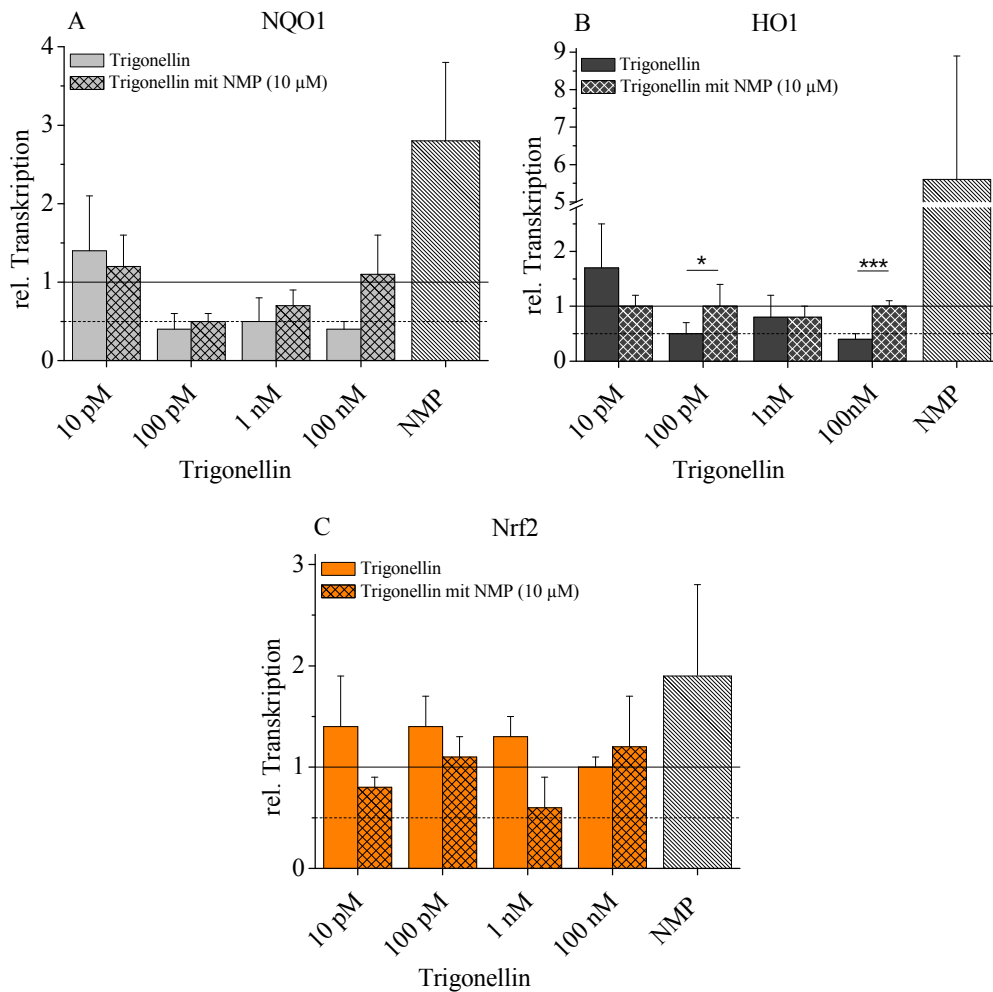


Abbildung 42:

Beeinflussung der Gentranskripte der NQO1(A), HO1(B) und Nrf2(C) nach 24 h Inkubation mit Trigonellin, NMP (10 µM) sowie Trigonellin und NMP(10 µM) koinkubiert in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β-Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle),* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. HO1: Hämoxygenase 1; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“;NQO1: NADPH-Chinonoxido-reduktase 1.

Eine Induktion der HO1-Gentranskription, wie sie durch 10 µM NMP als Einzelsubstanz erreicht wurde, konnte durch die Koinkubation von Trigonellin mit NMP nicht beobachtet werden. Die Gentranskripte von Nrf2 lagen für 100 pM sowie 100 nM Trigonellin als Einzelsubstanz, sowie durch die Koinkubation mit 10 µM NMP auf den Gehalt der DMSO Kontrolle und zeigten keine Modulation (Abbildung 42, C). Weiterhin führte die Koinkubation von 10 pM ($0,8 \pm 0,1$) und noch ausgeprägter für 1 nM ($0,6 \pm 0,3$) Trigonellin mit NMP zu einer Abnahme der Nrf2 Gentranskriptmenge. Durch die Inkubation der

Einzelsubstanzen Trigonellin und NMP war stets ein Gehalt an Nrf2-Transkripten ≥ 1 festzustellen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Fragestellung nachgegangen, wie sich die Koinkubation von zwei Substanzen auswirkt, welche per se als Einzelsubstanz in den eingesetzten Konzentrationen keine erhöhte Induktion der Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme bewirkten. Exemplarisch wurden hierbei 100 nM Trigonellin mit 100 μ M CGA sowie die zwei Leitverbindungen, 100 μ M NMP mit 100 μ M CGA, für 24 h koinkubiert und mittels Real Time PCR die Transkripte der NOQ1, HO1, Nrf2 und GSTT1 untersucht.

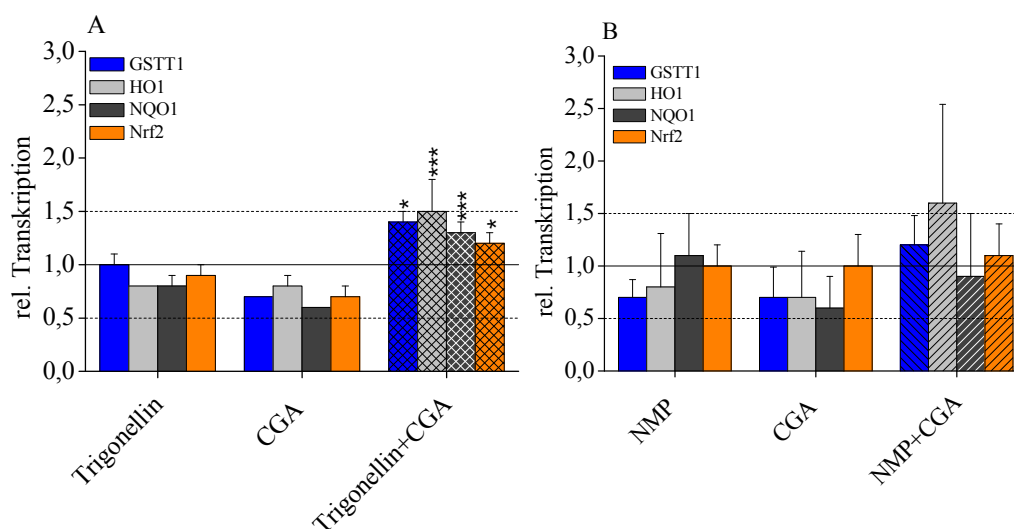


Abbildung 43:

Beeinflussung der Gentranskripte der NQO1, HO1, Nrf2 und GSTT1 nach 24 h Inkubation mit (A) Trigonellin [100 nM], CGA [100 μ M] sowie beide Substanzen koinkubiert, (B) NMP [100 μ M], CGA [100 μ M] sowie beide Substanzen koinkubiert in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. HO1: Hämoxygenase 1; GST: Glutathione-S-Transferase (GST) T; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxidoreduktase 1.

Wie in Abbildung 43, A dargestellt, lässt sich sowohl durch Inkubation mit 100 nM Trigonellin als auch durch 100 μ M CGA als Einzelsubstanz eine marginale Abnahme der Gentranskriptmenge der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 feststellen. Die Koinkubation von 100 nM Trigonellin mit 100 μ M CGA führte im Gegensatz dazu zu einem signifikanten Anstieg der untersuchten Gentranskripte. Die maximalste Zunahme zeigte die HO1 mit einem Transkriptgehalt von $1,5 \pm 0,3$. Eine 24 h Inkubation der Einzelsubstanzen NMP (100 μ M) und CGA (100 μ M) ließ für die Gentranskripte der ausgewählten Phase-II-Enzyme eine

marginale Modulation erkennen (Abbildung 43, B). Die Gentranskription der HO1, GSTT1 und NQO1 nahm ab, jedoch nicht unter den Gehalt von 0,5. Im Vergleich zu den Gentranskriptgehalten der Einzelsubstanzen, zeigte die Koinkubation der äquimolaren Mischung aus 100 μ M NMP und 100 μ M CGA für HO1 ($1,6 \pm 0,9$) eine nicht signifikante Zunahme. Bei der Koinkubation war für NQO1 und GSTT1 keine vermehrte Gentranskription zu beobachten. Die Transkription von Nrf2 zeigte für die Inkubation mit NMP sowie, CGA als auch bei beiden Substanzen koinkubiert eine Transkriptmenge im Bereich der DMSO Kontrolle.

Die Ergebnisse dieses ersten Koinkubationsansatzes deuten an, dass die durch NMP-induzierte Steigerung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 im Kaffee durch die Anwesenheit von Trigonellin in einzelnen Konzentrationen minimiert werden kann. Nicht auszuschließen ist demnach, dass die Kombination NMP und Trigonellin im Kaffee die Induktion der Transkription verschiedener Phase-II-Enzyme minimieren kann. Fraglich ist ebenso, ob NMP und Trigonellin eine Wirkstoffkombination im Kaffee darstellt, welche die Aktivierung von Phase-II-Enzymen über eine gesteigerte *de novo* Synthese von Nrf2, herabsetzt. Weitere Untersuchungen mit Trigonellin zeigten allerdings, dass dessen Fähigkeit die Gentranskripte von Phase-II-Enzymen und Nrf2 zu modulieren von der koinkubierten Substanz abzuhängen scheint und die Inkubation mit Trigonellin nicht generell mit Abnahme an Gentranskripten von Phase-II-Enzymen und Nrf2 einhergeht. Trigonellin (100 nM) und CGA (100 μ M) zeigten per se als Einzelsubstanzen keinen Anstieg der Gentranskripte der Phase-II-Enzyme NQO1, HO1, GSTT1 und Nrf2 (Abbildung 43, A). Im Gegensatz dazu führte die Koinkubation von Trigonellin und CGA zu einer signifikanten Zunahme der NQO1, HO1, GSTT1 und Nrf2 Gentranskription. Ein derartiger Synergismus zeigte ebenso die Koinkubation von NMP und CGA in äquimolaren Konzentrationen von 100 μ M für die Transkriptmenge der GSTT1 und HO1.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen folglich nicht eindeutig erkennen, inwiefern Trigonellin in Kombination mit weiteren Kaffeeinhaltsstoffen eine mögliche gesundheitsfördernde Wirkung von Kaffee, im Sinne einer Steigerung der enzymatischen Abwehr, beeinflussen kann. Weiterhin ließen die dargestellten Ergebnisse erkennen, dass die Beeinflussung der Gentranskripte von Phase-II-Enzymen und Nrf2 in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration auftrat, weshalb zunächst überprüft werden sollte, welche Effekte durch die

Kombination von Trigonellin, CGA und NMP in konsumrelevanten Konzentrationsbereichen auftreten.

4.3.5 *Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch Kaffeeinhaltsstoffe in konsumrelevanten Konzentrationen*

Die Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin zeigten in vorangegangenen Untersuchungen eine Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 in Abhängigkeit der jeweils eingesetzten Konzentration (vgl. Abschnitt 4.3.4). Um sich der *in vivo* Situation anzunähern wurden die Kaffeeinhaltsstoffe in Konzentrationen eingesetzt, wie sie nach Kaffeekonsum von 1 Liter zuerst an den Darmepithelzellen und im Anschluss im Blutplasma zu erwarten sind (Abbildung 44). Die einzusetzen Konzentrationen an CGA, NMP und Trigonellin wurden anhand der verfügbaren Literatur extrapoliert.

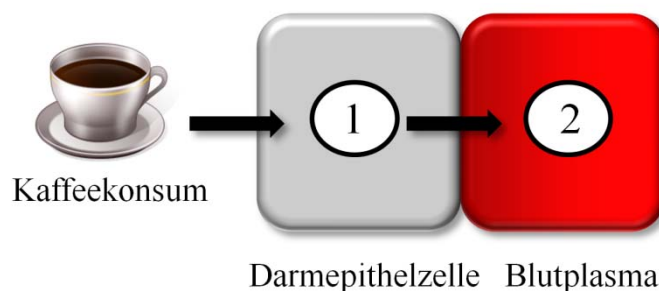


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Lokalisation von Kaffeeinhaltsstoffen nach Kaffeekonsum. (1) Konzentration an den Darmepithelzellen, (2) Konzentration im Blutplasma.

Für die Konzentrationen der Kaffeeinhaltsstoffe an den Darmepithelzellen (Abbildung 44, (1)) (Orientierung an theoretischen Mittelwerten) wird bei einer durchschnittlichen Flüssigkeitsmenge im Lumen des Gastrointestinaltraktes von 1,7 Litern und einer durchschnittlich zugeführten Menge an Nahrung pro Mahlzeit (Energiegehalt 667 kcal) von 139 g erwartet, dass 8 % der Inhaltsstoffe aus der Nahrung die Darmepithelzellen erreichen könnten [Glei und Stein, persönliche Mitteilung]. In Tabelle 14 sind die berechneten Konzentrationen von CGA, NMP und Trigonellin dargestellt, ausgehend von den ursprünglichen Gehalten in CGA-Kaffee sowie NMP-Kaffee nach Verlust von 92 % im Zuge der Verdauung.

Tabelle 14: Abgeschätzte Konzentration der Kaffeeinhaltsstoffe Trigonellin, CGA und NMP nach Konsum von 1 Liter (A) CGA-Kaffee und (B) NMP-Kaffee an den Darmepithelzellen; - = nicht berechnet.

	CGA	NMP	Trigonellin
A.) CGA-Kaffee	188 μ M	-	280 μ M
B.) NMP-Kaffee	18,7 μ M	62,7 μ M	-

Anhand dieser Abschätzung wurden Trigonellin und CGA sowie NMP und CGA für 24 h koinkubiert und die Transkripte der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 mittels quantitativer Real Time PCR untersucht. In Abbildung 45, A ist die Modulation der Gentranskription dargestellt, wie sie durch Trigonellin und CGA in den postulierten Konzentrationen an den Darmepithelzellen nach Konsum von CGA-Kaffee zu erwarten sein könnten. Die Transkripte der GSTT1, NQO1 und Nrf2 zeigten einen signifikanten Anstieg, mit einem Maximum für Nrf2 bei $1,9 \pm 0,2$. Weiterhin wurden NMP und CGA koinkubiert, ausgehend von der Situation wie sie sich in den Darmepithelzellen nach Konsum von NMP-Kaffee darstellen könnte (Abbildung 45, B).

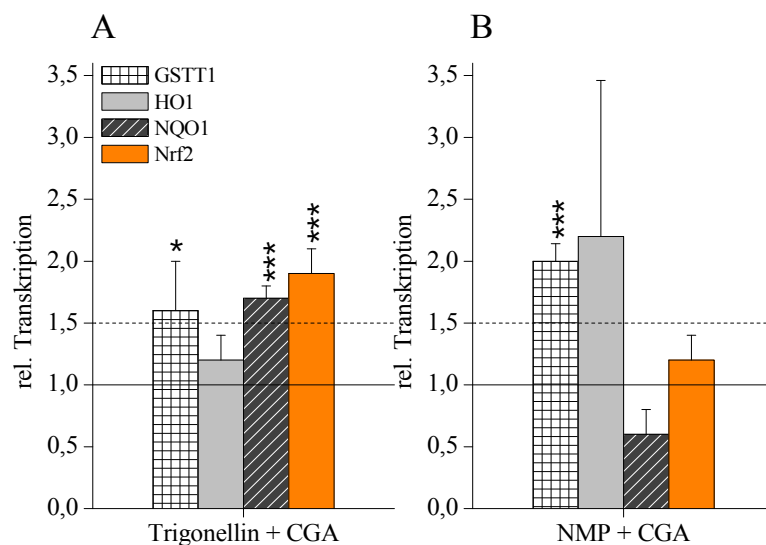


Abbildung 45: Modulation der Gentranskription der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 nach 24 h Koinkubation mit (A) Trigonellin [280 μ M] und CGA [188 μ M] (B) NMP [62,8 μ M] und CGA [18,7 μ M] in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle); * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$; HO1: Hämoxygenase 1; GST: Glutathione-S-Transferase (GST) T; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxido-reduktase 1.

Eine signifikante Zunahme an Gentranskripten ließ sich für die GSTT1 ($2 \pm 0,1$) beobachten. Die Gehalte der HO1 ($2,2 \pm 1,3$) stiegen ebenso an, allerdings mit großen Schwankungen. Die Transkriptgehalte der NQO1 ($0,6 \pm 0,2$) wurden hingegen vermindert.

Nachdem die Kaffeeinhaltsstoffe die Darmepithelzellen passieren, treten sie ins Blutplasma über (Abbildung 44, (2)). Die Konzentrationen im Plasma an CGA 4 h nach Kaffeekonsum wurden von Monteiro et al. (2007) mit einem Gehalt von $3,14 \pm 1,64 \mu\text{Mol/l}$ beschrieben, wobei im Kaffeegetränk ursprünglich $5621 \mu\text{Mol/l}$ CGA enthalten waren. Anhand dieser Angaben wurde ein Verdünnungsfaktor berechnet, um einen hypothetischen Gehalt an CGA im Blutplasma nach Konsum von CGA-Kaffee, NMP-Kaffee und Kaffee Brazil Blend abzuschätzen. Analog wurde dies für NMP und Trigonellin durchgeführt, wobei hierbei projektinterne Angaben der Plasmakonzentrationen von NMP und Trigonellin nach Kaffeekonsum herangezogen wurden [Lang, persönliche Mitteilungen]. Tabelle 15 stellt die abgeschätzten Gehalte an CGA, NMP und Trigonellin dar, wie sie hypothetisch nach Konsum von CGA-Kaffee (A), NMP-Kaffee (B) oder Kaffee Brazil Blend (C) im Blutplasma vorliegen könnten.

Tabelle 15: Abgeschätzte Konzentration der Kaffeeinhaltsstoffe Trigonellin, CGA und NMP nach Konsum von 1 Liter (A) CGA-Kaffee, (B) NMP-Kaffee und (C) Kaffee Brazil Blend im Blutplasma.

	CGA	NMP	Trigonellin
A.) CGA-Kaffee	1,2 μM	0,08 μM	9,3 μM
B.) NMP-Kaffee	0,1 μM	1 μM	2 μM
C.) Kaffee Brazil Blend	0,5 μM	1 μM	5,6 μM

HT29-Zellen wurden für 24 h mit CGA, NMP und Trigonellin als Einzelverbindung sowie miteinander kombiniert, in den entsprechenden Konzentrationen anhand Tabelle 15, inkubiert und die Gentranskripte der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 mithilfe quantitativer Real Time PCR bestimmt. In einem ersten Versuchsansatz wurde Trigonellin, CGA sowie beide Substanze koinkubiert untersucht. Abbildung 46, A zeigt die Modulation der Gentranskripte, wie sie nach Konsum von CGA-Kaffee im Blutplasma durch Trigonellin und CGA auftreten könnten. Trigonellin (9,3 μM) und CGA (1,2 μM) ließen hierbei als Einzelsubstanzen keine

Beeinflussung der Gentranskripte erkennen. Die Koinkubation von Trigonellin mit CGA zeigte jedoch einen potenten und signifikanten Anstieg der Transkription der GSTT1 ($2,2 \pm 0,5$), HO1 ($1,9 \pm 0,2$), NQO1 ($1,8 \pm 0,2$) und Nrf2 ($1,5 \pm 0,2$).

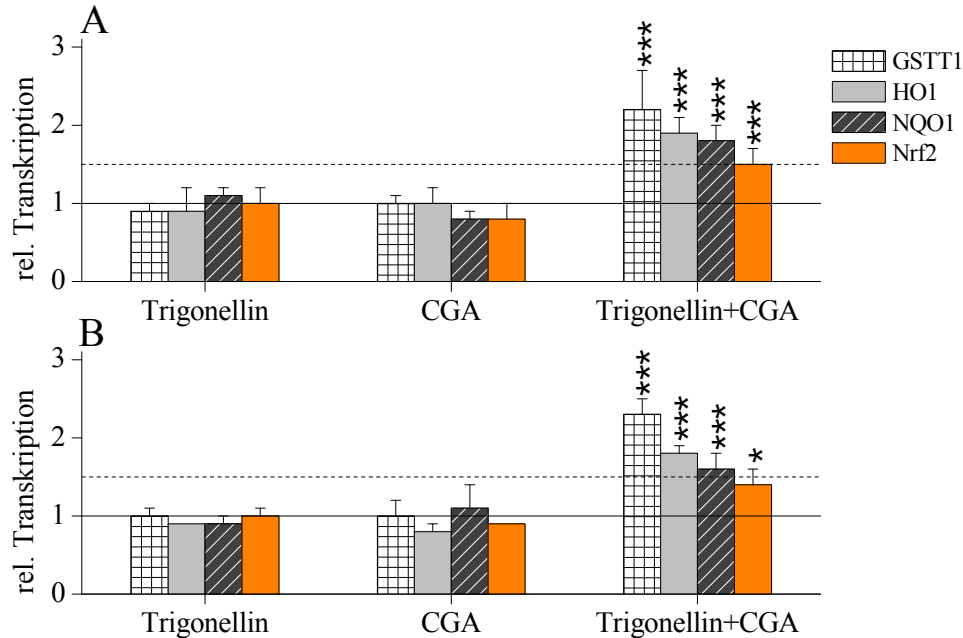


Abbildung 46: Modulation der Gentranskription der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 nach 24 h Inkubation mit (A) Trigonellin [9,3 µM] und CGA [1,2 µM] (B) Trigonellin [2 µM] und CGA [0,1 µM] in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription=1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$. HO1: Hämoxygenase 1; GST: Glutathione-S-Transferase (GST) T; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxido-reduktase 1.

Die extrapolierten Konzentrationen an Trigonellin (2 µM) und CGA (0,1 µM) nach Konsum von NMP-Kaffee lässt ein analoges Bild erkennen (Abbildung 46, B). Während die Einzelsubstanzen Trigonellin und CGA keine erhöhten Transkriptgehalte anzeigten, führte deren Koinkubation zu einer signifikanten Zunahme der GSTT1 ($2,3 \pm 0,2$), HO1 ($1,8 \pm 0,1$), NQO1 ($1,6 \pm 0,2$) und Nrf2 ($1,4 \pm 0,2$) Transkription.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Wirkung von NMP und CGA in hypothetischen Plasmakonzentrationen untersucht [Böttler, unveröffentlichte Daten]. In Abbildung 47, A wurde NMP (0,08 µM) und CGA (1,2 µM) in Konzentrationen eingesetzt, wie sie nach Konsum von CGA-Kaffee im Blutplasma erreicht werden könnten. NMP zeigte als Einzelsubstanz nur für die HO1 ($1,8 \pm 0,9$) einen signifikanten Anstieg der Transkription,

allerdings mit Schwankungen. CGA, allein inkubiert, ließ für NQO1 ($0,5 \pm 0,2$) eine signifikante Abnahme feststellen. Die Koinkubation von NMP und CGA führte für die NQO1 und Nrf2 im Vergleich zur Inkubation mit den Einzelsubstanzen nur zu einem marginalen Anstieg der Transkriptgehalte, der im Bereich der DMSO-Kontrolle lag.

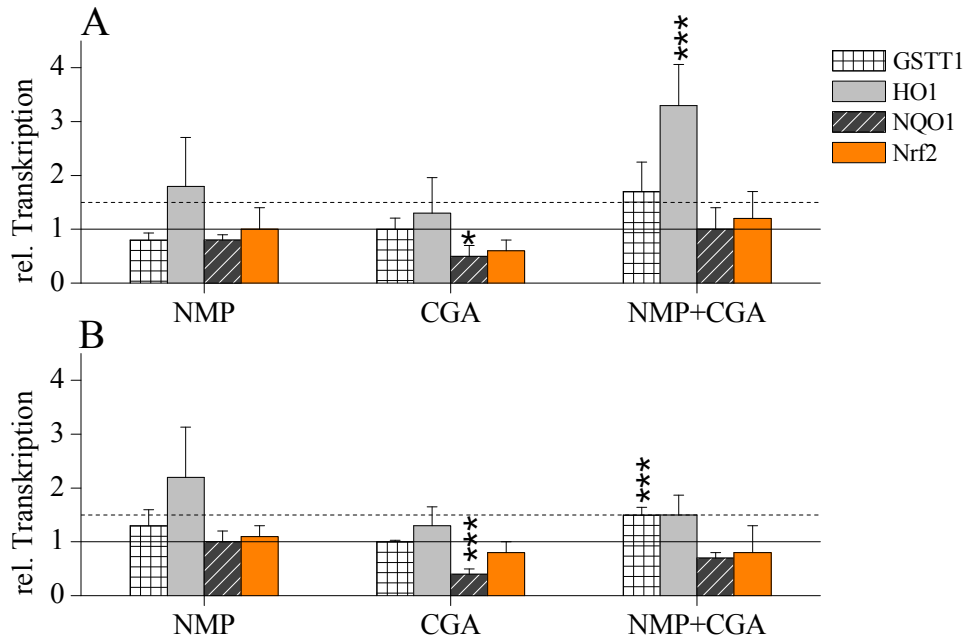


Abbildung 47: Modulation der Gentranskription der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 nach 24 h Inkubation mit (A) NMP [0,08 µM] und CGA [1,2 µM] (B) NMP [1 µM] und CGA [0,1 µM] in HT29-Zellen mittels Real Time PCR [Böttler, unveröffentlichte Daten]. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β-Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$. HO1: Hämoxygenase 1; GST: Glutathione-S-Transferase (GST) T; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxido-reduktase 1.

Eine potente Zunahme der Transkription durch die Koinkubation von NMP und CGA konnte hingegen für die GSTT1 ($1,7 \pm 0,5$) und signifikant für die HO1 ($3,3 \pm 0,8$) beobachtet werden. Abbildung 47, B zeigt die Gehalte der Gentranskripte nach Inkubation mit NMP (1 µM) und CGA (5,5 µM) in Konzentrationen, wie sie möglicherweise durch den Konsum von NMP-Kaffee im Blutplasma auftreten könnten. Die postulierte Plasmakonzentration an NMP bedingte allein für die HO1 eine Zunahme, die Gentranskription stieg auf $2,2 \pm 0,9$. Für die NQO1 konnte hingegen nach Inkubation mit CGA eine signifikante Abnahme der Transkriptmenge auf $0,4 \pm 0,1$ beobachtet werden. Die Koinkubation von NMP und CGA ließ einen Anstieg der Transkription der GSTT1 ($1,5 \pm 0,1$) und HO1 ($1,5 \pm 0,4$) beobachten.

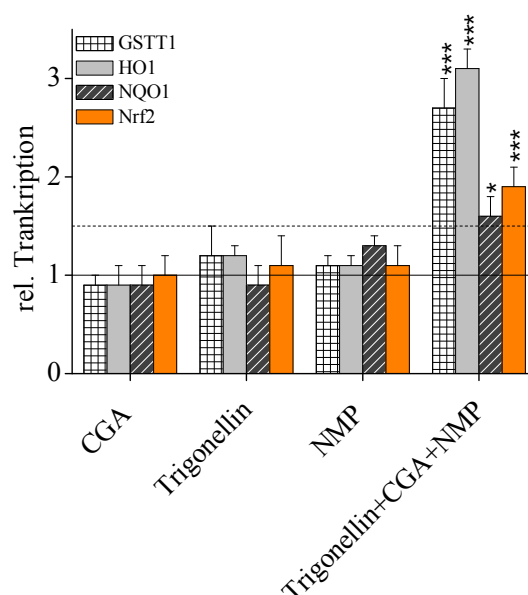


Abbildung 48: Modulation der Gentranskription der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 nach 24 h Inkubation mit CGA [0,5 μ M], NMP [1 μ M] und Trigonellin [5,5 μ M] in HT29-Zellen mittels Real Time PCR. Serumhaltige Inkubation mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dient 1 % DMSO im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$. HO1: Hämoxygenase 1; GST: Glutathione-S-Transferase (GST) T; Nrf2: „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“; NQO1: NADPH-Chinonoxidoreduktase 1.

Als abschließende Untersuchung dieses Versuchsansatzes wurden CGA (0,5 μ M), Trigonellin (5,5 μ M) und NMP (1 μ M) in Konzentrationen inkubiert, wie sie nach Konsum von Kaffee Brazil Blend im Blutplasma vorliegen könnten (Abbildung 48). Alle drei Kaffeeinhaltsstoffe modulierten hierbei die Gentranskripte der ausgewählten Phase-II-Enzyme als Einzelsubstanzen nicht. Im Gegensatz dazu zeigte die Koinkubation von CGA, NMP und Trigonellin eine potente und signifikante Zunahme der Gentranskriptgehalte der GSTT1 ($2,7 \pm 0,3$), HO1 ($3,1 \pm 0,2$), NQO1 ($1,6 \pm 0,2$) und Nrf2 ($1,9 \pm 0,2$).

Nach Kaffeekonsum treten die Darmepithelzellen im Zuge der Nährstoffresorption in unmittelbaren Kontakt mit den Kaffeeinhaltsstoffen, wobei lokal erhöhte Konzentrationen am Darmepithel erreicht werden können. Anhand eines hypothetischen Modells wurde als erste Annäherung abgeschätzt, dass der Konsum von CGA-Kaffee zu 280 μ M Trigonellin und 188 μ M CGA an den Darmepithelzellen führen könnte. In der Literatur konnten keine Daten gefunden werden, die *in vitro* in HT29-Zellen eine Beeinflussung der Gentranskriptgehalte von Phase-II-Enzymen und Nrf2 durch die Einzelsubstanzen CGA und Trigonellin in derart

hohen Konzentrationen beschreiben. Fraglich war, ob eine Induktion der Gentranskripte von Phase-II-Enzymen und Nrf2 an den Darmepithelzellen in diesen Konzentrationsbereichen sichtbar würden und ob sich dies durch entsprechende Untersuchungen in *in vitro* Testsystemen schon andeuten würde. Um synergistische, antagonistische oder additive Effekte abzuschätzen, wurden CGA und Trigonellin miteinander kombiniert inkubiert. So zeigte sich durch die Koinkubation von CGA mit Trigonellin ein potenter Anstieg der Gentranskripte der GSTT1, NQO1 und Nrf2. Möglicherweise deutet sich damit an, dass der Konsum von CGA-Kaffee aufgrund der Kaffeeinhaltsstoffe CGA und Trigonellin lokal an den Darmepithelzellen eine Steigerung detoxifizierender und antioxidativ-wirksamer Phase-II-Enzyme erzielen könnte. Weiterhin könnte der Anstieg der Nrf2-Transkription darauf hinweisen, dass die *de novo* Synthese von Nrf2 eingeleitet wird, infolgedessen der Nrf2/ARE-Signalweg aktiviert werden kann. CGA wurde bereits im Rahmen des Projektes als Einzelsubstanz nach einer Inkubationszeit von 24 h in HT29-Zellen mittels Real Time PCR untersucht, wobei in der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 μ M nur die Gentranskripte der GSTT1 einen Anstieg zeigten [Dissertation Böttler, 2009]. Möglicherweise führte die Koinkubation von Trigonellin und CGA zu einem induzierenden Effekt im Vergleich zur Wirkung von CGA als Einzelsubstanz, was sich in der signifikanten Induktion der NQO1 und Nrf2-Transkription durch die Koinkubation anzeigen könnte.

Der Konsum von NMP-Kaffee könnte nach einer hypothetischen Abschätzung eine lokale Konzentration von 62,7 μ M NMP und 18,7 μ M CGA an den Darmepithelzellen bewirken. Die Koinkubation dieser Kaffeeinhaltsstoffe ließ eine potente Zunahme von GSTT1 und der HO1 beobachten, allerdings auch einen Rückgang der NQO1 Transkriptgehalte. Der Konsum von NMP-Kaffee scheint somit ein mögliches antioxidatives Potential durch Erhöhung wichtiger Phase-II-Enzyme direkt an den Darmzelle durch das Zusammenspiel der Leitverbindungen NMP und CGA erzielen zu können. Vorangegangene Untersuchungen im Projekt zeigten für NMP als Einzelsubstanz einen signifikanten Anstieg der HO1, NQO1, Nrf2 und GSTT1 Transkriptgehalte bei 10 μ M. 100 μ M NMP konnten hingegen nur für die GSTT1 eine Induktion der Gentranskription bewirken. Die Inkubation mit ausschließlich CGA ließ eine signifikant vermehrte Transkriptmenge der GSTT1 im Bereich zwischen 0,1-100 μ M feststellen [Dissertation Böttler, 2009]. Die Kombination der bioaktiven Kaffeeinhaltsstoffe NMP und CGA bestätigt, in den hier dargestellten Untersuchungen, zwar die Induktion der Gentranskripte der GSTT1, allerdings in geringerer Potenz. Weiterhin

scheint sich auf die Transkription der NQO1 eine antagonistische Wirkung durch die Koinkubation von NMP und CGA im Vergleich zur Wirkung der Einzelsubstanzen zu manifestieren. Möglicherweise zeigt sich demnach die vielversprechende Induktion wichtiger Phase-II-Enzyme, welche für die isolierten Kaffeeinhaltsstoffe CGA und NMP postuliert wurden, im Substanzgemisch des Kaffeegetränkes an den Darmepithelzellen für einzelne Gene von Phase-II-Enzymen in verminderter Form.

Zusammenfassend scheinen die Koinkubationsversuche anzudeuten, dass der Konsum des CGA-Kaffees und des NMP-Kaffees direkt an den Darmepithelzellen einen Beitrag zur Aktivierung der enzymatischen Abwehr leisten könnte unter Einwirkung des Zusammenspiels von CGA und Trigonellin sowie der zwei Leitverbindungen NMP und CGA. Allerdings verdeutlichten die Untersuchungen die Komplexität der Wirkung kombinierter Kaffeeinhaltsstoffe, da die Leitverbindungen NMP und CGA teilweise eine Verminderung der Transkription einzelner Phase-II-Enzyme vermittelten.

Nach Resorption der Kaffeeinhaltsstoffe in die Darmepithelzellen führen Metabolisierungs- und Verdünnungsprozesse dazu, dass die Kaffeeinhaltsstoffe im Blutplasma in weitaus geringeren Konzentrationen vorliegen, als jene, die originär im Kaffeegetränk oder an den Darmepithelzellen auftreten. Um eine systemische Wirkung durch den Konsum von Kaffee postulieren zu können wurden CGA, NMP und Trigonellin in Konzentrationen eingesetzt, wie sie hypothetisch im Blutplasma vorliegen könnten. Eine aktuelle Studie unterstützt die im Rahmen dieser Dissertation eingesetzten Gehalte für NMP und Trigonellin (0,08-9,3 μM) und unterstreicht die mögliche Relevanz der Ergebnisse für die *in vivo* Situation. So konnten 6 h nach Kaffeekonsum im humanen Blutplasma für Trigonellin Konzentrationen von 5,4-6,4 μM und für NMP 0,7-0,8 μM nachgewiesen werden [Lang et al., 2010]. Die Bioverfügbarkeit von CGA ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird berichtet, dass CGA im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert zu werden scheint [Nardini et al., 2002]. Kontrovers hierzu konnten verschiedene Studien CGA in der Ileostomaflüssigkeit sowie im Plasma widerfinden [Monteiro et al., 2007; Olthof et al., 2003 und 2001]. Es scheint, dass CGA teilweise in intakter Form resorbiert werden kann, so dass es durchaus sinnvoll erscheint, deren bioaktive Wirkung in plasmarelevanten Konzentrationen zu untersuchen. Die Kaffeeinhaltsstoffe wurden im Rahmen dieser Dissertation in den drei Kombinationen CGA/Trigonellin, NMP/CGA sowie CGA/NMP/Trigonellin betrachtet. Die Kombinationen mit Trigonellin zeigten hierbei synergistische Effekte. Im Unterschied zur Inkubation der einzelnen Inhaltsstoffe ließ die

Koinkubation einen signifikanten Anstieg der Gentranskripte der untersuchten Phase-II-Enzyme und Nrf2 beobachten. Entgegen der zwei Koinkubationsansätzen die Trigonellin enthielten, zeigte sich für die Koinkubation CGA und NMP bei nur zwei Gentranskripten (GSTT1, HO1), der insgesamt vier untersuchten Gentranskripte, eine Zunahme. Bei der Induktion der GSTT1 handelt es sich ebenso um einen synergistischen Effekt. Im Gegensatz dazu muss bei der Induktion der HO1 durch Inkubation von NMP mit CGA von einem additiven Effekt gesprochen werden, da NMP als Reinsubstanz bereits eine Steigerung der HO1-Transkription erkennen ließ. Im Vergleich der drei Koinkubationen ließ sich durch die Kombination NMP/CGA eine weniger ausgeprägte Induktion an Gentranskripten der ausgewählten Phase-II-Enzyme und Nrf2 beobachten. Möglicherweise trägt der Anteil von Trigonellin in der Koinkubation dazu bei, dass die ausgewählten Phase-II-Enzyme und Nrf2 in ihren Transkriptmengen erhöht wurden. In der Literatur sind nur wenige Daten in plasmarelevanten Konzentrationen der untersuchten Kaffeeinhaltsstoffe zu finden und weiterhin fast ausschließlich Untersuchungen mit einzelnen Kaffeeinhaltsstoffen durchgeführt worden. Allerdings ist unterstützend zu den hier dargestellten Ergebnissen ein synergistischer Effekt durch Koinkubation von CGA im Zusammenhang mit einer antioxidativen Wirkung beschrieben. Mittels des (oxygen radical absorbance capacity in microemulsion) ORAC_E Assay wurde die Fähigkeit gemessen Sauerstoffradikale abzufangen, wobei der synergistische Effekt von Tocopherol mit verschiedenen Antioxidantien untersucht wurde. CGA konnte hierbei den potentesten synergistischen Effekt zeigen, weshalb die Autoren auf mögliche Folgen für den Konsum von Kaffee verwiesen [Sim et al., 2009]. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen immer eine potente, synergistische Wirkung durch die Kombination von CGA mit Trigonellin zeigten, kann vermutet werden, dass diese zwei Kaffeeinhaltsstoffe eine zentrale Wirkstoffkombination, im Zusammenhang mit einer Steigerung detoxifizierender und antioxidativ-wirksamer Phase-II-Enzyme, in Kaffee darstellen.

Weiterhin ließ die Koinkubation von CGA und Trigonellin in plasmarelevanten Konzentrationen, neben der Zunahme der Transkription von Phase-II-Enzymen, ein Anstieg des Transkriptionsfaktors Nrf2 erkennen. Der Translokation und Akkumulation von Nrf2 in den Zellkern kann eine vermehrte *de novo* Synthese von Nrf2 im Zytosol vorgeschaltet sein [Copples et al., 2008]. Damit kann vermutet werden, dass CGA und Trigonellin auch im

plasmarelevanten Konzentrationsbereich eine *de novo* Synthese von Nrf2 vermitteln, was nachfolgend möglicherweise den Nrf2/ARE-Signalweg aktiviert.

Die Untersuchung der Kaffeeinhaltsstoffe in plasmarelevanten Konzentrationsbereichen konnte aufschlussreiche Hinweise liefern, welche Inhaltsstoffe an der antioxidativen Wirkung von Kaffee, im Sinne einer gesteigerten Gentranskription von Phase-II-Enzymen, unter *in vivo* Bedingungen beteiligte sein könnten. Für den Konsum von CGA-Kaffee und NMP-Kaffee kann vermutet werden, dass die Kombination von NMP und CGA und noch ausgeprägter durch Kombination von CGA und Trigonellin an der Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 beteiligt sein könnte. Weiterhin vermittelten diese *in vitro* Untersuchungen, dass der Konsum des Kaffees Brazil Blend, durch das Zusammenspiel von CGA, Trigonellin und NMP, zu einer Steigerung von Phase-II-Enzymen und Nrf2 *in vivo* beitragen könnte. Im Allgemeinen deuten die synergistischen als auch additiven Effekte der Koinkubationsuntersuchungen an, dass gerade bei der Betrachtung vielfältige zusammengesetzter Lebensmittel nicht die Wirkung einzelner, sondern miteinander kombinierter Substanzen von Bedeutung sind.

Beachtet werden sollte, dass noch weitere Inhaltsstoffe im Kaffee die Wirkung von CGA, NMP und Trigonellin beeinflussen können, weshalb eine Übertragbarkeit der gezeigten Effekte auf das komplexe Substanzgemisch Kaffee erschwert wird. Untersuchungen mit Apfelpolyphenolen konnten zeigen, dass rekonstituierte Mischungen im Vergleich zum Gesamtapfelextrakt eine unterschiedliche chemopräventive Wirkung in *in vitro* Testsystemen besitzen [Kern et al., 2005]. Dennoch scheinen die hier dargestellten Ergebnisse vielversprechende Anhaltspunkte zu geben, um weitere Koinkubationsuntersuchungen durchzuführen, wodurch möglicherweise bioaktiv-wirksame Wirkstoffkombinationen des Kaffees identifiziert werden können.

4.3.6 *Modulation der GST-Enzymaktivität durch Kaffeeinhaltsstoffe in konsumrelevanten Konzentrationen*

Die vorangegangenen Untersuchungen in konsumrelevanten Konzentrationen zeigten einen Synergismus, wobei die Kombination von CGA, NMP und Trigonellin, entgegen der Wirkung in den eingesetzten Konzentrationen als Einzelsubstanz, koinkubiert zu einem potenten Anstieg der Gentranskripte ausgewählter Phase-II-Enzyme führten. Es stellte sich die Frage, ob derartige Wirkungen auch auf Ebene der Enzymaktivität zu Tage treten würden.

HT29-Zellen wurden folglich für 24 h und 48 h mit CGA, NMP und Trigonellin bzw. deren Kombination inkubiert und die GST-Enzymaktivität nach der Methode von Habig et al., (1974) untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen folgten analog zu Abschnitt 4.3.5 einer hypothetischen Abschätzung der Blutplasmagehalte an CGA, NMP und Trigonellin wie sie nach dem Konsum von Kaffee Brazil Blend auftreten könnten, um eine Annäherung an die *in vivo* Situation zu erhalten.

Nach 24 h Inkubation ließ sich ein marginaler Anstieg der GST-Enzymaktivität durch CGA ($109,8 \pm 2,8$) beobachten (Abbildung 49, A). Die Koinkubation der drei Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin führte zu einer Aktivitätssteigerung auf $113,8 \pm 2,9$. Die potenteste Wirkung auf die GST-Enzymaktivität wurde durch die Koinkubation von CGA und Trigonellin ($126,1 \pm 3,6$) erreicht. Eine 48-stündige Inkubation ergab für CGA ($112,3 \pm 5,8$) und Trigonellin ($116,4 \pm 8,6$) eine nicht signifikante Zunahme der Enzymaktivität (Abbildung 49, B). Unter den Koinkubationsversuchen nach 48 h konnte lediglich die Kombination von Trigonellin und CGA eine signifikante Erhöhung der GST-Enzymaktivität nach 48 h auf $110,3 \pm 2,4$ bewirken.

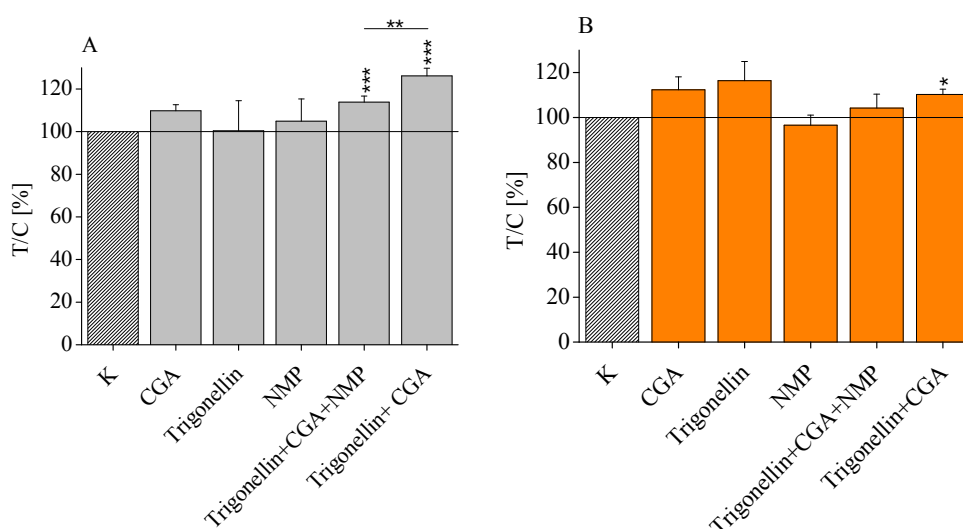


Abbildung 49:

Modulation der GST-Enzymaktivität durch CGA [0,5 µM], NMP [1 µM] und Trigonellin [5,5 µM] nach (A) 24 h und (B) 48 h in HT29-Zellen. Serumhaltige Inkubation (10 % FKS) mit 0,1 % DMSO mit dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten Student's *t*-test (bezogen auf DMSO-Kontrolle bzw. Koinkubation Trigonellin+CGA+NMP auf Koinkubation Trigonellin+CGA), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$.

Die vorliegenden Untersuchungen in plasmarelevanten Konzentrationen zeigten für NMP als Einzelsubstanz weder nach 24 h noch nach 48 h ein Anstieg der GST-Enzymaktivität.

Untersuchungen im Zusammenhang mit der GST-Enzymaktivität und NMP *in vivo* wurden von Somoza et al. (2003) durchgeführt, wobei eine 15-tägige Fütterung von NMP nur einen marginalen Anstieg der GST-Enzymaktivität um $115 \pm 17,6 \%$ in der Rattenniere sowie keine Zunahme ($103 \pm 24,9 \%$) in der Rattenleber beobachten ließ. Diese *in vivo* Studie scheint demnach die Wirkung von NMP als Einzelsubstanz auf die GST-Enzymaktivität in plasmarelevanten Konzentrationen zu bestätigen. Entgegen der Ergebnisse von NMP als Einzelsubstanz, ließ sich für die Kombination von NMP mit CGA und Trigonellin ein zum Teil signifikanter Anstieg der GST-Enzymaktivität beobachten. Hierbei zeigte sich nach 24 h Inkubation der ausgeprägte Anstieg der GST-Enzymaktivität für die Koinkubation. CGA ließ bereits als Einzelsubstanz ein Anstieg an GST-Enzymaktivität erkennen, weshalb bei der Koinkubation von NMP, CGA und Trigonellin ein additiver Effekt möglich scheint. Ein Vergleich mit den Ergebnissen dieses Koinkubationsansatzes auf Gentranskriptionsebene (Abschnitt 4.3.5) lässt erkennen, dass die Inkubation von HT29-Zellen für 24 h mit der Kombination aus NMP, CGA und Trigonellin in plasmarelevanten Konzentrationen sowohl eine Induktion der GSTT1-Gentranskription als auch eine Steigerung der GST-Enzymaktivität bewirken kann. Weiterhin konnte in beiden Untersuchungen beobachtet werden, dass die Kombination der drei Kaffeeinhaltsstoffe eine ausgeprägtere Wirkung vermittelte als die Inkubation der einzelnen Inhaltsstoffe.

Die vorliegenden Untersuchungen nach 24 h ließen allerdings auch erkennen, dass durch die Koinkubation von CGA und Trigonellin eine signifikant vermehrte GST-Enzymaktivität erzielt wurde, im Vergleich zur Koinkubation mit NMP. Nach 48 h Inkubation konnten sogar nur CGA und Trigonellin als Einzelsubstanzen, als auch die Kombination beider die GST-Enzymaktivität erhöhen, wohingegen Inkubationen mit NMP keine signifikante Modulation der GST-Enzymaktivität ergaben. Für die Wirkung des Konsums von Brazil Blend könnte dies folglich bedeuten, dass eine Zunahme der GST-Enzymaktivität in besonderem Maße durch die Kombination der zwei Kaffeeinhaltsstoffe CGA und Trigonellin beeinflusst wird und dieser Effekt durch den Zusatz von NMP eher minimiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des Konsums von Kaffee Brazil Blend auf die Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme *in vivo* untersucht. Die GST-Enzymaktivität war nicht Gegenstand der *in vivo* Untersuchungen, weshalb keine direkt vergleichbaren Daten zu den *in vitro* Ergebnissen in plasmarelevanten Konzentrationen vorliegen. Allerdings wurde in einer *in vivo* Studie von Steinkellner et al. (2005) die GST-Enzymaktivität im Plasma nach

Kaffee konsumiert. Hierbei ließ sich beobachten, dass der Konsum von Kaffee zu einer signifikanten Steigerung der GST-Enzymaktivität im Plasma führte. Weiterhin wurde untersucht, ob diese Wirkung auf die Kaffeeinhaltsstoffe Cafestol und Kahweol zurückzuführen ist, was sich jedoch nicht bestätigte. Infolgedessen postulierten die Autoren, dass unter anderem Chlorogensäure an der Induktion der GST beteiligt sein könnte. Diese Vermutung wird durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bekräftigt, allerdings scheint nicht der CGA-Gehalt in Kaffee allein, sondern in Kombination mit Trigonellin an einer gesteigerten GST-Enzymaktivität beteiligt zu sein. Weiterführende Untersuchungen mit Koinkubationen von CGA und Trigonellin, mit und ohne Zusatz von NMP, sollten durchgeführt werden, um zum einen das Wirkpotential der vielversprechenden Kombination aus CGA und Trigonellin näher zu charakterisieren und zum anderen die in diesen Untersuchungen beobachtete abgeschwächte Wirkung durch Kombination mit NMP genauer beurteilen zu können.

4.4 Gesamtdiskussion der Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Dissertation standen drei Kaffees, die durch unterschiedliche Röstung voneinander abweichende Gehalte der Inhaltsstoffe CGA und NMP sowie Trigonellin enthielten. Eine zentrale Fragestellung dieser Dissertation war, inwieweit die drei Kaffees und ausgewählte Kaffeeinhaltsstoffe antioxidativ-wirksame Phase-II-Enzyme beeinflussen und welche zellulären Wirkmechanismen daran beteiligt sind.

Eine Modulation des Zellwachstums von HT29-Zellen nach Inkubation mit CGA-KE, NMP-KE oder BB-KE konnte ab Konzentrationen $> 100 \mu\text{g/ml}$ festgestellt werden. Die stark erhöhten Gehalte von CGA und NMP, der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten KEs, im Vergleich zu handelsüblichen Produkten scheinen die erhöhten zellwachstumshemmenden Effekte in höheren Konzentrationen nicht erklären zu können. CGA und NMP zeigten in vorangegangenen Untersuchungen in den Konzentrationen, in denen sie in den Extrakten vorlagen, keine wachstumshemmenden Effekte in HT29-Zellen. Im weiteren Untersuchungsverlauf wurde ebenso der Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin auf seine zytotoxischen Einflüsse nach 24 h untersucht, wobei nur in der höchsten eingesetzten Konzentration ein marginaler Rückgang des Zellwachstums festgestellt werden konnte (Abbildung 39). In den eingesetzten Gehalten an KE werden jedoch keine Konzentrationen an Trigonellin erreicht, in denen ein zytotoxischer Effekt sichtbar wurde. Demnach scheint es unwahrscheinlich, dass Trigonellin die Effekte der KEs auf das Wachstum von HT29-Zellen mitverantwortete. Obgleich die drei Kaffeeinhaltsstoffe CGA, NMP und Trigonellin als Einzelsubstanz die zytotoxischen Effekte der KEs in erhöhten Konzentrationen nicht zu beeinflussen scheinen, könnte möglicherweise die Kombination mehrerer Kaffeeinhaltsstoffe für die erfasste Wirkung der KEs verantwortlich sein. Eine aktuelle Untersuchung von Hegele et al. (2009) konnte einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität von bovinen Aortaendothelzellen (GM-7373) durch gefilterten Kaffee im Vergleich zur Kontrolle beobachten. In weiterführenden Messungen ließ sich erkennen, dass der Zusatz von Katalase diese Zytotoxizität vermindert. Untersuchungen im Rahmen des hier bearbeiteten Projektes ohne Katalase ließen eine konzentrationsabhängige, extrazelluläre H_2O_2 -Bildung durch eine 24 h Inkubation mit KEs feststellen [Dissertation Bakuradze, 2010]. Um Artefakte einer möglichen extrazellulären H_2O_2 -Generierung zu vermeiden, wurden alle Zellkulturuntersuchungen mit KEs unter Zusatz von 100 U/ml Katalase durchgeführt. Der Einfluss von extrazellulär gebildetem H_2O_2 auf das Wachstum von HT29-Zellen durch KEs

scheint aufgrund des Katalasezusatzes wenig wahrscheinlich. Als ein zentrales Ergebnis der zytotoxischen Untersuchungen der KEs bleibt festzuhalten, dass wachstumshemmende Effekte erst in erhöhten Extraktkonzentrationen auftraten und demnach in den folgenden Untersuchungen in den Konzentrationen $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ keine zytotoxischen Einflüsse zu erwarten sind.

Als erster Parameter wurde die Generierung von intrazellulären ROS mittels DCF-Assay untersucht. CGA-KE zeichnet sich im Vergleich zu handelsüblichen Produkten durch erhöhte Gehalte an CGA und Trigonellin sowie einem außergewöhnlich niedrigen Anteil an NMP aus. Nach 3 h Inkubation mit CGA-KE zeigte sich eine signifikante Zunahme des intrazellulären ROS-Gehaltes [Dissertation Böttler, 2009] (Abbildung 25, A). Die deutlich erhöhten Gehalte an CGA und Trigonellin in CGA-KE konnten keine Anhaltspunkte für ROS-generierende Effekte liefern, da ihnen vielmehr ROS-abfangende Wirkungen zugeschrieben werden [Böttler et al., 2010; Dissertation Bakuradze, 2010]. Ein erhöhter ROS-Gehalt wird als Aktivator des Nrf2/ARE-Signalweg beschrieben [Jaiswal et al., 2004; Nquyen et al., 2003; Itoh et al., 1999]. Dieser Zusammenhang konnte im Arbeitskreis durch das Mykotoxin Alternariol belegt werden, da eine im DCF-Assay beobachtete Zunahme des intrazellulären ROS-Gehaltes zu einer vermehrten Nrf2-Kerntranslokation nach 3 h führte [Dissertation Fehr, 2009]. Entgegen der Erwartungen, aufgrund der potenten ROS-Generierung, konnte für CGA-KE keine vermehrten nukleären Nrf2-Gehalte nach 3 h Inkubation in HT29-Zellen beobachtet werden (Abbildung 26). Möglicherweise führen Inhaltsstoffe des CGA-KE zu einem Anstieg an intrazellulären ROS bei gleichzeitiger Hemmung des Nrf2/ARE-Signalweges.

Des Weiteren zeigte CGA-KE im Konzentrationsbereich von 10 $\mu\text{g/ml}$ bis 500 $\mu\text{g/ml}$ einen signifikanten Rückgang des nukleären und zytosolischen Nrf2-Gehaltes. Bei den höher eingesetzten Konzentrationen ab 250 $\mu\text{g/ml}$ können durchaus zytotoxische Einflüsse eine Rolle spielen, wie die Untersuchung des Zellwachstums von HT29-Zellen durch CGA-KE im Vorfeld klären konnte. Die Leitverbindung CGA zeigte im Gegensatz zum CGA-KE ab 10 nM bis 500 μM nach 3 h Inkubation eine signifikante Kerntranslokation [Böttler et al., 2010]. In Übereinstimmung hierzu ist in der Literatur ein Anstieg an nukleärem Nrf2-Protein nach Inkubation mit 40 μM CGA in Mausepithelzellen (JB6) sowie nach Inkubation von murinen Hepatomzellen (Hepa1c1c7) mit einem Derivat der CGA, 3-Kaffeoyl-4-dihydrokaffeoylchinasäure, beschrieben [Hwang et al., 2009; Feng et al., 2005]. Demnach ist eine Beteiligung von CGA an den Nrf2-minimierenden Effekten des CGA-KE

unwahrscheinlich. Der Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin ist ebenso in erhöhtem Maße in CGA-KE enthalten. Eine 3 h Inkubation mit Trigonellin verursachte in HT29-Zellen im Konzentrationsbereich von 10 pM bis zu 100 nM eine teilweise signifikante Verminderung an zytosolischem sowie nukleärem Nrf2-Protein (Abbildung 40). Der Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 10 ng/ml CGA-KE enthält Gehalte an Trigonellin, in welchen im Laufe dieser Arbeit eine Verminderung des Gesamtproteingehaltes an Nrf2 beobachtet werden konnte. Eine Beteiligung von Trigonellin an dem durch CGA-KE verursachten Rückgang von Nrf2 im Zellkern scheint demnach möglich. Beachtet werden muss allerdings, dass sich der potenteste Rückgang an nukleärem Nrf2-Protein durch CGA-KE außerhalb der Hemmkonzentration von Trigonellin lag, was vermuten lässt, dass noch weitere Inhaltsstoffe in CGA-KE den potenten Rückgang von nukleärem Nrf2 mitverantworten. CGA-KE ließ für 100 pg/ml bis 10 ng/ml einen Anstieg an zytosolischem Nrf2-Protein erkennen (Abbildung 26). Der Translokation und Akkumulation von Nrf2 kann einer vermehrten *de novo* Synthese im Zytosol vorgeschaltet sein [Copples et al., 2008]. Es kann postuliert werden, dass in den Konzentrationen mit erhöhtem zytosolischem Nrf2-Gehalt der anfängliche Schritt einer Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch eine vermehrte *de novo* Synthese sichtbar zu werden scheint.

In HT29-Zellen war nach 3 h Inkubation mit CGA-KE ein Anstieg der Transkripte von HO1, Nrf2 und GSTA1 sowie nach 24 h von NQO1, GSTA1 und GSTA2 zu beobachten [Dissertation Böttler, 2009] (Abbildung 30 und Abbildung 31), wobei kein direkter Beitrag der Leitverbindung CGA an der Modulation durch CGA-KE ersichtlich war. Daher scheinen neben CGA noch weitere Kaffeeinhaltsstoffe im CGA-KE für die Induktion der Gentranskripte der untersuchten Phase-II-Enzyme mitverantwortlich zu sein. CGA-KE besitzt demnach eine antioxidative Wirkung, im Sinne einer Erhöhung der Gentranskripte von Phase-II-Enzymen, allerdings konnte hierfür im Rahmen dieser Dissertation keine direkte Beteiligung des Nrf2/ARE-Signalweg beobachtet werden. Eine Induktion der Gentranskripte durch Nrf2-unabhängige Signalwege wurde bereits für verschiedene Phase-II-Enzyme beschrieben. So wurde die Expression der GST durch den nukleären Pregnan-X-Rezeptor sowie den konstitutiven Androstanerezeptor, als auch die HO1-Gentranskripte mittels des neuronalen Wachstumsfaktorrezeptor, induziert [Wada et al., 2009; Rojo et al., 2006]. Im Zusammenhang mit Kaffee zeigte eine aktuelle Studie von Kalthoff et al. (2010) in humanen Leberzellkarzinomzellen (HepG2), Speiseröhrenepithelkarzinomzellen (KYSE70) sowie

Kolonkarzinomzellen (Caco-2) nach Inkubation mit Kaffee eine Induktion der Gentranskription der UDP Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 durch den Nrf2/ARE- aber auch den AhR/XRE-Signalweg [vgl. 2.5.4]. Die Induktion der Gentranskription von Phase-II-Enzymen durch CGA-KE könnte somit durch Nrf2-unabhängige Signalwege vermittelt werden. Alternativ scheint es denkbar, dass die Aktivierung von Nrf2 durch CGA-KE durchaus in einem anderen Zeitfenster stattfindet, da die Untersuchungen dieser Dissertation nur eine 3 h Inkubationszeit fokussierten. Besonders im Hinblick auf die durch CGA-KE möglicherweise vermittelte *de novo* Synthese in den niedrigeren Konzentrationsbereichen, die in der Literatur als anfänglicher Schritt der Nrf2-Kerntranslokation beschrieben wird, könnte eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen. In Übereinstimmung mit den Resultaten der Gentranskriptionsuntersuchungen konnte für CGA-KE eine Induktion der Proteinexpression der NQO1, GSR und γ -GCL in HT29-Zellen nach 24 h festgestellt werden [Dissertation Bakuradze, 2010]. Insbesondere für NQO1 scheint somit belegt, dass CGA-KE eine Aktivierung der Gentranskription einleitet, welche weiterführend in der Proteinexpression wiederzufinden ist.

Passend zur Induktion der Gentranskription verschiedener GST-Isoformen zeigte CGA-KE einen Anstieg der GST-Enzymaktivität nach 24 h und 48 h in HT29-Zellen (Abbildung 34). CGA-KE scheint demnach die GSTs auf Transkriptionsebene sowie im Bereich der Enzymaktivität zu aktivieren. Im Unterschied zu den Effekten auf Transkriptionsebene deutete die GST-Enzymaktivität eine direkt Beteiligung von CGA an, da auch die Enzymaktivität durch Inkubation mit CGA nach 24 h und 48 h in entsprechenden Konzentrationen anstieg. Übereinstimmend hierzu konnte in der Literatur mehrfach eine Zunahme der GST-Enzymaktivität durch CGA *in vitro* festgestellt werden [Feng et al., 2005; Somoza et al., 2003].

Im Rahmen des Projektes wurde eine gesteigerte Transkriptmenge der GSTT1 und GSTA1 durch eine 3 h Inkubation von humanen peripheren Blutlymphozyten mit CGA-KE *ex vivo* detektiert werden. Die humane Interventionsstudie I ergab nach vierwöchigem Konsum von CGA-Kaffee im Mittel aller Probanden einen Anstieg der Transkription von HO1, NQO1, γ -GCL und Nrf2 [Dissertation Böttler, 2009], sowie eine Zunahme der Enzymaktivität der SOD1, GPx und Katalase [AG Somoza, Kotyczka, unveröffentlichte Daten]. Für CGA-KE scheint folglich die Induktion der Gentranskription und Enzymaktivität von Phase-II-Enzymen auch auf die *in vivo* Situationen übertragbar zu sein. Ob die erhöhten Gehalte von

CGA in Kaffee für eine mögliche Verbesserung der enzymatischen Abwehr, insbesondere auf *in vivo* Ebene, mitverantwortlich sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden und bedarf weiteren Untersuchungen.

Die Bioverfügbarkeit von CGA wird kontrovers diskutiert, wobei es Hinweise gibt, dass CGA im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert wird [Nardini et al., 2002]. Der Resorption folgend kann ein großes Spektrum an Metaboliten gebildet werden. Untersuchungen ließen beobachten, dass die Metabolisierung der Hydroxyzimtsäuren *in vitro* sowie in einer *in vivo* Studie nach der Verabreichung von Kaffee über Glucuronidierungs- und Sulfatierungsreaktionen ablaufen kann [Wong et al., 2009]. Um sich der *in vivo* Situation anzunähern, wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei mögliche Metabolite von CGA auf die Modulation ARE-regulierter Gene *ex vivo* untersucht (Abbildung 33). Hierbei zeigten sich starke Unterschiede zwischen den untersuchten Isomeren Kaffeoyl-3-O- β -D-Glucuronid und Kaffeoyl-4-O- β -D-Glucuronid, wobei nur das Kaffeoyl-3-O- β -D-Glucuronid die ARE-regulierten Gene HO1, NQO1 und GSTP1 potent in ihrer Transkriptmenge erhöhte. Dabei traten die induktiven Effekte auf diese Gene in Konzentrationen auf, wie sie möglicherweise unter *in vivo* Bedingungen am Wirkort erreicht werden könnten. Demzufolge könnte eine Induktion von Phase-II-Enzymen durch CGA-Kaffees *in vivo* unter Beteiligung von Metaboliten der CGA vermittelt werden. Weiterhin konnten verschiedene Studien intakte CGA in der Ileostomaflüssigkeit sowie im Plasma nachweisen, was der diskutieren Hydrolyse im Gastrointestinaltrakt zu widersprechen scheint [Monteiro et al., 2007; Olthof et al., 2003 und 2001]. Demnach ist es denkbar, dass CGA teilweise in intakter Form resorbiert wird, weshalb eine Untersuchung ihrer bioaktiven Wirkung in plasmarelevanten Konzentrationen sinnvoll erscheint. In Annäherung an die *in vivo* Situation wurden CGA und Trigonellin in Konzentrationen in HT29-Zellen koinkubiert, wie sie hypothetisch nach Konsum von CGA-Kaffee lokal an den Darmepithelzellen und im Blutplasma vorliegen könnten. Dabei zeigte sich, dass lokal an den Darmepithelzellen eine Steigerung der Gentranskription von Phase-II-Enzymen durch Konsum von CGA-Kaffee durch dessen Gehalt an CGA und Trigonellin vermittelt werden könnte, wobei sich weiterhin eine Beteiligung des Nrf2/ARE-Signalweges, anhand einer vermehrten Nrf2 *de novo* Synthese, andeutete (Abbildung 45, A). So war eine potente Induktion der Gentranskription der Phase-II-Enzyme HO1, NQO1 und Nrf2 zu beobachten. Gleiches zeigte sich in potentiell plasmarelevanten Konzentrationen, wobei sich eine synergistische Wirkung beobachten ließ, da nur die Koinkubation von CGA und Trigonellin und nicht die Einzelsubstanzen alleine

eine vermehrte Gentranskription der Phase-II-Enzyme und Nrf2 bewirkten (Abbildung 46). Eine Studie von Sim et al. (2009) bestätigte eine synergistische Wirkung durch Kombinationsversuche von Tocopherol mit verschiedenen Antioxidantien bei der Untersuchung einer antioxidativen Wirkung mittels ORAC_E Assay, womit die Fähigkeit Sauerstoffradikale abzufangen, detektiert wird. CGA zeigte hierbei den potentesten synergistischen Effekt und die Autoren verweisen auf mögliche Folgen für den Konsum von Kaffee. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation ergab im Bezug auf die Wirkung von CGA eine Abhängigkeit von der koinkubierten Substanz. Die Koinkubation von CGA mit Trigonellin in hypothetischen Plasmakonzentrationen nach Konsum von CGA-Kaffee, im Vergleich zur Koinkubation von CGA mit NMP, zeigte einen deutlich potenteren Anstieg der Transkripte für GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 (Abbildung 46 und Abbildung 47). Abschließend betrachtet konnten die Gene für HO1, NQO1 und Nrf2 durch die Koinkubation von CGA mit Trigonellin, sowohl in plasmarelevanten Konzentrationen in HT29-Zellen, als auch durch vierwöchigen Konsum des CGA-Kaffees in PBLs der Probanden in ihrer Transkription erhöht werden. Infolgedessen kann vermutet werden, dass insbesondere die Kombination von CGA und Trigonellin an der Induktion der Transkription der ausgewählten Phase-II-Enzyme und Nrf2 durch CGA-Kaffees *in vivo* beteiligt ist.

Der zweite Studienkaffee, bezeichnet als NMP-Kaffee, charakterisiert sich durch erhöhte Gehalte an NMP und relativ niedrigen Konzentrationen an CGA. Eine 3 h Inkubation von HT29-Zellen mit 10 µg/ml und 100 µg/ml NMP-KE führte zu einem signifikanten Anstieg an nukleärem Nrf2 (Abbildung 27). Aufgrund des Nachweises im DCF-Assay, dass NMP-KE nur marginal ROS generiert [Dissertation Böttler, 2009] (Abbildung 25), kann von einer substanzvermittelten Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges ohne oxidative Einflüsse ausgegangen werden. Es ließen sich Hinweise finden, dass die erhöhten Gehalte von NMP im NMP-KE einen Beitrag zur Nrf2-Kerntranslokation leisten könnten. NMP ließ in vorangegangenen Untersuchung in Konzentrationen, wie sie im NMP-KE vorlagen, einen potenten Anstieg des Nrf2-Kerngehaltes erkennen [Böttler et al., 2010]. Verschiedene Studien deuten hierzu bestätigend einen Einfluss von NMP auf den Nrf2/ARE-Signalweg an. Eine Untersuchung zeigte in humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) mittels Luciferase-Reporterassay eine positive Korrelation der zunehmenden Aktivität des ARE mit ansteigendem Röstgrades des Kaffee [Paur et al., 2010]. Neben Maillardprodukten steigt auch der Gehalt von NMP im Laufe der Röstung an [Stadler et al., 2002a]. Weiterhin zeigten Zill et

al. (2003) für NMP in humanen Kolonkarzinomzelle (Caco-2) einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Phosphorylierungsstatus von p44/42 (ERK1/2) MAPK, was laut Literatur ein mögliches, vorgeschaltetes Element des Nrf2/ARE-Signalweges darstellt [Lin et al., 2010; Lim et al., 2007; Manandhar et al., 2007; Keum et al., 2006; Yu et al., 1999]. Im Rahmen dieser Dissertation deutete sich, anhand erster, orientierender Messungen durch den Einsatz spezifischer Hemmstoffe an, dass die vorgeschalteten Signalelemente ERK1/2 (p44/42), PI3K und verschiedene Isoformen der PKC an der Aktivierung der Nrf2-Kerntranslokation durch NMP-KE beteiligt sind (Abbildung 29). NMP-KE zeigte allerdings auch eine Abnahme an nukleärem Nrf2 in niedrigeren Konzentrationen (10 pg/ml bis 100 ng/ml). Eine Begründung hierfür könnte die im Laufe der Untersuchungen beobachtete Abnahme des nukleären und zytosolischen Nrf2-Gehaltes durch Inkubation mit Trigonellin in HT29-Zellen sein (Abbildung 40). Wie schon im Zusammenhang mit CGA-KE gezeigt werden konnte, sind auch die Gehalte an Trigonellin im NMP-KE im Bereich der Hemmkonzentration der Einzelverbindung Trigonellin. Daher könnte das in NMP-KE enthaltene Trigonellin einen Beitrag zur Verringerung des nukleären Proteingehaltes von Nrf2 leisten.

Darauf aufbauende Untersuchungen konnten zeigen, dass NMP-KE in HT29-Zellen, in Weiterleitung der Translokation von Nrf2, zur Induktion der Transkription von ARE-regulieren Phase-II-Enzymen führen kann [Dissertation Böttler, 2009]. Nach 3 h Inkubation wurden die Transkripte von HO1, GSTA1 und Nrf2 erhöht sowie nach 24 h ein Anstieg an HO1, GSTA1, GSTA2 und Nrf2 beobachtet (Abbildung 30 und Abbildung 31). Für NMP-KE zeigte sich in der Konzentration mit einem Maximum an Nrf2-Kerntranslokation (100 µg/ml) die potenteste Induktion der Gentranskription verschiedener Phase-II-Enzyme, so dass eine direkte Konzentrations-Wirkungsbeziehung wahrscheinlich ist. Bestätigend zu diesen Ergebnissen wurde bereits in der Literatur ein Zusammenhang zwischen Kaffee und der Aktivierung antioxidativer Phase-II-Enzyme über den Nrf2/ARE-Signalweg beschrieben. Humane Lungenzellen (AREc32) wurden mit einem Ratten GSTA2-ARE Reporterkonstrukt transfiziert und für 24 h mit 800 µg/ml Kaffee inkubiert, wobei ein signifikanter Anstieg der Nrf2-Luciferase Reporteraktivität detektiert werden konnte. Des Weiteren wurde in primären Rattenhepatozyten nach 24 h mit der gleichen Kaffeekonzentration eine Zunahme der mRNA verschiedener Enzyme wie HO1, NQO1, GSTA und γ-GCL beobachtet [Cavin et al., 2008]. Der Anstieg der Gentranskripte für GSTA1, HO1 und Nrf2 nach 24 h konnte neben NMP-KE

auch für dessen Leitverbindung NMP in übereinstimmenden Konzentrationen beobachtet werden [Böttler et al., 2010]. Eine Beteiligung von NMP an den induzierenden Effekten von NMP-KE auf Gentranskriptionsebene scheint demnach naheliegend.

Obgleich NMP-KE verschiedene Isoformen der GST in deren Gentranskription erhöhen konnte, zeigte sich in der gleichen Konzentration (10 µg/ml) keine Modulation der GST-Enzymaktivität nach Inkubation mit NMP-KE nach 24 h, 48 h oder 72 h in HT29-Zellen. Passend dazu wurde das gleiche Resultat für NMP (10 µM) beobachtet. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur eine Steigerung der GST-Aktivität durch NMP beschrieben. Nach 72 h konnte eine signifikant gesteigerte GST-Aktivität in Caco-2-Zellen durch 1 mM NMP beobachtet werden [Somoza et al., 2003]. Allerdings wurde in dieser Studie, im Vergleich zu den hier dargestellten Untersuchungen, NMP-Konzentrationen eingesetzt, die um den Faktor 100 höher lagen und zudem Caco-2-Zellen verwendet, wodurch zellspezifische Unterschiede zu Tage treten könnten. Möglicherweise zeigte NMP-KE sowie dessen charakteristischer Inhaltsstoff NMP keine Modulation der GST-Aktivität in den vorliegenden Untersuchungen aufgrund einer zu geringen Konzentration an NMP. Eine antagonistische Wirkung durch andere Kaffeeinhaltsstoffe ist ebenfalls nicht auszuschließen.

NMP-KE bzw. NMP-Kaffee wurden im Rahmen des Projektes *ex vivo* und *in vivo* untersucht. *Ex vivo* konnte eine erhöhte Transkription von HO1, NQO1 und von Nrf2 nach 3 h Inkubation in PBLs beobachtet werden. Darüber hinaus führte ein vierwöchiger Konsum des entsprechenden NMP-Kaffees innerhalb der humanen Interventionsstudie I zu einer gesteigerten Transkriptmenge für HO1 und Nrf2 in PBLs der Probanden [Dissertation Böttler, 2009]. Im Bereich der Enzymaktivität ließ sich eine Zunahme der Katalase nach vierwöchigem NMP-Kaffeeconsum in den Erythrozyten beobachten [AG Somoza, Kotyczka, unveröffentlichte Daten]. In vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen konnte mehrfach ein Zusammenhang der Wirkung des NMP-KE mit der Leitverbindung NMP hergestellt werden. Fraglich bleibt, ob der NMP-Gehalt im Kaffeegetränk unter *in vivo* Bedingungen für die Steigerung der Transkription verschiedener Phase-II-Enzyme und Nrf2 mitverantwortlich ist. Folglich wurde NMP in einer Konzentration inkubiert, wie sie hypothetisch nach Konsum von NMP-Kaffee lokal an den Darmepithelzellen auftreten könnte. Aufgrund der nachgewiesenen antioxidativen Wirksamkeit von CGA im Zusammenhang mit der Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen und der Tatsache, dass im NMP-Kaffee beide Inhaltsstoffe gemeinsam vorliegen, wurden NMP und CGA in entsprechenden Konzentrationen kokubiert. Hierbei

zeigte sich eine gesteigerte Transkriptmenge für GSTT1 und HO1, allerdings ebenso eine Abnahme der NQO1 Transkription (Abbildung 45). Demnach scheint die Kombination von CGA mit NMP keine eindeutige Steigerung der Gentranskription von Phase-II-Enzymen zu induzieren, weshalb weitere Untersuchungen folgen müssen, um die Wirkung des NMP-Kaffees lokal an den Darmepithelzellen weiter aufzuklären. Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich, dass in hypothetischen Plasmakonzentrationen von NMP, CGA und Trigonellin nach Konsum von NMP-Kaffee die Gene für GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 durch die Inkubation der Einzelsubstanzen nicht in ihrer Transkription moduliert wurden. Allerdings ergab sich eine signifikante Zunahme der GSTT1 durch die Koinkubation von NMP und CGA sowie ein signifikanter Anstieg aller untersuchten Gentranskripte durch Koinkubation von CGA und Trigonellin (Abbildung 46 und Abbildung 47). Demnach deutet sich an, dass die Induktion der HO1 und von Nrf2 *in vivo* nach vierwöchigem Konsum von NMP-Kaffee weniger durch die Beteiligung von NMP, sondern viel mehr durch die synergistische Wirkung von CGA und Trigonellin verursacht sein könnte.

Kaffee Brazil Blend enthält im Vergleich zum NMP-Kaffee annähernd gleiche Gehalte an NMP, jedoch mehr als dreimal so viel CGA. Es stellte sich die Frage, ob durch die Kombination der zwei Leitverbindungen im Vergleich zum CGA-Kaffee und NMP-Kaffee additive oder synergistische Effekte im Bezug auf die bioaktive Wirksamkeit erreicht werden könnten. Für die Untersuchung des nukleären Nrf2-Gehaltes *in vitro* scheint diese Theorie zu zutreffen. BB-KE zeichnete sich in HT29-Zellen durch eine deutlich potentere Induktion der Nrf2-Kerntranslokation aus, als NMP-KE (Abbildung 28). Möglicherweise verdeutlicht sich dadurch, dass NMP nicht ausschließlicher Aktivator des Nrf2/ARE-Signalweges zu sein scheint, sondern weitere Kaffeeinhaltsstoffe hierbei bioaktiv wirken können. Wie im Zusammenhang mit CGA-KE bereits erwähnt wurde (s.o.), ließ sich durch die Inkubation mit CGA eine potente Nrf2 Kerntranslokation beobachten [Böttler et al., 2010]. Ein additiver Effekt der zwei Leitverbindungen NMP und CGA an der potenten Kerntranslokation von BB-KE ist demnach denkbar. Aufgrund der Untersuchungen mittels DCF-Assay, bei dem nur bei 100 µg/ml BB-KE eine marginale ROS-Bildung festgestellt wurde (Abbildung 25), scheint die durch BB-KE induzierte potente Translokation von Nrf2 ohne oxidative Einflüsse stattzufinden.

Für einzelne Konzentrationen von BB-KE ließ sich in HT29-Zellen eine direkte Weiterleitung des Signales beobachten, so folgte einer signifikanten Nrf2-Translokation eine signifikante

Zunahme der Gentranskription von Phase-II-Enzymen. BB-KE bedingte nach 3 h eine Zunahme der HO1-Transkriptmenge und nach 24 h einen signifikanten Anstieg der GSTA1 sowie NQO1 Transkription (Abbildung 30 und Abbildung 31). Für die Zunahme der NQO1 Gentranskription ließen sich Hinweise für eine direkte Beteiligung von NMP finden. So ergab die Einzelsubstanz NMP in den Konzentrationen, wie sie in BB-KE enthalten ist, eine Zunahme der NQO1-Gentranskription [Dissertation Böttler, 2009]. Weiterhin ließ sich durch Untersuchungen des Projektpartners der AG Eisenbrand (TU Kaiserslautern) ein Anstieg der NQO1-Proteinexpression nach 24 h Inkubation mit NMP in HT29-Zellen feststellen [Dissertation Bakuradze, 2010]. NMP scheint demnach die Gentranskription sowie weiterleitend die Proteinexpression von NQO1 modulieren zu können, was möglicherweise auch im BB-KE durch dessen erhöhten Gehalt an NMP zum Tragen kommt. Allerdings zeigte der Vergleich mit NMP-KE, der annähernd gleiche Gehalte an NMP wie BB-KE besitzt, auf Gentranskriptionsebene Unterschiede im induzierten Genprofil sowie in den Konzentrationen, in denen Induktionen beobachtet wurden. Infolgedessen scheint NMP zwar einen Beitrag zur Induktion der Gentranskription der ausgewählten Phase-II-Enzyme der zwei NMP-reichen KEs zu leisten, allerdings müssen weitere, sich in den Extrakten unterscheidende Inhaltsstoffe die zelluläre Antwort maßgeblich beeinflussen.

Hierzu bestätigend ließen sich abweichende Effekte der beiden NMP-reichen KEs im Bereich der GST-Enzymaktivität feststellen. Im Gegensatz zu NMP-KE führte eine 48 h Inkubation mit BB-KE zu einer signifikanten Zunahme der Aktivität der GST in HT29-Zellen (Abbildung 34, B). BB-KE modulierte demnach nicht nur die GST-Transkription, sondern scheint auch auf Proteinebene deren Enzymaktivität beeinflussen zu können. Wie im Zusammenhang mit NMP-KE bereits erwähnt, trägt NMP vermutlich nicht substantiell zur gesteigerten GST-Enzymaktivität durch BB-KE bei. Eine Beteiligung von CGA scheint durchaus wahrscheinlicher, da sich zum einen durch CGA nach 48 h einen signifikante Zunahme der GST-Enzymaktivität beobachten ließ und zum anderen in der Literatur mehrfach CGA als Modulator der gesteigerten Aktivität der GST beschrieben wurde [Feng et al., 2005; Somoza et al., 2003]. Ebenso wie für die Transkription lässt sich in der Literatur auch ein Zusammenhang zwischen dem Nrf2/ARE-Signalweg und der Enzymaktivität finden. *In vivo* zeigte die Verabreichung der chemoprotektiven Substanz Oltipraz, einem bekannten Aktivator des Nrf2/ARE-Signalweges, nach 48 h einen 5,3-fachen Anstieg der GST-Aktivität

in der Leber bei *nrf2*^(+/+) Mäusen im Gegensatz zu Tieren mit *nrf2*^(-/-), die nur einen marginalen Anstieg der Enzymaktivität aufwiesen [Ramos-Gomez et al., 2001].

Im Rahmen der humanen Interventionsstudie II wurde untersucht, ob sich die aktivierende Wirkung des BB-KE auf die Transkription von Phase-II-Enzymen *in vitro* auch *in vivo* bestätigen würde. Weiterhin wurde auch der Transkriptionsfaktor Nrf2, ein Schlüsselement der Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen, in die Untersuchungen miteinbezogen. Der vierwöchige Konsum des Kaffees Brazil Blend führte im Mittel aller Probanden zu einer signifikanten Zunahme der Nrf2-Transkriptmenge (Abbildung 37). Eine Steigerung der Nrf2-Expression wird in der Literatur mit chemopräventiven Eigenschaften in Verbindung gebracht [Kensler und Wakabayashi, 2010; Ramos-Gomez et al., 2001]. Die Untersuchung von Nrf2 zeigte in HT29-Zellen nach 3 h und 24 h Inkubation mit BB-KE keine vermehrte Gentranskription, so dass sich die Wirkung im zellulären System nicht in den Ergebnissen der Humanstudie widerspiegeln. Die Ergebnisse der humanen Interventionsstudie II werden jedoch durch die Untersuchungen von Paur et al. (2010) unterstützt, die bereits einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Nrf2/ARE(EpRE)-Signalweges und dem Konsum von Kaffee erkennen konnten. Die EpRE-Luciferaseaktivität in der Leber stieg in mit EpRE transfizierten Mäusen nach der Gabe von Kaffee *in vivo*. Ebenso war ein Anstieg der Nrf2-Genexpression nach Inkubation mit stark geröstetem Kaffee *in vitro* zu verzeichnen.

Ob die Gehalte der zwei Leitverbindungen NMP und CGA im Kaffee Brazil Blend für dessen Aktivierung von Nrf2 mitverantwortlich sind, ist aufgrund der limitierten *in vivo* Datenlage schwierig einzuschätzen. Zu beachten ist allerdings, dass die zwei NMP-reichen Kaffees, Kaffee Brazil Blend und NMP-Kaffee, eine ausgeprägtere Induktion der Nrf2-Transkription als der NMP-armen CGA-Kaffee *in vivo* zeigten. Möglicherweise tragen die erhöhten Gehalte von NMP-Kaffees sowie Kaffee Brazil Blend an NMP, zu einer Steigerung der Nrf2-Gentranskription mit bei. Die durch Konsum von Kaffee Brazil Blend gesteigerte Nrf2-Transkription könnte einen anfänglichen Schritt einer Nrf2 *de novo* Synthese andeuten, die weiterführend zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern führen kann [Copple et al., 2008]. Allerdings bedingte der vierwöchige Konsum von Kaffee Brazil Blend im Mittel aller Probanden nicht ein vermehrter Anstieg an Gentranskripten für ausgewählte Phase-II-Enzyme (Abbildung 37). In der Literatur ist hingegen *in vivo* im Zusammenhang mit Kaffee und der Induktion von Phase-II-Enzymen beschrieben. So konnte eine 10 bis 14-fache Induktion der Gentranskription des Phase-II-Enzymes UGT1A1 in der Leber und im Magen von transgenen

UGT1A1 Mäusen nach oraler Gabe von Kaffee *in vivo* beobachtet werden [Kalthoff et al., 2010]. Eine 15-tägige Fütterungsstudie mit bis zu 5 % Kaffee konnte in der Rattenleber eine Induktion der Proteinexpression verschiedener GST-Isoformen bewirken [Cavin et al., 2008]. Bichler et al. (2007) wiesen einen signifikanten Anstieg der SOD1-Enzymaktivität in humanen Lymphozyten nach einem fünftägigem Kaffeekonsum nach. Obgleich in der Literatur mehrfach eine Stimulation durch Kaffee auf Phase-II-Enzyme beschrieben wurde, scheinen die hier dargestellten Ergebnisse der ausbleibenden Induktion der Gentranskription von Phase-II-Enzymen durch Kaffee Brazil Blend stimmig mit den Untersuchungen des Projektpartners im Bereich der Enzymaktivität. So zeigten die im Rahmen der humanen Interventionsstudie II untersuchten Erythrozyten für die SOD1, GPx und Katalase im Mittel aller Probanden eine Abnahme der Aktivität nach vierwöchigem Konsum von Brazil Blend im Vergleich zur ersten „wash out“ Phase [AG Somoza, Kotyczka, unveröffentlichte Daten]. Insgesamt betrachtet lässt der Konsum von Kaffee Brazil Blend im Mittel aller Probanden keine Steigerung von Phase-II-Enzymen auf Transkriptionsebene als auch im Bereich der Enzymaktivität erkennen. Fraglich bleibt, warum der vierwöchige Konsum von Kaffee Brazil Blend durch eine gesteigerte Nrf2-Getranskription eine vermehrte *de novo* Synthese von Nrf2 andeutet, allerdings kein Anstieg ARE-regulierter Phase-II-Enzyme sichtbar wurde. Zum einen könnte die im Rahmen dieser Dissertation getroffene Genauswahl nicht optimal sein, um eine antioxidative Wirkung im Sinne einer gesteigerten Transkriptmenge von Phase-II-Enzymen durch Konsum von Brazil Blend zu detektieren. Zum anderen nehmen Miao et al. (2005) an, dass Nrf2 über den AhR/XRE-Signalweg in seiner Genexpression induziert wird und in einem Folgeschritt als exprimiertes Protein an ARE bindet und so die Transkription von Phase-II-Enzymen einleitet. Nach dieser Theorie scheint es denkbar, dass der Konsum von Brazil Blend den AhR/XRE-Signalweg aktivierte und zur vermehrten Gentranskription von Nrf2 führte. Der folgende Schritt einer Induktion von Gentranskripten ausgewählter Phase-II-Enzyme über den Nrf2/ARE-Signalweg wurde jedoch nicht aktiviert. Möglicherweise enthält Kaffee Brazil Blend Inhaltsstoffe, die auf den Nrf2/ARE-Signalweg antagonistisch wirkenden.

Weitere Erklärungsansätze für die Wirkung des Kaffees Brazil Blend *in vivo* konnte durch eine detaillierte Betrachtung der einzelnen Probanden der humanen Interventionsstudie II gewonnen werden (Abbildung 38). Zum einen konnte eine Heterogenität innerhalb des Probandenkollektives festgestellt werden, da bei 27 % aller Probanden nach vierwöchigem

Konsum von Brazil Blend eine gesteigerte Gentranskription verschiedener Phase-II-Enzyme zu beobachten war, während bei 37 % aller Probanden keine Induktion der Transkription sichtbar wurde (Tabelle 13). Wie in Abschnitt 2.8 dargestellt, werden Polymorphismen für Nrf2 und für fast alle hier untersuchten Phasen-II-Enzyme in der Literatur beschrieben. Polymorphismen scheinen für unterschiedliche Sensitivitäten einzelner Personen auf die Bioaktivität von Lebensmitteln mitverantwortlich zu sein. Eine Studie konnte zeigen, dass die chemopräventive Wirkung von grünem Tee nicht bei Personen beobachtet wurde, die einen GSTT1-null Genotyp besitzen und denen somit die GSTT1 als detoxifizierendes Enzym fehlte [Wang et al., 2007]. Eine aktuelle Studie ergab weiterhin, dass Kaffee *in vitro* zwar das Wildtyp Reportergenkonstrukt der UGT1A7 signifikant induzieren konnte, im Vergleich dazu allerdings für die polymorphe UGT1A7*12 Genvariante eine signifikante Abnahme erkennen ließ und sich folglich eine verminderte bioaktive Wirksamkeit durch Kaffee zu ergeben schien [Kalthoff et al., 2010]. Demnach könnte sich andeuten, dass die unterschiedliche Wirkung des Konsums von Kaffee Brazil Blend, im Hinblick auf die Gentranskription von Phase-II-Enzymen, durch genetische Polymorphismen im Probandenkollektiv bedingt wird. Diese Theorie wird durch den auffällig geringen Gehalt an Transkripten vor Beginn der humanen Interventionsstudie II, insbesondere für die Gene HO1, NQO1, GSTT1 und SOD1, gestützt (Abbildung 38 C, G, I und J). Die basale Transkriptmenge einzelner Phase-II-Enzyme kann sowohl durch die individuelle Ernährung und Lebensgewohnheiten, allerdings auch durch die genetische Grundausrüstung der einzelnen Probanden beeinflusst werden. Insgesamt scheinen mehrere Möglichkeiten für die verminderte Wirksamkeit von Kaffee Brazil Blend im Bezug auf die Transkription von Phase-II-Enzymen *in vivo* denkbar. Allerdings ließ sich auch erkennen, dass Kaffee Brazil Blend im Vergleich zu CGA-Kaffee und NMP-Kaffee der humanen Interventionsstudie I eine geringere Beeinflussung der Gentranskription von Phase-II-Enzymen *in vivo* vermittelte. Möglicherweise zeigte sich hierbei nur ein Abbild der voneinander abweichenden Studiendesigns der humanen Interventionsstudie I und II (Tabelle 12). Allerdings könnte auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Kaffeeinhaltsstoffe für die voneinander abweichende Wirkung des Kaffees Brazil Blend im Vergleich zum CGA-Kaffee und NMP-Kaffee *in vivo* verantwortlich sein.

Um den zugrundeliegenden Vorgang der bioaktiven Wirkung von Kaffee zu verstehen, ist die Kenntnis der daran beteiligten Kaffeeinhaltsstoffe von zentraler Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob der Kaffeeinhaltsstoff Trigonellin Phase-II-

Enzyme beeinflussen kann. Über die antioxidative Wirksamkeit von Trigonellin ist in der Literatur ein konträres Bild beschrieben. Yen et al. (2005) vermuteten eine geringe Beteiligung von Trigonellin an der Hemmung der Liposomenoxidation und schlossen dadurch auf eine geringe antioxidative Aktivität von Trigonellin im Vergleich zu Koffeinhaltstoffen wie etwa Chlorogensäuren. Die Fähigkeit Radikale abzufangen konnte ebenfalls bisher nicht für Trigonellin gezeigt werden [Hirakawa et al., 2005; Ogata et al., 2002]. Konträr hierzu ergaben Studien eines Projektpartners, dass Trigonellin nach 24 h bei 30 μM und 100 μM das TBH-induzierte ROS-Gehalt in HT29-Zellen minimiert [Dissertation Bakuradze, 2010]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte keine zytotoxische Wirkung von Trigonellin in HT29-Zellen festgestellt werden (Abbildung 39). Untersuchungen über Veränderungen des Nrf2-Proteingehaltes zeigte hingegen im pM bis μM Konzentrationsbereich eine signifikante Verminderung des Gesamt-Nrf2-Gehaltes [Diplomarbeit Sommerfeld, 2007] (Abbildung 40) die sich auch auf Gentranskriptionsebene durch eine Abnahme an Transkripten ausgewählter Phase-II-Enzyme widerspiegelte (Abbildung 41). Die NMP-vermittelte Steigerung der Transkription von NQO1 und HO1 konnte durch die Koinkubation mit Trigonellin nicht mehr erzielt werden (Abbildung 42 A und B). Trigonellin zeigte bei Betrachtung der isolierten Verbindung sowie in Kombination mit NMP eine Verminderung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme. Weiterführende Untersuchungen ließen indessen ein komplexes Verhalten von Trigonellin erkennen. So zeigte die Koinkubation mit CGA einen gesteigerten Gentranskriptgehalt für GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 (Abbildung 43). Die Inkubation von CGA, NMP und Trigonellin in Konzentrationen, wie sie hypothetisch im Plasma nach Konsum von Brazil Blend vorliegen könnten, ergab eine synergistische Wirkung, da nur die drei Substanzen koinkubiert, nicht jedoch als Einzelsubstanzen, eine signifikante Zunahme der GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2-Transkriptgehalte erreichten (Abbildung 48). Insbesondere die gesteigerten Nrf2-Transkriptgehalte in plasmarelevanten Konzentrationen *in vitro* könnte deshalb als Hinweis darauf bewertet werden, dass der potente Anstieg der Nrf2-Gentranskription nach Konsum von Brazil Blend durch das Zusammenspiel von CGA, NMP und Trigonellin induziert wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Gentranskripte der Phase-II-Enzyme GSTT1, HO1 und NQO1 eine Diskrepanz zwischen den *in vitro* Ergebnissen der Koinkubationsversuche in plasmarelevanten Konzentrationen und den Resultaten der *in vivo* Untersuchung nach vierwöchigem Konsum von Kaffee Brazil Blend. Nach der vierwöchigen Kaffeeperiode der humanen Interventionsstudie II zeigten

lediglich $\leq 13\%$ aller Probanden einen erhöhten Transkriptgehalt für HO1, NQO1 und GSTT1. Möglicherweise tragen im Kaffeegetränk, neben CGA, NMP und Trigonellin, noch weitere Inhaltsstoffe zu einer Modulation der Gentranskription der Phase-II-Enzyme bei. Denkbar scheint, dass diese noch nicht identifizierten Kaffeeinhaltsstoffe antagonistisch auf die Induktion der in dieser Arbeit untersuchten Gentranskripte von Phase-II-Enzymen wirken. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz wäre, dass Metabolite einzelner Kaffeeinhaltsstoffe, die nur unter *in vivo* Bedingungen gebildet werden können, eine bioaktive Wirkung ausüben und diese Metabolite *in vitro* nicht vorhanden waren.

Abschließend wurde *in vitro* untersucht, ob die Kombination von CGA, NMP und Trigonellin bzw. CGA und Trigonellin in plasmarelevanten Konzentrationen einen Einfluss auf die GST-Enzymaktivität haben könnte. In Analogie zu den Untersuchungen der Gentranskription ließ sich eine Aktivierung durch die Kombination von CGA, NMP und Trigonellin auch im Bereich der GST-Enzymaktivität nach 24 h erkennen (Abbildung 49, A). Weiterhin konnte eine noch deutlichere Steigerung der GST-Enzymaktivität durch die Koinkubation von CGA und Trigonellin nach 24 h und 48 h beobachtet werden (Abbildung 49 A und B), was daraufhin deuten könnte, dass CGA und Trigonellin ohne den Zusatz von NMP eine stärkere bioaktive Wirkung vermitteln. Ob der Konsum von Brazil Blend durch das Zusammenspiel von CGA, NMP und Trigonellin und, möglicherweise in noch potenterer Form durch CGA und Trigonellin, eine gesteigerte GST-Enzymaktivität auch *in vivo* erkennen lassen würde, konnte im Rahmen der durchgeführten Humanstudie nicht überprüft werden. Da die Untersuchungen in plasmarelevanten Konzentrationen *in vitro* solch eine Vermutung jedoch stützen, erscheinen weiterführende *in vivo* Untersuchungen über die Beeinflussung der GST-Enzymaktivität durch die Kombination CGA und Trigonellin sinnvoll. In

Tabelle 16 sind die bisherigen Ergebnisse zu den drei Kaffees bzw. deren Extrakte anhand ihrer unterschiedlichen Potenz in der Modulation der jeweiligen untersuchten Parameter aufgeführt.

Tabelle 16: Vergleich des Wirkprofils der drei Studienkaffees *in vitro* und *in vivo*.

Untersuchungsparameter	Auflistung der Potenz der Studienkaffees bzw. der Kaffeeextrakte (KEs)
<i>In vitro</i> Untersuchungen	
Generierung von ROS (3 h)	CGA-KE >> NMP-KE ≈ BB-KE
Nrf2-Kerntranslokation (3 h)	BB-KE > NMP-KE >> CGA-KE
Gesteigerte Transkription von Phase-II-Enzymen (3 h)	NMP-KE > CGA-KE > BB-KE
Gesteigerte Transkription von Phase-II-Enzymen (24 h)	CGA-KE ≈ NMP-KE ≈ BB-KE
Gesteigerte Transkription von Nrf2 (3 h)	CGA-KE ≈ NMP-KE >> BB-KE
Gesteigerte Transkription von Nrf2 (24 h)	NMP-KE >> CGA-KE ≈ BB-KE
Anstieg der GST-Enzymaktivität (24 h, 48 h)	CGA-KE > BB-KE >> NMP-KE
<i>In vivo</i> Untersuchungen	
Vermehrte Nrf2-Transkriptmenge nach vierwöchigem Kaffeekonsum	BB-Kaffee > NMP-Kaffee > CGA-Kaffee
Vermehrte Transkriptmenge von Phase-II-Enzymen nach vierwöchigem Kaffeekonsum	CGA-Kaffee ≈ NMP-Kaffee > BB-Kaffee

In den einzelnen *in vitro* Untersuchungen zur Bildung von ROS, Nrf2-Kerntranslokation, Gentranskription und Enzymaktivität ausgewählter Phase-II-Enzyme konnte ein unterschiedliches Wirkprofil der KEs charakterisiert werden. Eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges konnte für NMP-KE und in noch potenterem Maße für BB-KE festgestellt werden, während CGA-KE im Rahmen dieser Untersuchungen keine Nrf2-Kerntranslokation bedingte. CGA-KE scheint allerdings in besonderem Maße, neben BB-KE, einen induzierenden Einfluss auf die GST Enzymaktivität zu besitzen, während NMP-KE zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine signifikante Modulation erkennen ließ. Alle drei KEs konnten eine signifikante Erhöhung verschiedener Gentranskripte von Phase-II-Enzymen bewirken, wobei NMP-KE eine erhöhte Potenz erkennen ließ.

Zusammenfassend zeigte jeder der drei KEs in einem der drei untersuchten *in vitro* Parameter eine hervorzuhebende bioaktive Wirkung, wodurch deren Potential als Aktivator einer

gesteigerten enzymatischen Abwehr und damit gesundheitsfördernden Eigenschaft möglich scheint.

Mehrfach konnten *in vitro* Hinweise auf eine Beteiligung der Leitverbindungen NMP und CGA an der bioaktiven Wirkung gefunden werden, obgleich ein antagonistischer oder synergistischer Einfluss weiterer, noch nicht identifizierter Kaffeeinhaltsstoffe wahrscheinlich ist. Im Besonderen verdeutlicht wurde dies durch den Vergleich von BB-KE und NMP-KE, welche annähernd gleiche Gehalte an NMP besitzen. Mit Ausnahme der ROS-generierenden Effekte zeigten NMP-KE und BB-KE in allen untersuchten Testsystemen Unterschiede im Bezug auf die induzierte Wirkung sowie die Konzentration in der Effekte zu Tage traten. NMP als ausschließlicher Modulator der induzierten Wirkungen scheint somit unwahrscheinlich. BB-KE enthält im Vergleich zu handelsüblichen Produkten erhöhte Gehalte an NMP sowie moderate Konzentrationen von CGA, während NMP-KE und CGA-KE jeweils eine der zwei Leitverbindungen in besonders geringem Anteil enthalten. Ein additiver Effekt der zwei bioaktiven Kaffeeinhaltsstoffe CGA und NMP konnte für den BB-KE nur im Bereich der Nrf2-Kerntranslokation vermutet werden, und scheint demnach für die weiteren Untersuchungen, der Aktivierung der Transkription und Enzymaktivität ausgewählter Phase-II-Enzyme, nicht vorzuliegen. Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit ließen erkennen, dass innerhalb des komplexen Substanzgemisches in Kaffee, die zellulären Wirkmechanismen nicht anhand einiger weniger Inhaltsstoffe vollständig beschrieben werden können.

Innerhalb der humanen Interventionsstudie II wurde Kaffee Brazil Blend auf seine Beeinflussung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 *in vivo* nach vierwöchigem Konsum untersucht, wobei eine signifikante Zunahme der Nrf2-Transkripte im Mittel aller Probanden sichtbar wurde. Damit scheint Kaffee Brazil Blend eine zentrales Schlüsselemente des körpereigenen, enzymatischen Abwehrmechanismus induzieren zu können. Für die Aktivierung der Nrf2-Gentranskription konnte Kaffee Brazil Blend *in vivo* im Vergleich zum CGA-Kaffee und NMP-Kaffee (humanen Interventionsstudie I) eine ausgeprägtere Wirkung erkennen lassen. Ein anderes Bild zeigte sich allerdings im Bereich der Induktion von Phase-II-Enzymen, wobei für CGA-Kaffee und NMP-Kaffee *in vivo* in vorangegangenen Untersuchungen eine Induktion der Gentranskripte ausgewählter Phase-II-Enzyme beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit für Kaffee Brazil Blend *in vivo* keine Steigerung der Transkription von Phase-II-Enzymen, der

untersuchten Gene, im Mittel aller Probanden gezeigt werden. Es stellte sich die Frage, ob Polymorphismen im Probandenkollektiv die Induzierbarkeit der Transkription der Phase-II-Enzyme beeinträchtigten. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer Genotypisierung der Probanden im Rahmen von Humanstudien. Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, weiterführende Untersuchungen mit einer erweiterten Genauswahl anzuschließen, um den chemopräventiven Beitrag von Kaffee Brazil Blend im Sinne einer Steigerung von antioxidativ wirkender Phase-II-Enzyme genauer einschätzen zu können.

Um die Untersuchungen der Bioaktivität von Kaffee zu ergänzen, wurde die Beeinflussung von antioxidativ-wirksamer Phase-II-Enzyme durch Kaffeeinhaltsstoffe *in vitro* betrachtet und in diesem Zuge gelang die genauere Charakterisierung von Trigonellin, das sich durch eine vielschichtige Wirkung im Bereich der Gentranskription darstellte. Die Einzelsubstanz Trigonellin sowie dessen Kombination mit NMP zeigten einen Rückgang der Gentranskriptgehalte für Phase-II-Enzyme. Hervorzuheben ist allerdings die Kombination von Trigonellin und CGA, die eine synergistische Wirkung mit einer signifikant gesteigerten Gentranskription an Phase-II-Enzymen und Nrf2 in konsumrelevanten Konzentrationen erkennen ließ. Diese induzierende Wirkung von CGA und Trigonellin beschränkte sich nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern konnte auch bei der Untersuchung der GST-Enzymaktivität bestätigt werden. Möglicherweise konnte durch die Koinkubation von CGA und Trigonellin eine zentrale Wirkstoffkombination innerhalb des Kaffees identifiziert werden, die einen wichtigen Beitrag zur chemopräventiven Wirkung von Kaffee, im Zusammenhang mit einer Aktivierung antioxidativ-wirksamer Phase-II-Enzyme, leisten könnte. Weitere Untersuchungen sollte angeschlossen werden, um die Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation zu bestätigen und deren Wirkung im komplexen Kaffeegetränk intensiver zu erforschen.

Abschließend betrachtet lässt die vorliegende Arbeit den Schluss zu, dass Kaffee für eine Steigerung der enzymatischen Abwehr mitverantwortlich sein kann und damit einen möglichen chemopräventiven Beitrag leistet. Weiterhin verdeutlichte sich, dass die Wirkungen einzelner Kaffeeinhaltsstoffe durch das komplexe Verhalten des reichhaltigen Substanzgemisches im Kaffee durch additive, antagonistische oder synergistische Effekte beeinflusst zu werden scheinen.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation standen drei Kaffees, die durch unterschiedliche Röstungen als Charakteristikum voneinander abweichende Gehalte der Leitverbindungen *n*-Chlorogensäure (CGA) und *N*-Methylpyridinium (NMP) enthielten. Ziel der Arbeit war, die Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch CGA-Kaffees, NMP-Kaffees und Kaffees Brazil Blend bzw. deren Extrakte sowie ausgewählten Kaffeeinhaltsstoffen zu untersuchen und den daran beteiligten zellulären Wirkmechanismus zu identifizieren.

Der Nrf2/ARE-Signalweg gilt als initialer Schritt in der Induktion der enzymatischen Abwehr gegenüber oxidativen Einflüssen, wobei der Transkriptionsfaktor Nrf2 nach dessen Translokation in den Zellkern an ARE bindet und so zur Transkription von Phase-II-Enzymen führen kann. Zwei NMP-reiche Kaffeeextrakte (KEs), bezeichnet als NMP-KE und BB-KE, induzierten eine potente Nrf2-Kerntranslokation nach 3 h in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29). Exemplarisch wurde durch NMP-KE gezeigt, dass eine Beteiligung der vorgeschalteten Signalelemente ERK1/2, PI3K und verschiedener Isoformen der PKC an der Aktivierung der Nrf2-Kerntranslokation wahrscheinlich ist. Mittels DCF-Assay ließ sich erkennen, dass nur marginale ROS-generierende Effekte von den zwei KEs ausgehen, so dass die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges vermutlich im Sinne einer chemopräventiven Wirkung und nicht durch vermehrte Bildung von Oxidationsprodukten erfolgt. NMP-KE und BB-KE enthalten ähnliche Gehalte an NMP, jedoch beinhaltet BB-KE mehr als dreimal so viel CGA. Im Vergleich zu NMP-KE ließ BB-KE eine deutliche potentere Wirkung auf den Anstieg des nukleären Nrf2-Gehaltes in HT29-Zellen erkennen, so dass additive Effekte der zwei Leitverbindungen möglich scheinen. NMP-KE und BB-KE bedingten darüber hinaus nach 3 h und 24 h eine Induktion der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme, was als Marker für eine Weiterleitung des Signales der Aktivierung von Nrf2 betrachtet werden kann. Insgesamt zeigte hierbei NMP-KE die potentere Wirkung auf Gentranskriptionsebene. Mehrfach konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass der Gehalt an NMP in den KEs zur Aktivierung der Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme einen Beitrag leistet. Allerdings unterschieden sich NMP-KE und BB-KE trotz gleicher NMP-Gehalte im Bezug auf das induzierte Genprofil, sowie in den Konzentrationen, in denen eine Wirkung sichtbar wurde. Daraus scheint ersichtlich, dass neben NMP weitere Kaffeeinhaltsstoffe die

Zellantwort maßgeblich modulieren. Einen Anstieg an Transkripten ausgewählter Phase-II-Enzyme nach 3 h und 24 h vermittelte ebenso CGA-KE, der hohe Gehalte an CGA aber relativ geringe Anteile an NMP besitzt. Im Unterschied zu den NMP-reichen KEs ließ CGA-KE allerdings keine Nrf2-translozierende Wirkung beobachten. Möglicherweise handelte es sich hierbei um eine Induktion der Gentranskription von Phase-II-Enzymen über Nrf2-unabhängige Signalwege. Als weiterer Parameter wurde die GST-Enzymaktivität untersucht. BB-KE ließ nach 48 h und CGA-KE nach 24 h und 48 h eine signifikante Aktivierung der GST-Enzymaktivität in HT29-Zellen beobachten, wobei sich eine Beteiligung von CGA, insbesondere für CGA-KE, abzeichnete. Im Gegensatz dazu führte NMP-KE sowie dessen charakteristischer Inhaltsstoff NMP in HT29-Zellen zu keiner Modulation der GST-Enzymaktivität, was möglicherweise auf antagonistisch wirksame Kaffeeinhaltsstoffe in NMP-KE zurückgeführt werden kann oder unter den in diesen Untersuchungen durchgeführten Bedingungen nicht zu detektieren war. *In vitro* bedingten die drei KEs ein unterschiedliches Wirkprofil der untersuchten Parameter der Nrf2-Kerntranslokation, Induktion der Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme und GST-Enzymaktivität. Dabei scheinen CGA-KE, NMP-KE und BB-KE eine mögliche gesundheitsfördernde Wirkung, im Sinne einer Verbesserung der enzymatischen Abwehr, zu vermitteln.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Beeinflussung der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 durch Kaffees Brazil Blend *in vivo* untersucht. In der humanen Interventionsstudie II führte der vierwöchige Konsum des Kaffees Brazil Blend im Mittel aller Probanden zu einer signifikanten Transkriptzunahme von Nrf2, was eine Aktivierung des körpereigenen, enzymatischen Abwehrsystems bedeuten könnte. Als Marker einer Signalweiterleitung wurde daraufhin die Beeinflussung der Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme nach Konsum von Brazil Blend untersucht, wobei sich innerhalb des Probandenkollektives eine heterogene Wirkung zeigte. So konnte im Mittel aller Probanden keine Zunahme der Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme festgestellt werden. Als Erklärungsansatz dieser unterschiedlichen Wirkung auf den Konsum von Kaffee Brazil Blend wurden genetische Polymorphismus der einzelnen Probanden diskutiert. Zusätzliche Untersuchungen mit einer Genotypisierung des Probandenkollektives scheinen notwendig, um die Wirkung des Kaffee Brazil Blend *in vivo* genauer einordnen zu können.

Bei der Identifizierung bioaktiver Kaffeeinhaltsstoffe konnte Trigonellin besser charakterisiert werden. Trigonellin induzierte in HT29-Zellen im pM bis nM Konzentrationsbereich eine

signifikante Abnahme des Gesamt-Nrf2-Gehaltes, was sich auch auf Transkriptionsebene durch eine Abnahme an Transkripten ausgewählter Phase-II-Enzyme widerspiegelte. Die antioxidative Wirkung von NMP, im Sinne einer gesteigerten Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme, konnte durch die Koinkubation mit Trigonellin nicht mehr erzielt werden. Im Gegensatz dazu war durch die Koinkubation von CGA und Trigonellin eine synergistische Wirkung zu beobachten mit dem Resultat einer signifikant gesteigerten Transkriptzunahme von GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2. Trigonellin stellte sich demnach als vielschichtiger Modulator auf Transkriptionsebene dar, der einerseits als Einzelsubstanz und in Kombination mit NMP eine Verminderung, andererseits aber im Zusammenspiel mit CGA eine potente Induktion ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 erkennen ließ.

Die Studienkaffees CGA-Kaffee, NMP-Kaffee [Dissertation Böttler, 2009] und Kaffee Brazil Blend zeigten eine Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 *in vivo*, wobei deren Effekte anhand der vorliegenden Untersuchungen noch nicht eindeutig auf einzelne Kaffeeinhaltsstoffe zurückgeführt werden konnten. Daher wurden in weiteren Versuchen konsumrelevante Konzentrationsbereiche gewählt, um so eine bessere Annäherung an die *in vivo* Situation zu erhalten. Folglich wurden HT29-Zellen mit CGA, NMP und Trigonellin in Konzentrationen inkubiert, wie sie hypothetisch nach Konsum von NMP-Kaffee bzw. CGA-Kaffee lokal an den Darmepithelzellen vorliegen könnten. Es zeigte sich, dass insbesondere die Kombination von CGA und Trigonellin die Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 zu aktivieren vermag. Möglicherweise kann lokal an den Darmepithelzellen, durch den Konsum von CGA-Kaffee und NMP-Kaffee, eine Aktivierung der enzymatischen Abwehr vermittelt werden, unter maßgeblicher Beteiligung der Kombination von CGA und Trigonellin. Als weiterer Schritt wurden HT29-Zellen mit CGA, NMP und Trigonellin in Konzentrationen inkubiert, die hypothetisch nach Kaffeekonsum im Blutplasma auftreten könnten, um die systemische Wirksamkeit zu überprüfen. Die Inkubation der Einzelsubstanzen ließ keine gesteigerte Transkription erkennen, allerdings zeigte sich eine signifikante Zunahme der Transkripte für GSTT1, HO1, NQO1 und Nrf2 durch die Koinkubation der Kaffeeinhaltsstoffe. Hervorzuheben war hierbei, dass diese Wirkung besonders deutlich durch die Kombination von CGA und Trigonellin, im Vergleich zur Koinkubation der zwei Leitverbindungen NMP und CGA, sichtbar wurde. Diese Ergebnisse scheinen Hinweise darauf zu geben, dass die Kombination von CGA und Trigonellin die Wirkung von CGA-Kaffee und NMP-Kaffee auf die Transkription von Phase-

II-Enzymen und Nrf2 *in vivo* mit hervorrufen könnte. Die drei Kaffeeinhaltsstoffe NMP, CGA und Trigonellin wurden ebenso in hypothetisch errechneten Plasmakonzentrationen in HT29-Zellen koinkubiert, wie sie nach dem Konsum des Kaffees Brazil Blend vorliegen könnten. Hierbei konnte eine potente, synergistische Wirkung auf die Transkription von HO1, NQO1, GSTT1 und Nrf2 beobachtet werden.

Diese *in vitro* Ergebnisse mit BB-KE konnten jedoch nur teilweise im Rahmen der humanen Interventionsstudie II durch den vierwöchigen Konsum von Kaffee Brazil Blend *in vivo* bestätigt werden. Wie bereits erwähnt, zeigte sich zwar im Mittel aller Probanden eine signifikante Transkriptzunahme für Nrf2, allerdings nicht für die Gene HO1, NQO1 und GSTT1. Die Wirkung von Kaffee Brazil Blend *in vivo* auf die Transkripte der hier untersuchten Phase-II-Enzyme könnte demnach neben CGA, NMP und Trigonellin von weiteren, möglicherweise antagonistisch wirkenden Kaffeeinhaltsstoffe moduliert werden. Neben der Gentranskription wurde auch die Modulation der GST-Enzymaktivität in HT29-Zellen untersucht. Dabei wurden CGA, NMP und Trigonellin in Konzentrationen inkubiert, die hypothetisch nach dem Konsum von Brazil Blend im Plasma erreicht werden könnten um Aufschlüsse über die systemische Wirksamkeit zu erlangen. In Analogie zu den Ergebnissen auf Transkriptionsebene, zeigte sich eine Steigerung der GST-Enzymaktivität durch Kombination der ausgewählten Kaffeeinhaltsstoffe. Hervorzuheben ist dabei, ein deutlich potenterer Anstieg der GST-Enzymaktivität durch die Koinkubation von CGA und Trigonellin, im Vergleich zur gemeinsamen Inkubation mit NMP.

Zusammenfassend scheinen die untersuchten Kaffees eine gesundheitsfördernde Wirkung im Sinne einer Steigerung der enzymatischen Abwehr vermitteln zu können. CGA und Trigonellin konnten als wichtige Wirkstoffkombination identifiziert werden, die in plasmarelevanten Konzentrationen zu einer Steigerung der Transkription ausgewählter Phase-II-Enzyme und Nrf2 als auch der GST-Enzymaktivität beiträgt und infolgedessen für den Kaffeekonsumenten von besonderer Bedeutung zu sein scheint. Die Untersuchungen dieser Arbeit verdeutlichten weiterhin, dass synergistische, antagonistische und additive Einflüsse durch das komplexe Zusammenspiel mehrerer Kaffeeinhaltsstoffe eine zentrale Rolle bei der Identifizierung bioaktiver Wirkmechanismen von Kaffee spielen.

6 Material und Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 *Verwendete Zelllinie*

HT29-Zellen

Die Tumorzelllinie HT29 wurde 1964 aus einem primären Kolonkarzinom einer 44 Jahre alten Frau kaukasischen Typs etabliert. Die adhärenenten, epithelartigen Zellen wachsen als Monolayer in großen Kolonien. Der Karyotyp der Zelle ist hypertriploid mit 17,5 % Polyploidie. Die Verdopplungszeit beträgt 40-60 h [DSMZ]. Die Kultivierung erfolgt in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 4,0 mM L-Glutamin), mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS und 1 % PS wobei im Brutschrank 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit gegeben sind.

6.1.2 *Medienwechsel bei Monolayerkulturen*

Der im Medium verwendete Indikator Phenolrot zeigt mit der Zeit einen Farbumschlag von rot nach gelb, der auf einem Anstieg des pH-Wertes beruht. Dieser kommt durch die Anreicherung von Abfallprodukten im Medium zustande und geht mit einer Abnahme von Nährstoffen einher. Während einer subkonfluenten Wachstumsphase wird das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt [Lindl, 2002].

6.1.3 *Passagieren von Monolayerkulturen*

Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums bilden tumor- und transformierte Zelllinien sog. Second bzw. Polylayer aus wodurch aufgrund einer zu hohen Zelldichte die Proliferationsrate der Zellen absinkt. Infolgedessen kann sich der Zellrasen nach Erreichen der Maximaldichte vom Flaschenboden ablösen und die Zellen sterben ab. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Zelldichte durch das „Passagieren“ zu verdünnen und neu zu kultivieren.

Durchführung

- Das Medium wird mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt.
- Die Zellen werden mit ca. 3 ml PBS gespült, welches anschließend wieder abgezogen wird.
- Zum Ablösen des Zellrasens werden ca. 2,5 ml Trypsinlösung dazu gegeben und die Kulturflasche für 2 min (HT29–Zellen) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
- Durch leichtes Schlagen an die Seiten der Kulturflasche lösen sich die Zellen vom Flaschenboden ab.
- Die Trypsinwirkung wird durch Zusatz von 10 ml 10 % FKS-haltigem Medium abgestoppt.
- Nach mehrmaligem resuspendieren wird die Lösung komplett in ein steriles Tube überführt.
- Ca. 1 ml dieser Lösung wird wieder zurück in die Kulturflasche gegeben, mit 40 ml 10 % FKS-haltigem Medium versetzt und die Zellen im Brutschrank weiterkultiviert.
- Wurden die Zellen bereits zweimal in derselben Flasche passagiert, muss eine neue, sterile Kulturflasche verwendet werden.

Die physiologischen Eigenschaften von Monolayerkulturen können durch hohe Passagezahlen stark verändert werden. Aus diesem Grund sollte bei einer entsprechend hohen Passagenzahl die Zelllinie verworfen und neue Zellen in Kultur genommen werden [Lindl, 2002].

Reagenzien

10x PBS (phosphate buffered saline)

1710 mM NaCl

100 mM Na₂HPO₄

34 mM KCl

18 mM KH₂PO₄

Mit H₂O_{bidest.} auffüllen, pH 7,4. Das 1:10 verdünnte PBS (1 x) autoklavieren.

Trypsin-Lösung

500 mg Trypsin (Rinderpankreas, 3,6 U/mg)

250 mg EDTA

100 ml 10 x PBS

Mit H₂O_{bidest.} auf 1000 ml auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert überprüfen (7,0-7,4), steril filtrieren (Porengröße 0,22 µm) und zu je 5 ml aliquotieren. Lagerung bei –20°C.

6.1.4 Lagerung von Zellen

Zellen können langfristig bei –80°C gelagert werden. Hierzu muss allerdings ein Frostschutzreagenz wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt werden, um eine Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas zu verhindern. Dimethylsulfoxid bindet und ersetzt das Zellwasser und wirkt so als ein Frostschutzmittel [Lindl, 2002].

Durchführung

- Trypsinierung der Zellen wie beim Passagieren (6.1.3).
- FKS und DMSO im Verhältnis 1:2,3 zusammenpipettieren.
- Je 500 µl dieser Mischung in Kryoröhrchen vorlegen.
- Je 1 ml Zellsuspension zügig hinzugeben.
- Einfrieren bei –20°C für 24 h.
- Abschließende Langzeitlagerung bei –80°C im Biofreezer.

6.1.5 Auftauen von Zellen

Durchführung

- Zellen dem Biofreezer entnehmen und zügig bei 37°C im Wasserbad auftauen.
- Umgehend die 10-fache Menge an 20 % FKS-haltigem Medium zu den Zellen geben.
- Die Zellsuspension bei RT und 130 x g für 5 min zentrifugieren.
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 5 ml 20 % FKS-haltigem Medium resuspendiert.

- Die Zellsuspension wird in eine kleine Kulturflasche (25 cm²) überführt und weitere 5 ml 20 % FKS-haltiges Medium hinzugefügt.
- Die Kultivierung findet bei 37°C im Brutschrank statt. Bei ausreichender Zelldichte werden die Zellen passagiert und in 10 % FKS-haltigem Medium weiterkultiviert.

6.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer), wobei eine definierte Menge an angefärbter Zellsuspension lichtmikroskopisch ausgezählt wird [Lindl, 2002]. Die Neubauerkammer besteht aus neun großen Quadraten, welche je eine Fläche von 1 mm² besitzen. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl. Es werden vier Eckquadrate ausgezählt und aus der Zellzahl der vier Eckquadrate der Mittelwert gebildet. Dieser wird mit dem Verdünnungsfaktor und dem Volumenfaktor (10000) multipliziert, so dass man die Anzahl an Zellen/ml erhält. Das Anfärben der Zellen erfolgt mithilfe des Farbstoffes Trypanblau, welcher durch defekte Zellmembranen toter Zellen ins Zytosol dringt und diese Zellen blau färbt. Lebende Zellen sind hingegen lichtmikroskopisch als weiße Punkte sichtbar.

Durchführung

- Trypsinierung der Zellen wie beim Passagieren (6.1.3).
- Zellsuspension mit der entsprechenden Menge Trypanblau resuspendieren, (Verhältnis Trypanblau : Zellsuspension → 5:1).
- Mit einer Eppendorfpipette die gefärbte Zellsuspension am Rand der Zählkammer ansetzen und soviel Lösung aufgeben, bis der Zwischenraum zwischen Zählkammer und Deckglas gleichmäßig befüllt ist.
- Zählkammer unter Lichtmikroskop legen und eine Einstellung wählen, welche die Kammer gut sichtbar werden lässt. Es werden vier Eckquadrate ausgezählt (Abbildung 50).

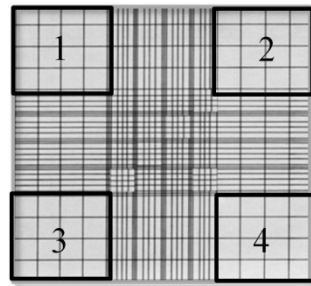


Abbildung 50: Neubauer Zählkammer [modifiziert nach Lindl, 2002]. In den vier mal vier Eckquadraten werden die lebenden Zellen gezählt und die Zellzahl pro ml bestimmt.

6.1.7 Mykoplasmascreening

Bei Mykoplasmen handelt es sich um die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryonten (0,2–2 μm), welche in den Zellstoffwechsel eingreifen können. Da sie aufgrund ihrer Größe den Sterilfilter passieren können, ist es notwendig in einem Zellkulturlabor ein regelmäßiges Mykoplasmascreening durchzuführen.

Durchführung

- Zellen passagieren (6.1.3) und Zelllysat auf einen sterilen Objektträger in einer mittleren Pertischale ($d=10\text{ cm}$) mit 10 ml 10 % FKS-haltiges Medium geben.
- Für 48 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit anwachsen lassen.
- Objektträger mit Methanol (-20°C) abspülen und zur vollständigen Fixierung der Zellen den Objektträger im Methanolbad lagern (mindestens 15 min).
- Anfärben des Objektträgers mit DAPI/SR 101-Färbelösung.

Bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen Zytoplasmaproteine rot und Zellkern/DNA blau. Da Mykoplasmen zum größten Teil aus DNA bestehen, erkennt man sie als gleichmäßige, hell leuchtende Punkte im Inter- und Intrazellulärraum [Lindl,2002].

Reagenzien

DAPI/SR 101-Lösung

200 mM Tris/HCl (pH 7,6)

200 mM NaCl

8 μ M DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)

50 μ M SR 101 (Sulforhodamin 101)

In H₂O_{bidest.} lösen

6.2 Untersuchungen zur Wachstumshemmung (SRB-Assay)

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay ermöglicht die Bestimmung der zellwachstumshemmenden Wirkung von Testsubstanzen. Die mit Testsubstanz inkubierten Zellen werden hierzu mit Sulforhodamin B angefärbt, das unter mild sauren Bedingungen an basische Aminosäuren der Zellproteine bindet. Der Farbstoff löst sich im basischem Mileu (pH 10) wieder ab und kann absorptionsphotometrisch bei 570 nm vermessen werden.

Durchführung

- 8.000 Zellen pro Vertiefung werden in einer 24-Lochplatte ausgestreut und für 48 h in serumhaltigem Medium (10 % FKS) im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit anwachsen lassen.
- Inkubation der Zellen mit in DMSO (Endkonzentration 1 %) gelöster Testsubstanz für 24 h unter Zusatz von 100 U/ml Katalase.
- Abstoppen der Substanzinkubation mit 100 μ l Trichloressigsäure (50 %) je Vertiefung.
- Fixierung der Zellen am Plattenboden durch Lagerung bei 4°C für mindestens 1 h.
- Vorsichtig 4 x mit H₂O_{bidest.} waschen um Zell- und Mediumreste zu entfernen.
- Trocknung der 24-Lochplatte bei 37°C.
- Anfärbung der Zellen mit 250 μ l 0,4 %iger SRB-Lösung für mindestens 30 min im Dunkeln.
- 2 x mit H₂O_{bidest} waschen, anschließend 2 x mit 1 %iger Essigsäure spülen.

- Trocknung der 24-Lochplatte bei 37°C.
- Lösen des Farbstoffes mit Tris-Base (pH = 10) und absorptionsphotometrisch im Multiplattenleser bei 570 nm vermessen.

Die Auswertung der Daten erfolgt als Test over Control [T/C]-Wert in Bezug auf den Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle, der 100 % gesetzt wird.

Reagenzien

Trichloressigsäure (TCA)	50 %ig in H ₂ O _{bidest.}
Essigsäurelösung	1 %ig in H ₂ O _{bidest.}
SRB-Lösung	0,4 %ig in 100 ml 1 %iger Essigsäurelösung
Tris-Base (pH 10)	10 mM Tris in H ₂ O _{bidest.}

6.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung

Um die Zellviabilität bestimmen zu können werden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und anschließend mit dem Farbstoff Trypanblau angefärbt. Geschädigte Zellen können den Farbstoff nicht mehr aktiv aus der Zellinneren transportieren und erscheinen so unter dem Mikroskop blau. Die Zellviabilität berechnet sich anhand der Auszählung unter der Neubauer Zählkammer, wobei ein Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen gebildet wird.

Durchführung

- $0,8 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale (d=6 cm) aussäen und für 48 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren.
- Inkubation der Zellen mit in DMSO (Endkonzentration 1 %) gelöster Testsubstanz für 3 h unter Zusatz von 100 U/ml Katalase.
- Nach Beendigung der Inkubationszeit Medium abkippen und mit 2 ml PBS (37°C) nachspülen.

- 500 µl vorgewärmte Trypsinlösung hinzufügen und für 9 sec. im Brutschrank belassen.
- 1 ml serumhaltiges Medium (10 % FKS) hinzugeben um die Trypsinwirkung abzustoppen.
- Im Verhältnis 1:1 Zelllösung und Trypanblau mischen und Zellen unter dem Mikroskop mithilfe der Neubauer Zählkammer auszählen.

6.4 Glutathion-S-Transferase (GST)-Enzymaktivität

Das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert die Übertragung der Thiolgruppe des Glutathion auf elektrophile Moleküle. Die Bestimmung der GST-Enzymaktivität basiert auf der GST-katalysierten Reaktion zwischen Glutathion (GSH–reduzierte Form) und dem GST Substrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) zum entsprechenden Thioetherkonjugat (Abbildung 51). Die Konjugatbildung ist proportional zur Enzymaktivität und kann zur photometrischen Aktivitätsbestimmung der GST herangezogen werden, indem die Bildung des Konjugates beim Absorptionsmaximum von 340 nm kinetisch verfolgt wird. Die Enzymaktivität bezieht sich hierbei auf alle im Zytosol enthaltenen GST-Isoformen.

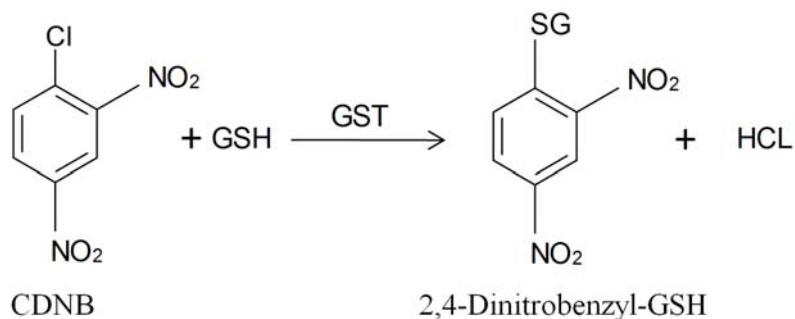


Abbildung 51: Reaktionsgleichung der von GST katalysierten Umsetzung von CDNB. CDNB: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol; GSH: Glutathion; GST: Glutathion-S-Transferase.

6.4.1 Zellaufarbeitung

Durchführung

- 1×10^6 Zellen pro Petrischale (d=10 cm) aussäen und für 4 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren.
- Inkubation der Zellen mit in DMSO (Endkonzentration 0,1 %) gelöster Testsubstanz für 24 h, 48 h und 72 h unter Verwendung von serumhaltigem Medium (10 % FKS) und 100 U/ml Katalase (Kein Katalasezusatz: Inkubation mit *N*-Methylpyridinium (NMP) als Reinsubstanz).
- Medium abkippen, zweifach mit PBS (37°C) abspülen und Mediumreste absaugen.
- 1 ml Trypsin je Petrischale hinzufügen, 2 ½ min im Brutschrank inkubieren und mit je 1 ml serumhaltigen Medium (10 % FKS) die Trypsinwirkung inaktivieren.
- Zellen vorsichtig von der Petrischalenoberfläche abspülen und mit 1 ml serumhaltigen Medium (10 % FKS) nachspülen.
- Ca. 6×10^6 Zellen pro Lösung auf zwei in Eis vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilen und 10 min bei 500 rcf und 4°C zentrifugieren.
- Medium abziehen und pro Eppendorfgefäße 1 ml PBS (4°C) resuspendieren
- 10 min bei 500 rcf und 4°C zentrifugieren.
- PBS abziehen und Pellet im Biofreezer über Nacht zur Lyse stellen.
- Nach der Zelllyse wird das Pellet auf Eis aufgetaut und mit 500 µl Kaliumphosphatpuffer resuspendiert.
- 10 min bei 500 rcf und 4°C zentrifugieren.
- Der Überstand entspricht der zytosolischen Lösung und wird zur Umsetzung mit dem Substrat verwenden.

6.4.2 Substratumsetzung

Durchführung

- Vorinkubation von 660 µl Kaliumphosphatpuffer, 40 µl GSH-Lösung und 80 µl zytosolischer Lösung bei 37°C, 300 rpm für 5 min.
- Zu jedem Ansatz 20 µl CDNB geben, vortexen und von dieser Lösung 200 µl in ein Vertiefung einer 96-Well Platte pipettieren.

- Absorptionsphotometrisch im Multiplattenleser bei 340 nm messen, wobei für 5 min alle 20 sec eine Messung durchgeführt wird.
- Anschließend aus der zytosolischen Lösung eine Proteinbestimmung nach der Methode nach Bradford (6.5.3) durchführen.

Die Auswertung erfolgt anhand der Auftragung der Extinktion gegen die Messzeiten. Durch die daraus abgeleitete Extinktionsdifferenz $\Delta E / \text{min}$ kann anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Enzymaktivität berechnet werden, wobei der Extinktionskoeffizient des GSH-Konjugates $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ beträgt und eine „path length“ als Lichtweg von 0,45 cm eingesetzt wurde. Die Enzymaktivität wird in $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein angegeben.

Reagenzien

1 x PBS	siehe 6.1.3
Trypsin	siehe 6.1.3
Kaliumphosphatpuffer	Herstellung einer 100 mM K_2HPO_4 und pH 7,4 durch dazugeben von 100 mM KH_2PO_4 einstellen
GSH-Lösung	20 mM GSH in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (frisch ansetzen, auf Eis lagern)
CDNB-Lösung	40 mM in Ethanol (frisch ansetzen, vor Licht schützen)

6.5 Untersuchung der Nrf2 Kerntranslokation

Die Untersuchung der Translokation von Nrf2 in den Zellkern erfolgt mithilfe der Western Blot Analyse, welche ein elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran darstellt. Die zu untersuchenden Proteine werden zuvor in eine zytosolische- sowie Kernfraktion aufgetrennt, mittels Proteinbestimmung nach Bradford quantitativ erfasst und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Nach einer Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt die immunologische Detektion, wobei spezifische Antikörper den Anteil von Nrf2 in den zwei zuvor getrennten Fraktionen identifizieren.

6.5.1 Zellinkubation

$4,5 \times 10^6$ Zellen werden in einer Petrischale ($d=15\text{ cm}$) ausgestreut und für 72 h zum Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % in 20 ml serumhaltigem Medium (10 % FKS) bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank anwachsen gelassen. Die Substanzinkubation erfolgt mit DMSO (Endkonzentration 1 %) als Lösungsmittel in 10 ml serumfreiem Medium für 3 h. Um eine zellkulturspezifische H_2O_2 Bildung infolge von Artefaktbildungen der Testsubstanzen mit Mediumbestandteilen zu vermeiden, werden dem Kulturmedium 100 U/ml Katalase zugesetzt.

6.5.2 Gewinnung der Zellproteine

Durchführung

- Nach Beendigung der Inkubationszeit Petrischalen auf Eis setzen, Medium entfernen und zweimal mit 4 ml PBS (4°C) nachspülen.
- Mithilfe von 700 μl PBS Zellen abschaben.
- Zentrifugation bei $800 \times g$ für 5 min bei 4°C .
- Zellpellet mit 200 μl Puffer A resuspendieren und 15 min auf Eis inkubieren.
- 17 μl Nonidet P40 hinzugeben und 5 sec vortexen.
- Zentrifugation bei $800 \times g$ für 10 min bei 4°C .
- Überstand entspricht zytosolischer Fraktion, welche auf Eis gelagert wird.
- Zellpellet mit 65 μl Puffer B resuspendieren und 15 min auf Eis inkubieren, wobei alle 2 min für 10 sec gevortext wird.
- Zentrifugation bei $20.000 \times g$ für 10 min bei 4°C .
- Überstand entspricht Kernfraktion, welcher auf Eis gelagert wird.

Reagenzien

Puffer A

10 mM Hepes, $\text{pH}=7,9$

10 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

Auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auffüllen. Lagerung bei 4°C .

Direkt vor Gebrauch dazugeben

1 μ M DTT

1 μ M Protease Inhibitor Mix (Roche, 2 ml H₂O_{bidest.} /Tablette)

Puffer B

20 mM Hepes, pH=7,9

0,4 M NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

Auf 100 ml mit H₂O_{bidest.} auffüllen und bei 4 °C lagern

Direkt vor Gebrauch dazugeben

1 μ M DTT

1 μ M Protease Inhibitor Mix (Roche, 2 ml H₂O_{bidest.} /Tablette)

6.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch die Methode nach Bradford können Proteinmengen von 100 ng-1 μ g quantitativ nachgewiesen werden. Dabei kommt es zur Komplexbildung zwischen dem anionischen Farbstoff Coomassie®-Brillantblau G250 und den kationischen bzw. unpolaren Seitengruppen der Aminosäuren. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von $\lambda = 465$ nm des freien Farbstoffes auf $\lambda = 595$ nm des gebundenen Farbstoffes. Um anhand der Absorptionswerte die Proteinmenge bestimmen zu können wird eine Standardreihe von 0,2- 1,6 mg/ml aus BSA (2 mg/ml) mitgeführt. Nach Abzug des Blindwertes (H₂O_{bidest.} bzw. Puffer) kann schließlich die Proteinmenge durch lineare Regression berechnet werden.

Durchführung

- 10 μ l der BSA-Standardlösungen, der Kontrollen (H₂O_{bidest.} bzw. Puffer) sowie der mit H₂O_{bidest.} verdünnten Proben (1:10) in ein Reaktionsgefäß vorlegen.
- Je 1 ml Bradfordreagenz hinzufügen und vortexen.
- Je Ansatz 3 x 200 μ l in eine 96-Loch Platte pipettieren und bei 592 nm im Multiplattenlesegerät vermessen.

Reagenzien

Bradford Reagenz

100 mg Coomassie®-Brillantblau G250

50 ml EtOH

100 ml H₃PO₄ (85%)

Auffüllen auf 1000 ml mit H₂O_{bidest.}, vor Gebrauch für vier Wochen im Dunkeln lagern.

6.5.4 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine werden mittels diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (diskSDS-Page) in einem Vertikalsystem nach Laemmli aufgetrennt. Dabei lagert sich Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Detergenz an die Proteine, wodurch es zum Auflösen von Tertiär- und teilweise Sekundärstrukturen kommt und die Proteinkette eine negative Überschussladung erhält (Abbildung 52). Durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol und anschließendes Erhitzen auf 95°C wird zusätzlich eine Spaltung der Disulfidbrücken und somit eine vollständige Denaturierung erreicht. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Proteine durch ein Polyacrylamidgel zur Anode, wobei die Proteine mit dem kleinsten Molekulargewicht die schnellste Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Durch das Mitführen von Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten können die aufgetrennten Proteine charakterisiert werden.

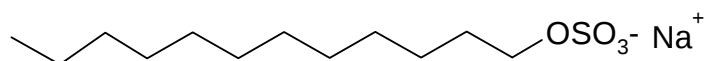


Abbildung 52: Struktur von Natriumdodecylsulfat (SDS).

Tabelle 17: Pipettierschema für ein Trenngel und ein Sammelgel.

	Trenngel		Sammelgel
	(10 %)		(4 %)
H ₂ O _{bdest.}	2,05 ml	H ₂ O _{bdest.}	1,2 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,23 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
Acrylamid (30 %)	1,64 ml	Acrylamid (30 %)	0,25 ml
SDS (10 %)	49,2 µl	SDS (10 %)	20 µl
APS (10 %)	24,6 µl	APS (10 %)	20 µl
TEMED	2,46 µl	TEMED	2 µl

Durchführung

- Glasplatten und Abstandshalter mit 70 %igem Ethanol entfetten, entsprechende der Anleitung zusammensetzen und in den Gießstand einbauen.
- Trenngel (Tabelle 17) zwischen die zwei Glasplatten pipettieren und mit n-Butanol überschichten um Luftsauerstoff fernzuhalten und eine einheitliche Gelgrenze zu erreichen.
- Nach Polymerisieren des Trenngels (ca. 45 min) n-Butanol abgießen, nichtpolymerisierte Gelreste mit H₂O_{bdest.} ausspülen und Wasserreste mit Papiertuch entfernen.
- Entfetteter Kamm zwischen die Glasplatten setzen und mit Sammelgel (Tabelle 17) aufgießen.
- Nach Polymerisation des Sammelgels (ca. 20 min) Kamm entfernen, ausgebildete Probetaschen mit H₂O_{bdest.} ausspülen und mithilfe einer Wasserstrahlpumpe Wasserreste entfernen.
- Die auf Eis gelagerten Proben werden mit H₂O_{bdest.} auf einen Proteingehalt von 240 µg/ml eingestellt, mit SDS-Probenpuffer (6x) gemischt und für 5 min bei 900 rpm und 95°C im „Thermocycler“ denaturiert.
- Auftragung der abgekühlten Proben (60 µg Gesamtprotein/Tasche) sowie 8 µl des Proteinmolekulargewichtsstandard (See Blue Plus 2/SpektraTMMulticolor).

- Auffüllen der Geltaschen sowie der Elektrophoresekammer mit 1 x SDS Laufpuffer und starten der Elektrophorese bei 100 V, wobei nach eintreten der Proteine in das Trenngel die Spannung auf 140 V erhöht wird.

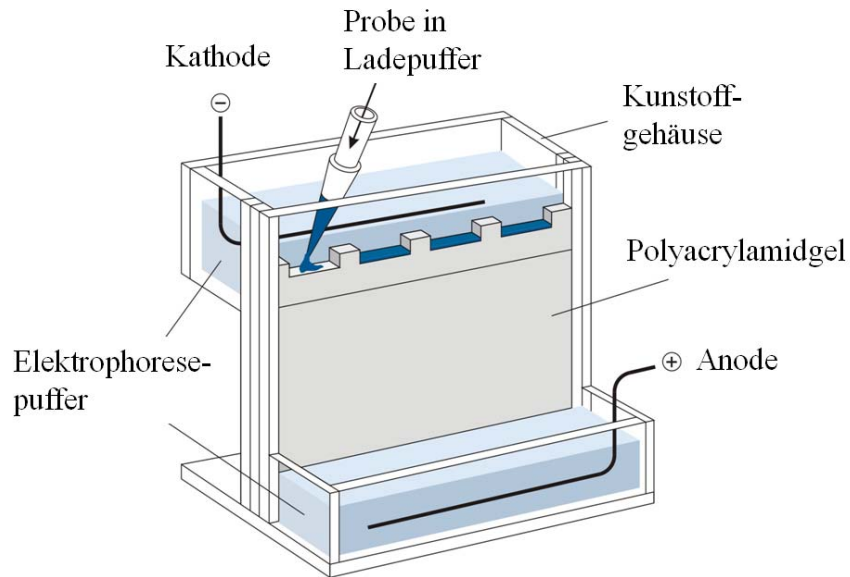


Abbildung 53: Darstellung des Elektrophoresesystemes.

Reagenzien

10 x SDS-Laufpuffer

2 M Glycin
250 mM Tris/HCl (pH 8,3)
1 % SDS

Mit H₂O_{bidest.} (2 l) auffüllen.

Acrylamid (30 %)

Wässrige Lösung mit 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid.

6 x Probenpuffer

50 ml 0,5 M Tris (pH 6,8)
40 ml Glycerin
1,24 g SDS
0,16 g Bromphenolblau

Auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auffüllen, kurz vor Gebrauch 5 % (v/v), entspricht 52,6 μl , β -Mercaptoethanol zugeben.

Tris/HCl für Trenngel

1,5 M Tris/ HCl (pH 8,8)

Tris/HCl für Sammelgel

0,5 M Tris/ HCl (pH 6,8)

Ammoniumperoxidsulfat (APS)-Lösung

10 % (w/v) APS in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

SDS-Lösung

10 % (w/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

6.5.5 Western Blot

Um nach der Elektrophorese die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren, wird ein Elektro-Blotting durchgeführt. Hierbei wurde im Laufe dieser Arbeit von einem „semi-dry“ Blot zu einem „wet“ Blot gewechselt.

Durchführung

- Whatman-Paper und Nitrozellulosemembran in 1 x Blottingpuffer äquilibrieren.
- Nach der Elektrophorese wird mit Hilfe der Spacer das Trenngel von der Glasplatte gelöst, in 1 x Blottingpuffer gegeben und für den Western Blot gemeinsam mit den Whatman-Papieren entsprechend der verwendeten Blotmethode aufeinander gelegt.
- Beim „semi-dry“ Blot drei Whatman-Paper auf die Anodenseite legen, die Nitrozellulosemembran mit abschließend dem Gel darauf platzieren und nochmals mit drei Whatman-Paper bedecken. Mit der Kathodenseite des Elektroblotters zuschließen (Abbildung 54).
- Beim „wet“ Blot wird ein „Sandwich“ gebildet. Der Beginn macht an der Anodenseite ein Faser-Pad, auf welches ein Whatman-Paper gelegt wird. Darauf wird die Nitrozellulosemembran und im nächsten Schritt das Gel platziert. Zum Abschluss folgt ein weiteres Whatman-Paper sowie ein zweites Faser-Pad. Das fertige „Sandwich“ in die Gelkassette legen, in den „wet“ Blotter einhängen und den Tank mit Blottingpuffer befüllen (Abbildung 55).

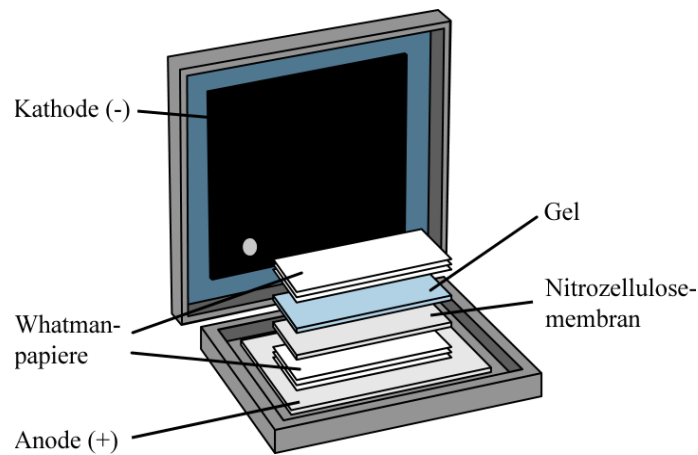


Abbildung 54: Aufbau eines „semi-dry“ Blotters.

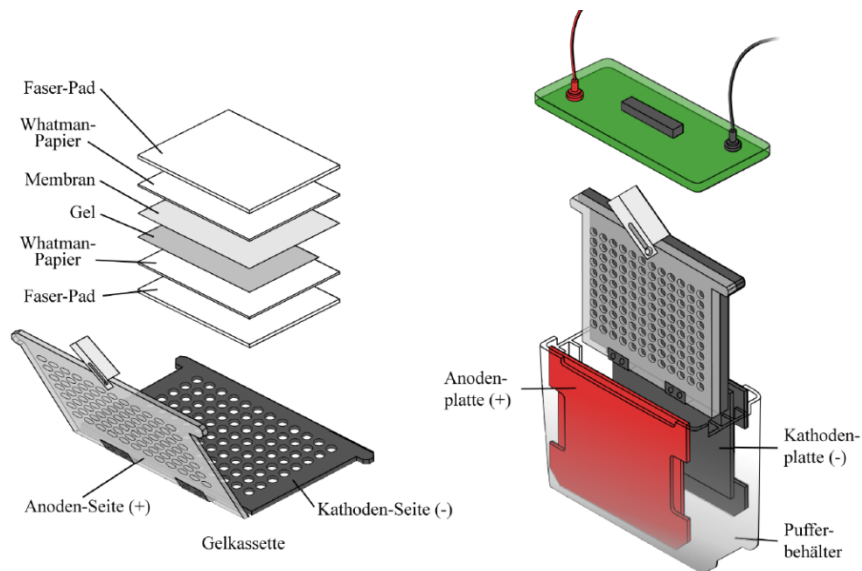


Abbildung 55: Aufbau eines „wet“ Blotters.

- Bei beiden Blotmethoden ist darauf zu achten, dass keine Luftblase zwischen den Schichten auftreten.
- Blotten bei 140 mA pro Membran für ca. 90 min.
- Um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken, wird die geblottete Membran für ca. 1 h in Blockingpuffer geschwenkt.

Reagenzien

2 x Blottingpuffer

78 mM Glycin

96 mM Tris

0,074 % (w/v) Methanol

Auffüllen auf 2 l mit H₂O_{bidest.}

Blockingpuffer

5 % Milchpulver in 1 x TBS mit 0,1 % Tween®-20 lösen.

20 x TBS

2,6 M NaCl

0,4 M Tris/HCl (pH 7,6)

Mit H₂O_{bidest.} auf 2l auffüllen, pH 7,6 einstellen. Vor Gebrauch 1:20 verdünnen.

6.5.6 Detektion mittels spezifischer Antikörper

Zur Detektion der zu untersuchenden Proteine auf der Membran wird eine immunchemische Reaktion durchgeführt. Dabei bindet ein Primärantikörper spezifisch an das gesuchte Protein. Durch Zusatz eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, können die Proteine durch eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert werden (Abbildung 56 und Abbildung 57).

Durchführung

- Inkubation mit in Milchpulver gelöstem Primärantikörper über Nacht bei 4°C.
- Die Membran wird 3 x hintereinander in Waschlösung für je 5 min gewaschen.
- Der mit HRP konjugierte Sekundärantikörper wird ebenfalls in Milchpulver gelöst.
- Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgt für 1-2 h bei RT.
- 3 x für je 5 min waschen.
- Inkubation mit LumiGlo®-Lösung für 1 min.

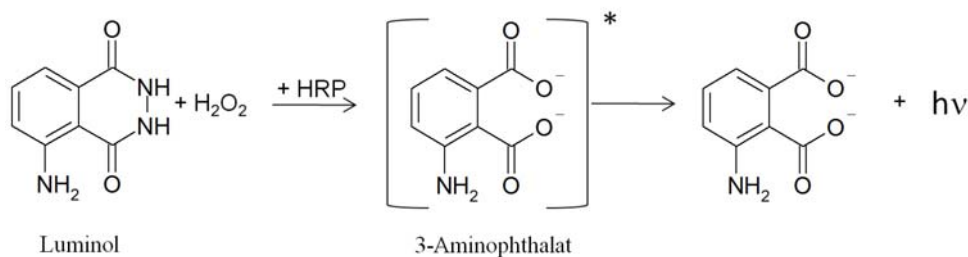


Abbildung 56: Reaktion des Luminols. HRP: „horseradish“ Peroxidase; hv: Lumineszenzsignal.

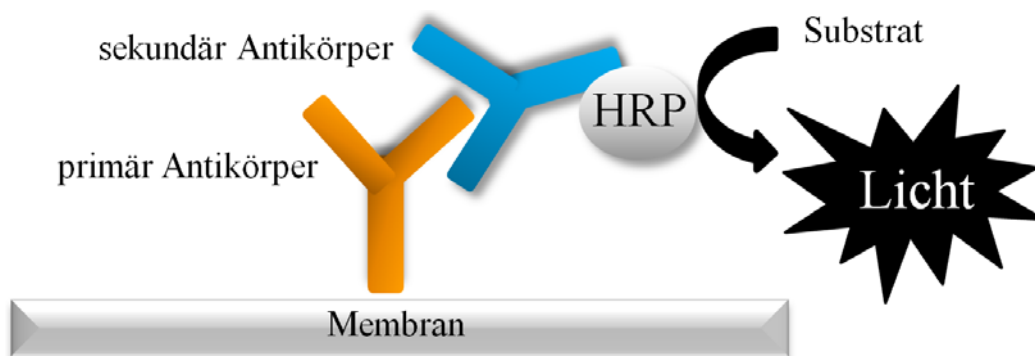


Abbildung 57: schematische Darstellung der immunochemischen Detektion.

Die Detektion erfolgt mittels LAS-3000 bzw. LAS-4000 und die Auswertung mittels „AIDA Image Analyser Multilabeling“-Software Version 3.52. Die semiquantitative Auswertung erfolgt in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) als T/C in [%].

Reagenzien

Erst-Antikörper-Lösungen

Nrf2(C-20)-Antikörper (rabbit, Santa Cruz), 1:200 in Blockingpuffer verdünnen.

Nrf2(H-300)-Antikörper (rabbit, Santa Cruz), 1:200 in Blockingpuffer verdünnen.

α-Tubulin-Antikörper (mouse, Santa Cruz), 1:5000 in Blockingpuffer verdünnen.

Lamin B Antikörper (goat, Santa Cruz), 1:200 in Blockingpuffer verdünnen.

Zweit-Antikörper-Lösungen

Goat anti-rabbit IgG-HRP-Antikörper (New England Biolabs), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen.

Goat anti-mouse IgG-HRP-Antikörper (Santa Cruz), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen.

Mouse anti-goat IgG-HRP-Antikörper (Santa Cruz), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen.

Waschpuffer

1 x TBS

0,3 % Tween®-20

LumiGlo®-Reagenz

3,6 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

0,2 ml Reagenz A (Luminol)

0,2 ml Reagenz B (H_2O_2)

6.6 Bestimmung des intrazellulären ROS-Gehaltes

Der Dichlorofluorescein (DCF)-Assay ermöglicht den Nachweis von intrazellulären reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Abbildung 58 und 57). Verwendet wird hierbei der unpolare, nicht fluoreszierende Farbstoff Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA), welcher durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren kann und dort durch Esterasen zum ebenso nicht fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert werden kann. In Anwesenheit von ROS wird DCFH oxidiert, wobei der fluoreszierende Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) entsteht. DCF kann aufgrund seiner erhöhten Polarität nicht mehr aus den Zellen diffundieren [Wang und Joseph, 1999]. Die Anregung des Farbstoffes erfolgt bei $\lambda = 485 \text{ nm}$ und die Fluorimetrie wird bei einer Wellenlänge von $\lambda = 525$ gemessen.

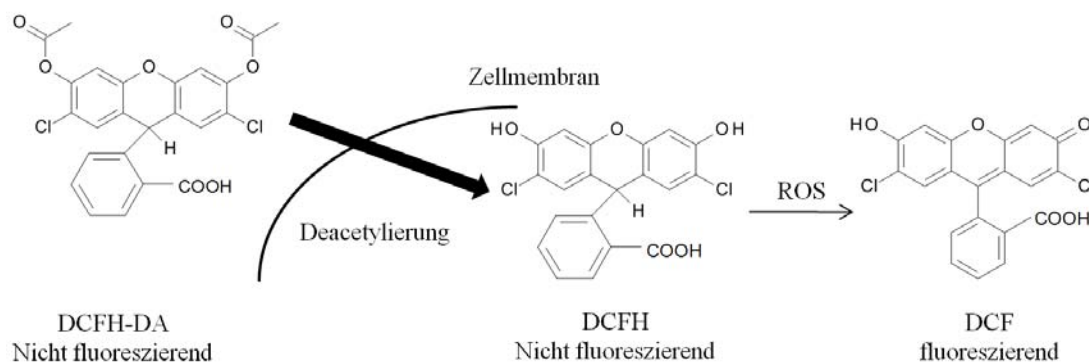


Abbildung 58: Schematische Darstellung des Dichlorofluorescein (DCF)-Assay. DCFH-DA: Dichlorofluorescein-Diacetat; DCFH: Dichlorofluorescein; DCF: Dichlorofluorescein; ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

Durchführung

- In einer 96-Loch Platte werden pro Loch 45.000 HT29-Zellen in 10 % FKS-haltigem Medium (farblos) ausgestreut und für 48 h inkubiert.
- Medium absaugen wobei jeweils die äußerste Reihe nicht abgesaugt wird und nicht für Untersuchungen herangezogen wird.
- Platten mit je 100 µl 1 x PBS waschen. Nachfolgend 1 x PBS vollständig absaugen.
- Zellen für 30 min mit je 100 µl DCFH-DA inkubieren.
- 2 x waschen der Zellen mit 100 µl 1 x PBS.
- Substanzinkubation als Triplikat in 100 µl serumfreiem Medium mit einer DMSO-Endkonzentration von 1 % mit Zusatz von Katalase (100 U/ml).
- Sofortiges Vermessen der Platte.
- Inkubation der Zellen unter den in Kapitel 6.1 beschriebenen Bedingungen für 3 h.
- Erneute Vermessung der Platte bei $\lambda = 525 \text{ nm}$.

6.7 Untersuchungen zur Gentranskription

Mittels quantitativer Real Time PCR wurden die Untersuchungen zur Gentranskription durchgeführt. In einem anfänglichen Schritt wird die RNA aus den Zellen isoliert und diese durch das Enzym Reversen Transkriptase in cDNA (Complementary DNA) umgeschrieben. Es folgt die Vervielfältigung ausgewählter Sequenzen der cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei gleichzeitig eine Quantifizierung der gewonnenen DNA durch den Farbstoff SYBR® Green (Qiagen) durchgeführt wird.

6.7.1 Zellinkubation von HT29-Zellen

1×10^6 Zellen pro Petrischale ($d=10 \text{ cm}$) werden ausgestreut und für 48 h bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren. Die Testsubstanzen werden frisch in DMSO gelöst und entsprechend einer Endkonzentration von 1 % DMSO mit serumfreiem Medium (3 h Inkubation) bzw. 10 % FKS-haltigem Medium (24 h) verdünnt. Die Substanzinkubation erfolgt in 6 ml Medium unter dem Zusatz von 100 U/ml Katalase (Kein Katalasezusatz: Inkubation mit *N*-Methylpyridinium (NMP) als Reinsubstanz).

6.7.2 Zellinkubation und Isolierung von peripheren Blutlymphozyten

Zu den untersuchten Zellen zählen auch periphere Blutlymphozyten (PBLs), welche aus Blut von Probanden direkt isoliert wurden und im Rahmen der humanen Interventionsstudie als auch in *ex vivo* Untersuchungen Verwendung fanden. Für die *ex vivo* Untersuchungen werden die PBLs aus 5 ml Blut isoliert (siehe nachfolgende Durchführung), für 1 h ruhen gelassen und bei 250 x *g* (1200rpm) für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Die Testsubstanz, welche in 6 ml 10 % FKS-haltigem Medium gelöst sind (vgl. 6.7.1), werde für 3 h inkubiert.

Durchführung

- Auf 5 ml vorgelegtes Histopaque® (RT) werden in einem 15 ml Schraubdeckelröhrchen vorsichtig 5 ml Blut überschichtet.
- Zentrifugation bei 400 x *g* für 25 min (RT) ohne Bremse.
- Die dünne, lymphozytenhaltige Schicht mittels einer Pipette abziehen (Abbildung 59).
- Diese in 6 ml, auf 37°C temperiertes, 10 % FKS-haltiges RPMI-Medium überführen und gut resuspendieren.
- Zentrifugation bei 250 x *g* für 10 min (RT) mit Bremse.
- Überstand verwerfen und Pellet entweder in 4 ml 10 % FKS-haltiges RPMI-Medium resuspendieren und kultivieren (*ex vivo*) oder in 1 ml RNAlater®-Puffer (QIAGEN) aufnehmen, auf Eis transportieren und bei -80°C lagern (humane Interventionsstudie).

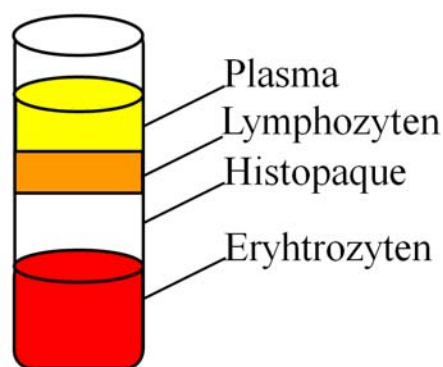


Abbildung 59: Dichtegradient nach Zentrifugation von Blut mit Histopaque®.

6.7.3 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kits (QIAGEN) gemäß dem Handbuch des Herstellers. Nach der Zelllyse wird in einem RNaseinhibitor-haltigen Extraktionspuffer und Scheren der RNA die Gesamt-RNA unter Zusatz von Ethanol an die „RNeasy silica Membran“ gebunden. Die Verunreinigungen werden mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration ausgewaschen und die RNA mit RNase-freiem Wasser von der RNeasy Mini Spin Säule eluiert (Abbildung 60).

Durchführung

- Medium absaugen und Spülen des Zellrasens mit 5 ml eiskalter PBS-Lösung (HT29-Zellen). Für die Behandlung der PBLs wird das Medium nach der Zentrifugation bei 400 x *g* für 5 min (RT) abgesaugt und nach Resuspendieren des Pellets in 1 ml PBS-Lösung erneut bei 400 x *g* für 5 min (RT) zentrifugiert.
- Entfernen der PBS-Lösung (gut absaugen) und Lyse der Zellen mit 600 µl RLT-Puffer, dem unmittelbar vor Verwendung 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml Pufferlösung zugesetzt werden.
- Zellen werden mit einem sterilen Einweg-Schaber abgeschabt und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt.
- Zelllysate scheren indem 5 x durch eine 0,9 mm Kanüle (20 Gauge) gezogen wird.
- Zugabe von 600 µl Ethanol (70 %), resuspendieren und Aufnahme von 700 µl dieser Suspension auf die sterile Silika-Membran.
- Zentrifugation für 30 sec mit 10.000 x *g* (RT).
- Durchfluss verwerfen, aufgeben der restlichen Zellsuspension auf die Säule und wiederholte Zentrifugation für 15 sec mit 10.000 x *g* (RT).
- Durchfluss verwerfen und Aufgeben von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule.
- Zentrifugation mit 10 000 x *g* für 15 sec (RT) und Durchfluss verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und Zentrifugation für 15 sec bei 10.000 x *g* (RT). Durchfluss verwerfen und Säule auf neues RNase-freies Tube setzen.
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und Zentrifugation bei 10 000 x *g* für 2 min sowie anschließend 1,5 min bei „fullspeed“ (RT).

- Säule auf ein RNase-freies Eppendorfgefäß geben und 50 µl (30 µl bei PBLs) RNase-freies Wasser direkt auf die Membran auftragen.
- Zentrifugation für 1,5 min bei 10.000 x *g* (RT) und nach Beenden die isolierte RNA direkt auf Eis geben. Lagerung bei -20°C.

Der Gehalt an gewonnener RNA wird anhand eines Nanodrop®-Spektrophotometer gemessen. Die Reinheit der gewonnenen RNA wird durch das Verhältnis zwischen der Absorption bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm (ratio A260: A280) bewertet, wobei $\lambda = 280$ nm das Absorptionsmaximum der Proteine darstellt. Eine ausreichende Reinheit ist bei einem A260/A280-Verhältnis von 1,9 bis 2,3 gegeben (RNeasy®, Mini Handbuch).

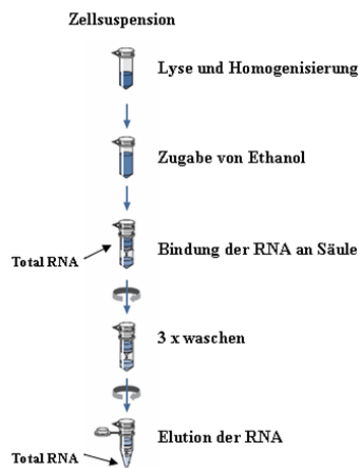


Abbildung 60: RNeasy® Mini Verfahren (QIAGEN) [modifiziert nach QIAGEN Handbuch].

6.7.4 Überprüfung der RNA Integrität mit dem Agilent 6000 Pico Assay

Ein wichtiges Qualitätsmerkmal für Genexpressionsanalysen stellt neben der Reinheit die Integrität der eingesetzten RNA dar. Diese RNA-Integrität kann anhand einer Mikrogelelektrophorese der RNA mit dem Agilent 6000 Pico Assay im Agilent 2100 Bioanalyzer (©Agilent Technologies) überprüft werden. Hierbei wird durch eine „Microfluidic Lab on a Chip“-Technologie die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei diesem System wird der RNA-Qualität ein Zahlenwert, der RNA-Integritätsnummer (RIN)-Wert, zugeordnet. Auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 28S- zu 18S-rRNA und deren Verhältnis sowie degradierten Abbauprodukten wird von der Agilent Expert-Software ein RIN-Wert auf einer Skala von 1 bis 10 ermittelt. Dabei entspricht 1 einer vollständig degradierten RNA und 10 einer völlig intakten RNA. Als Grenzwert gilt ein RIN-Wert ≥ 5 , über dessen Gehalt die RNA für Genexpressionsanalysen die nötige Integrität besitzt.

Durchführung

Alle verwendeten Reagenzien werden auf RT äquilibriert.

Herstellung des Gels

- 550 µl der RNA 6000 Pico Gel Matrix in einen Spin Filter geben.
- Zentrifugation bei 1500 x *g* für 10 min (RT).
- Aliquots von je 65 µl sind bei -4°C zu lagern (bis zu einem Monat).

Herstellung des Gel-Dye-Mix

- RNA 6000 Pico Dye Konzentrat 10 sec vortexen und abzentrifugieren.
- 1 µl RNA 6000 Pico Dye Konzentrat zu den 65 µl Pico Gel Matrix geben und gut vortexen.
- Zentrifugation bei 13000 x *g* für 10 min (RT).

Laden des Gel-Dye-Mixes

- Einlegen eines neuen RNA 6000 Pico Chips (Abbildung 61) in die Priming Station (Abbildung 62).
- 9 µl Gel-Dye-Mix in Position G pipettieren, Station schließen, Kolben herunterdrücken und 30 sec warten.
- Lösen des Kolbens wobei dieser mindestens zur 0,3 ml-Marke zurückspringen sollte.

- Station öffnen und je 9 µl Gel-Dye-Mix in die beiden rechten oberen Löcher pipettieren.

Laden des RNA 6000 Pico Chips

- 1 ng Proben-RNA in entsprechender Verdünnung bei 70°C für 2 min denaturieren und anschließend auf Eis kühlen.
- 9 µl RNA 6000 Pico Konditionierungslösung in CS pipettieren.
- 5 µl RNA 6000 Pico Marker in alle 11 Probenlöcher und in das Loch für die Leiter.
- 1 µl RNA 6000 Pico Leiter in das Leiter-Loch pipettieren.
- Je 1 µl Probe in die entsprechenden elf Probenlöcher pipettieren.
- RNA 6000 Pico Chip bei 2400 rpm für 1 min mit Mikrotiterplatteinsatz vortexen.
- Chip in Agilent 2100 Bioanalyzer legen und Programm starten.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der 2100 expert software (©Agilent technologies).

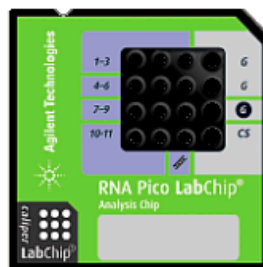


Abbildung 61: RNA 6000 Pico Chip (©Agilent Technologies).



Abbildung 62: Priming Station für Agilent 6000 Pico Chip (©Agilent technologies).

6.7.5 Reverse Transkription

Um die in der RNA enthaltene Nukleinsäuresequenz zu vervielfältigen, muss zunächst die isolierte RNA in cDNA, mit Hilfe des viralen Enzymes Reverse Transkriptase,

umgeschrieben werden. Dies ist erforderlich, da die Taq-DNA-Polymerase der PCR ausschließlich DNA vervielfältigen kann.

Durchführung

Die gesamte Umschreibung wird auf Eis durchgeführt

- Isolierte RNA auf 1 µg mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 12 µl verdünnen und Zugabe von 2 µl gDNA Wipe-out Puffer.
- Inkubation bei 42°C für 2 min.
- 6 µl RT-Mastermix zugeben, der aus 4 µl 5 x RT-Puffer, 1 µl Primer Mix und 1 µl Reverse Transkriptase hergestellt wird.
- Inkubation bei 42°C für 15 min und im Anschluss bei 95°C für 3 min.

Die cDNA kann bei -20°C im Eisschrank gelagert werden.

6.7.6 *Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Vermehrung ("Amplifikation") definierter DNA-Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Die PCR läuft in einer zyklischen Wiederholung von drei Schritten ab, wobei zu Beginn die HotStarTaq-DNA-Polymerase durch Inkubation bei 95 °C aktiviert werden muss. Beim ersten Schritt, der Denaturierung, werden die cDNA-Matrize (Template) und die Primer durch Erhitzen in ihre Einzelstränge durch Aufbrechen beziehungsweise Aufschmelzen der Wasserstoffbrückenbindungen aufgetrennt (Abbildung 63). Durch Erniedrigung der Temperatur lagern sich die Primer spezifisch an die entsprechenden DNA-Sequenzen an, was als „Annealing“ bezeichnet wird. Im Anschluss daran verlängert die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase durch Bindung an das Primer-Template-Hybrid die DNA-Sequenz in 5'→3' Richtung unter Verbrauch von Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs). Im letzten Schritt, der Elongation, wird das Temperaturoptimum der HotStarTaq-Polymerase erreicht. Dabei wird der komplementäre DNA-Strang bis zum Ende der Sequenz vervollständigt.

Für die Durchführung der pRT-PCR wird der „QuantiTect® SYBR Green PCR“-Kit (QIAGEN) verwendet.

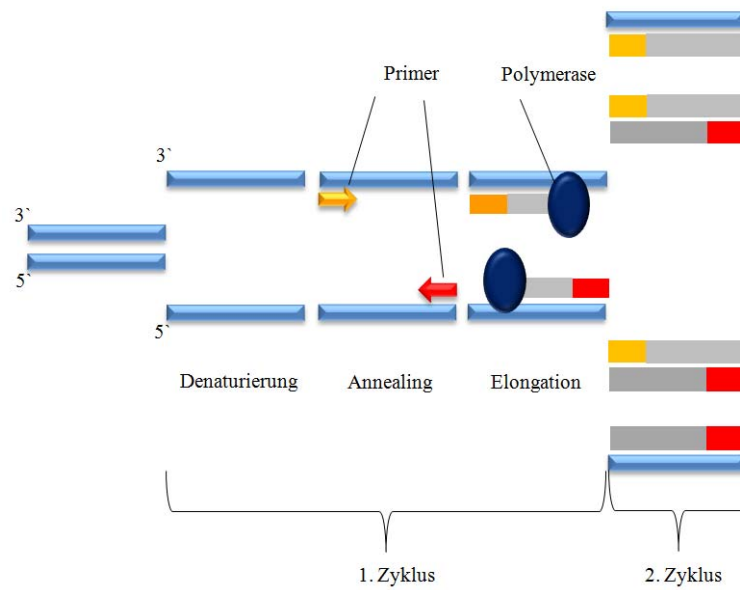


Abbildung 63: Prinzip der PCR.

Durchführung

- 10 μ l (12,5 μ l bei PBLs) QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix pro Loch in eine 96-Loch Platte vorlegen.
- 2 μ l (2,5 μ l bei PBLs) QuantiTect® SYBR Green Primer Assay und 0,5 μ l cDNA-Template (entspricht 25 ng RNA-Aquivalent) als Duplikat hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen von 20 μ l (25 μ l bei PBLs) pro Loch wird durch auffüllen mit $H_2O_{bidest.}$ erreicht und die 96-Loch Platte mit einer Folie versiegelt.
- Einstellen in den Thermocycler mit folgendem PCR-Programm:

1. Inkubation bei 95°C für 15 min,
 2. Inkubation bei 94 °C für 15 s,
 3. Inkubation bei 55 °C für 30 s,
 4. Inkubation für 72 °C für 30 s,
 5. Detektion der Fluoreszenz,
- 1 Zyklus
- 39 x Wiederholen der Schritte 2 - 5,
6. Bestimmung der Schmelzkurven von 60 °C (1 min) bis 95 °C (15 sec) in Schritten von 0,3°C/sec.

Der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green“ ermöglicht die Messung der Amplifikation der DNA bei der Real Time PCR nach jedem Zyklus. SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und der dabei gebildete Komplex absorbiert blaues ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 524 \text{ nm}$). Der Anstieg der Fluoreszenz kann gemessen werden. Um auszuschließen, dass die Sequenz des untersuchten Gens unspezifisch amplifiziert wurde, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Eine spezifisch abgelaufene PCR-Reaktion sollte einen einzelnen Peak in der Schmelzkurvenanalyse aufweisen. Eine relative Quantifizierung der Menge an Transkripten kann durch Bezug auf ein Kontrollgen gemessen werden. Dieses Kontrollgen darf nicht reguliert werden, wobei es sich beispielsweise um β -Aktin handeln kann. Die Berechnung erfolgt mit der sogenannte „ $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode“. Um hierbei immer im Bereich der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurve zu messen, wird der Ct-Wert (Treshhold Cycle-Schwellenwertzyklus) verwendet. Dieser beschreibt den Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Die Berechnung der relativen Transkription (rT) erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\beta\text{-Aktin}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Probe}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{rT} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

6.7.7 Human Toxicology and Drug Resistance Mikroarray

Mithilfe des Oligo GEMArray® Human Toxicology and Drug Resistance Mikroarrays ist die Kartierung des RNA-Pools eines Gewebes oder einer Zellkultur möglich. Hierbei können Expressionsveränderung von 260 Genen erfasst werden, die in metabolischen Prozessen bei Zellstress, Zelltoxizität, Arzneimittelresistenz und Arzneimittelmetabolisierung von Bedeutung sind. Der Mikroarray wurde zur Erfassung noch nicht ausgewiesener, potentieller Markergene für die Untersuchung der peripheren Lymphozyten der humanen Interventionsstudie II herangezogen. Der Mikroarray wurde eingesetzt, nachdem die PBLs isoliert waren (6.7.2) und deren RNA-Integrität auf eine ausreichende Qualität überprüft wurde (6.7.4). Die zuvor aufgereinigte Gesamt-RNA wird hierbei mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Abbildung 64). Es erfolgt eine Markierung durch *in vitro* Transkription mit Biotin-16-UTP und einer RNA-Polymerase. Die markierte, komplementäre RNA (antisense RNA) wird aufgereinigt und hybridisiert. Hierbei dienen immobilisierte, genspezifische 60-mer Oligos, die eine Identifizierung der Gene aufgrund ihrer Position auf dem Mikroarray ermöglichen.

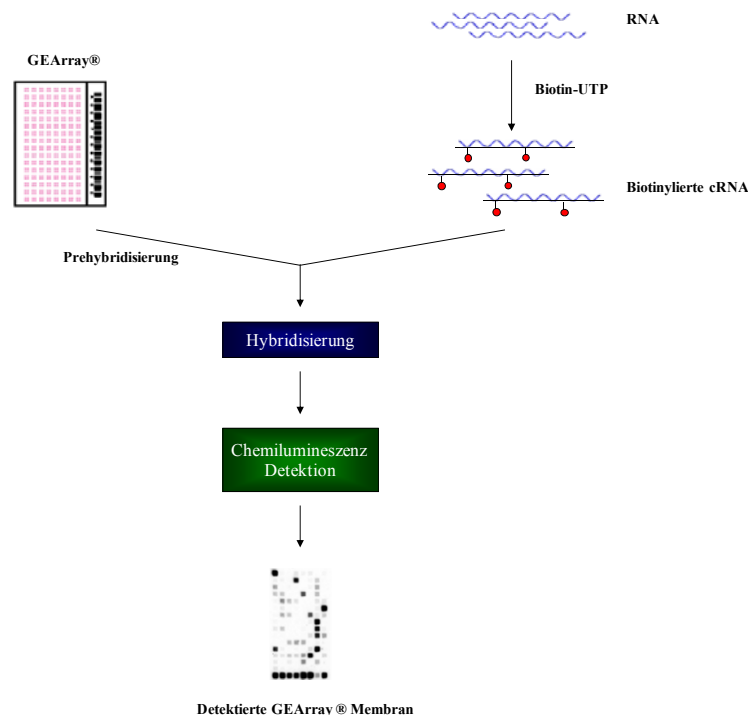


Abbildung 64:

Ablauf des Oligo GEMArray® DNA Mikroarrays [modifiziert nach TrueLabeling-AMP™ 2.0 User Manual].

Die Durchführung erfolgt nach dem TrueLabeling-AMP™ 2.0 User Manual, Version 1.3 und dem Oligo GEArray® System User Manual, Version 3.2 (SuperArray).

Durchführung

cDNA-Synthese

- Auftauen der Komponenten G1, G3, H₂O und G24. G2, R1 und G25 bleiben bei -20°C gelagert und werden erst kurz vor der Verwendung auf Eis aufgetaut.
- Herstellung des Annealing-Mix indem 3 µg Proben-RNA und 1 µl G1 in ein steriles PCR-Tube vorgelegt werden und mit RNase-freiem H₂O zu einem Endvolumen von 10 µl aufgefüllt wird.
- Lösung durchmischen und Inkubation bei 70°C für 10 min. Lagerung auf Eis.
- Herstellung des cDNA-Synthese Master Mix indem 4 µl RNase-freies H₂O, 4 µl 5 x G3, 1 µl R1 und 1 µl G2 zusammengegeben und durchmischt werden. Lagerung auf Eis.
- cDNA-Synthese Master Mix zum Annealing-Mix hinzufügen, durchmischen und Inkubation für 50 min bei 42°C, anschließend 5 min bei 75°C und Halten der Temperatur bei 37°C (cDNA-Synthese-Reaktions-Lösung).
- Herstellung des Amplifikation-Master-Mix indem 16 µl G24, 2 µl Biotin-16-UTP (Roche Applied Science) und 2 µl G25 zusammengegeben und durchmischt werden. Lagerung auf Eis.
- cRNA Synthese Reaktion durch Zugabe von 20 µl des Amplifikation-Master-Mix zur cDNA-Synthese-Reaktions-Lösung. Lösung durchmischen und Inkubation der Lösung bei 37°C über Nacht.

cRNA-Aufreinigung

- Verdünnung der RNA indem 60 µl RNase-freies H₂O zur cRNA-Synthese-Reaktionslösung dazu gegeben werden (Endvolumen 100 µl) und die gesamte Reaktionsmischung in ein 1,5 ml RNase freies Tube überführt wird.
- Hinzufügen von 350 µl G6 und 350 µl 100% Ethanol p.a.. Nach gutem Resuspendieren die Lösung direkt auf das Zentrum der Spin-Säule aufgeben.
- Zentrifugation bei 8.000 x g für 30 sec, anschließend Durchfluss verwerfen.
- Waschen indem 600 µl G17 (mit Ethanol) auf die Spin-Säule gegeben werden.

- Zentrifugation bei 8.000 x *g* für 30 sec, wobei die gesamte Waschlösung den Filter passieren muss.
- 200 µl G17 (mit Ethanol) auf die Säule geben und Zentrifugation bei 11.000 x *g* für 3 sec.
- Spin-Säule in ein frisches Elution-Tube geben und 50 µl RNase-freiem 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) zur Eluation auf die Säule hinzufügen.
- Inkubation für 2 min (RT) und im Anschluss Zentrifugation bei 8.000 x *g* für 1 min.
- Gereinigte cRNA auf Eis lagern. Eine Quantifizierung der cRNA erfolgt mittels Nanodrop®-Spektrophotometer. Die cRNA kann bei -20°C für 1-5 Tage gelagert werden.

Hybridisierung

- Äquilibrieren der Hybridisierungstubes auf RT.
- 5 ml DEPC-H₂O für mindestens 5 min unter gelegentlichem Schütteln zum Hybridisierungstube hinzufügen um darin enthaltene Membran anzufeuchten.
- GEAhby-Hybridisierungslösung auf 60°C erwärmen und Lösung dabei mehrmals durch Schütteln mischen.
- DEPC-H₂O aus Hybridisierungstube entfernen, 2 ml vorgewärmte GEAhby-Hybridisierungslösung dazu geben und kurz vortexen.
- Im Hybridisierungsofen bei 60°C für 1- 2 h vorhybridisieren, mit kontinuierlichen und langsamen 5-10 Umdrehungen pro min.
- Biotin-markierten cRNA zu 0,75 ml der vorgewärmten GEAhby-Hybridisierungslösung hinzufügen, mischen und die Lösung auf 60°C temperieren.
- Vorhybridisierungslösung verwerfen und Zielhybridisierungslösung, welche die markierte cRNA enthält, hinzufügen.
- Hybridisierung über Nacht (18 h) bei 60°C und konstanten langsamen 5-10 Umdrehungen pro min.
- Waschlösung I und Waschlösung II auf 60°C vorwärmen.
- Hybridisierungslösung in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen und Lagerung bei -20°C.

Chemilumineszenz Detektion

- 5 ml Waschlösung I in das Hybridisierungstube geben, kurz vortexen und im Hybridisierungssofen bei 60°C, schnellen 20-30 Umdrehungen pro min, für 15 min waschen. Waschlösung I verwerfen.
- 5 ml Waschlösung II in das Hybridisierungstube geben, kurz vortexen und waschen im Hybridisierungssofen bei 60°C, schnellen 20- 30 Umdrehungen pro min, für exakt 15 min. Im Anschluss Waschlösung verwerfen.
- Hybridisierungstube schließen und äquilibrieren auf RT.
- OligoGEArray mit 2 ml GEAblocking Lösung Q blocken, vortexen und anschließend Inkubation bei kontinuierlichen 20-30 Umdrehungen pro min für 40 min.
- 5 x Puffer F mit H₂O_{bidest.} auf 1 x Puffer F verdünnen.
- Herstellen des alkalische-phosphatase-konjugierten Streptavidin-Puffers (AP-SA-Puffer) indem 2 µl alkalische-phosphatase-konjugiertem Streptavidin in 16 ml 1 x Puffer F (1:8 000) gegeben werden.
- GEAblocking Lösung Q verwerfen und 2 ml AP-SA-Puffer hinzufügen, vortexen und Bindung des alkalische-phosphatase-konjugierten Streptavidins durch exakte Inkubation bei RT bei gleichmäßigen 5-10 Umdrehungen pro min für 10 min.
- Viermal waschen mit je 4 ml 1 x Puffer F bei langsamen 5-10 Umdrehungen pro min für 5 min. Nochmals Puffers F hinzugeben und kurz vortexen.
- Membran zweimal mit 3 ml Puffer G durch 3 x auf den Kopf Stellen des Hybridisierungstubes spülen.
- 1 ml CDP-Star Chemilumineszenzsubstrat in das Hybridisierungstube geben und bei RT und langsamen 5-10 Umdrehungen pro min für 4 min im Hybridisierungssofen inkubieren.
- Membran vorsichtig aus dem Hybridisierungstube entnehmen und mit einem Papiertuch abtupfen, um CDP-Star-Lösungsreste zu entfernen.
- Membran mit Plastikfolie luftblasenfrei abdecken und schnelle Detektion mittels LAS-3000 (Fujifilm), Image Reader. Auswertung mit AIDA Image Analyser Multilabeling v.3.5.2.

Reagenzien

20 x SSC

175,3 g NaCl, (pH 7,0)

88,2 g Natriumcitrat Dihydrat

Mit H₂O_{bidest.} auf 1l auffüllen.

20 % SDS

200 g Natriumdodecylsulfat

Mit H₂O_{bidest.} auf 1l auffüllen.

Waschlösung I

10 ml 20 x SSC

5 ml 20 % SDS

85 ml H₂O_{bidest.}

Waschlösung II

0,5 ml 20 x SSC

2,5 ml 20 % SDS

97 ml H₂O_{bidest.}

6.8 Materialverzeichnis

Verbrauchsmaterialien

Petrischalen, d = 5, 10 cm
 Kulturflaschen
 MicroAmp[®], 96-Loch, steril (PCR)
 TC-Platten, 24-Loch, steril
 TC-Platte, 96-Loch
 Costar[®], 96-Loch, steril
 Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)
 Pipettenspitzen (5 ml)
 Multipettenaufsätze (1, 5, 10 ml)
 Glaspipetten
 Pasteurpipetten
 Zellschaber, 25 cm, steril
 Eppendorfreaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5, 2,0 ml)
 13 ml Röhre
 15 ml Röhre
 50 ml Röhre
 Superfrost[®] Objektträger
 Deckgläser
 Neubauer-Zählkammer
 Papierbox für Eppendorfreaktionsgefäße
 1,5 mm Whatman Papiere
 Whatman Nitrocellulose Transfer Membran

Hersteller

Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Applied Biosystems
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
 Corining, N.Y., USA
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 VWR
 Eppendorf
 VWR
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Menzel-Gläser
 Menzel-Gläser
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Sartstedt AG & Co, Nümbrecht
 Whatman und Schleicher & Schuell
 Whatman und Schleicher & Schuell

Chemikalien

ABTS [®] -Puffer	Boehringer, Mannheim
Aceton p. A.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N-Acetylglukosamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Adenosintriphosphat (ATP)	Alexis [®] Biochemicals, Lausen, CH
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin-Standard	Pierce Biotechnologie, Rockford, USA
n-Butanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DAPI/SR101	Partec GmbH, Münster
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (EtOH) p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutathion (red.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Igepal CA-300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2HPO_4)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Magnesiumacetat ($\text{MgAc}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Luminollösung 20 x (LumiGlo)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Fluka, München
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN_3)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA, Darmstadt
Na- β -Glyzerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nonidet® P40 (10 %)	EuroClone S. p.A.
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PIPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Proteaseinhibitor complete	Roche, Basel, CH
Rotiphorese 30 (37,5:1), Acrylamid 30 % wässrige Lösung mit 0,8 % N, N'- Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Fluka, München
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein	Fermentas
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Serva GmbH, Heidelberg
Tween® 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Enzyme

Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
----------	------------------------------------

Feinchemikalien und Testsubstanzen

Kaffeoyl-4-O-β-D-Glucuronid MG: 356 g/mol	Prof. T. Hofmann, München
Kaffeoyl-3-O-β-D-Glucuronid MG: 356 g/mol	Prof. T. Hofmann, München
5-O-Kaffeoylchinasäure (CGA), MG: 354 g/mol	Prof. T. Hofmann, München

N-Methylpyridiniumiodid (NMP), MG: 221 g/mol	Prof. T. Hofmann, München
Trigonellinhypochlorid, MG: 178 g/mol	Prof. T. Hofmann, München
CGA-Kaffee Kaffeelyophilisat	Prof. T. Hofmann, München
NMP-Kaffee Kaffeelyophilisat	Prof. T. Hofmann, München
Brazil Blend Kaffeelyophilisat	Prof. T. Hofmann, München
PD98059	Cell Signaling
GF109203X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wortmannin	VWR

Kits

QuantiTect® Reverse Transcription	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect® SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNA _{later} -Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
Oligo GEArray® Microarray GA-034	SuperArray, Frederick, USA
TrueLabeling-AMP™ 2.0	SuperArray, Frederick, USA
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent technologies, Böblingen

Antikörper

Anti- α -Tubulin (B-7), mouse	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Nrf2 (C-20), rabbit	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Nrf2 (H-300), rabbit	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Lamin B (C-20), goat	Santa Cruz, Heidelberg
Goat anti-mouse, HRP-linked	Santa Cruz, Heidelberg
Mouse anti-goat, HRP-linked	Santa Cruz, Heidelberg
Anti rabbit antibody, HRP-linked	Cell Signaling Technology

QuantiTect® Primer Assays

Hs_ACTB_1_SG, QT00095431	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_GPX1_1_SG, QT00203392	QIAGEN GmbH, Hilden

HS_GSR_1_SG, QT00038325	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_SOD1_2_SG, QT017671551	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_CAT_1_SG, QT00079674	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTT1_2_SG, QT01751638	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GCLC_1_SG, QT00037310	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_NQO1_1_SG, QT00050281	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_HMOX1_1_SG, QT00092645	QIAGEN GmbH, Hilden
HS_NFE2L2_1_SG, QT00027384	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTP1_1_SG, QT00086401	QIAGEN GmbH, Hilden
<u>Zellkultur</u>	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME mit 4500mg/L Glukose, ohne Natriumpyrovat)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin 10000 I. U./10000 µg/ml	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/ mg)	Serva GmbH, Heidelberg

6.9 Geräteliste

<u>Gerät</u>	<u>Modell, Firma</u>
Autoklav	Systec D-150, Systec GmbH Systec DX-150, Systec GmbH
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer G2939A, Agilent
Blotter	PerfectBlue “Semi-dry” Elektrobloetter, PeqLab Trans-Blot [®] Cell, 49 BR 3584, Bio Rad
Brutschrank	WTB-Binder CO ₂ -Brutschrank CB210, Binder Heracell 240 i, CO ₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific
Dokumentationsgerät	LAS-3000, Luminescent Image Analyser, Fujifilm Software: Image Reader LAS 3000, Auswertung: AIDA V3.52.046 LAS-4000, Luminescent Image Analyser, Fujifilm Software: Image Reader LAS 4000, Auswertung: Multi Gauge V3.2
Gelelektrophorese	PerfectBlue [™] , Vertical Electrophoresis System, PeqLab Mini-PROTEAN [®] Tetra System, Bio Rad
Kühl-/ Gefrierschränke/ -80 °C Ultra-tiefkühlschränke	Liebherr Premium und Comfort (4 °C, -20 °C), Liebherr Ultra low temperature freezer, Modell U725-86 EUBiofreezer, New Brunswick
Magnetrührer	IKA [®] RH basic 2, IKA [®] -Werke Magnetic Stirrer HI 300N, HANNA instruments
Mikrotiterplattenlesegerät	Vicor ³ V 1240 Multilable Counter, Perkin Elmer
Mikroskopie	Inversmikroskop Axiovert 40C, Zeiss

	Objektive: A-Plan, 5 x/ 0,12 Ph0, CP AChromat 10 x/ 0,25 Ph1 Okular: PL 10 x/ 18 Durchlicht/Fluoreszenzmikroskop Axioskop, Zeiss Objektiv: Plan-Neoflux 100 x/ 1,3, oil 440480 Okular: Pl 10 x/ 20 Filter: 365 FT 395, LP 420 UV: BP 450-490, FT 510, LP 520
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter, Elektrode: 1420-040, HANNA instruments Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120
Pipetten, Multipetten, Pipettus	Multipette Plus, Eppendorf Eppendorf Research P 2,5 -P 5000, Eppendorf Pipettus Akku, Hirschmann Laborgeräte
Power Station	Consort E835 Electrophorese Power Supply EV231, Peqlab
Pumpen	Vakuumsaugpumpe Laboport® Hitachi L-6210 Intelligent Pump (Merck)
Schüttler	Thriller, 1,5 ml, Peqlab Biotechnologies, Erlangen Überkopfschüttler Roto-Shake-Genie, Peqlab Mini Rocker MR-1, Peqlab
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Peqlab
Sterilbank	KR-130 BW, Kojair Tech Oy, Finnland Heraeus HS12, Heraeus instruments, Hanau
Thermocycler	MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cycler Thriller, Peqlab Biotechnologies, Erlangen
Trockenschrank	Heraeus, Memmert, Heraeus instruments, Hanau
Ultraschallstab	Sonifier 450, Brandson
Vortex	Vortex MS Minishaker IKA®, VWR Vortex Genie 2™, Bender und Hobein AG

Waagen	Analysenwaage CP124 S, Sartorius AG Analysenwaage New Classic MF, ML204/01, Mettler Toledo Grobwaage 1574 MP8-2, Sartorius AG, Grobwaage New Classic MF, ML6001/01, Mikro 200, Mettler Toledo
Wasserbad	SW-2004 und GD 100, Grant, VWR
Zentrifugen	Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG Tischzentrifuge, 5415 Eppendorf AG Tischzentrifuge, 5415C Eppendorf AG Tischzentrifuge, 5417R, Eppendorf AG Tischzentrifuge, Mikro 220R, Hettich Tischzentrifuge, Rotina 420R, Hettich Tischzentrifuge, Galaxy MiniStar, VWR Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus, Thieme Labortechnik GmbH

7 Literatur

A

- Abraham SK and Singh SP (1999) Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. *Food Chem Toxicol* 37, 733-739.
- Adams J, Kelso R and Cooley L (2000) The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 10, 17-24.
- Allred KF, Yackley KM, Vanamala J and Allred CD (2009) Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. *J Nutr* 139, 1833-1838.
- Almeida AA, Farah A, Silva DA, Nunan EA and Gloria MB (2006) Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J Agric Food Chem* 54, 8738-8743.
- Alpert JS (2009) "Hey, doc, is it OK for me to drink coffee?". *Am J Med* 122, 597-598.
- Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10, 2-18.
- Arya M and Rao LJ (2007) An impression of coffee carbohydrates. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47, 51-67.
- Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L and Shaul Y (2001) Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1188-1193.

B

- Bakuradze T, Dissertation (2010) Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakten und im Kaffeegetränke in vitro und bei Probanden. *Universität Kaiserslautern*.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J and Motterlini R (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371, 887-895.
- Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z and Brigelius-Flohe R (2005) The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 25, 4914-4923.
- Beckman KB and Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633-19636.

- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2008) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer Verlag*.
- Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR and Hesketh JE (1995) Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311 (Pt 2), 425-430.
- Bichler J, Cavin C, Simic T, Chakraborty A, Ferk F, Hoelzl C, Schulte-Hermann R, Kundi M, Haidinger G, Angelis K and Knasmüller S (2007) Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem Toxicol* 45, 1428-1436.
- Blank V (2008) Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J Mol Biol* 376, 913-925.
- Bloom DA and Jaiswal AK (2003) Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 278, 44675-44682.
- Boettler U, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V, Lang R, Hofmann T and Marko D (2010) Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J Nutr Biochem*.
- Boettler U, Dissertation (2009) Kaffee und ausgewählte Inhaltsstoffe als Aktivatoren des Nrf2/ARE (EpRE)-Signalwegs. *Universität Wien*.
- Botelho F, Lunet N and Barros H (2006) Coffee and gastric cancer: systematic review and meta-analysis. *Cad Saude Publica* 22, 889-900.
- Brigelius-Flohe R (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.

C

- Carlberg I and Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113, 484-490.
- Cavin C, Holzhauser D, Constable A, Huggett AC and Schilter B (1998) The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis* 19, 1369-1375.

- Chen C, Yu R, Owuor ED and Kong AN (2000) Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 23, 605-612.
- Chen H and Juchau MR (1998) Biotransformation of 13-cis- and 9-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in rat conceptual homogenates. Evidence for catalysis by a conceptual isomerase. *Drug Metab Dispos* 26, 222-228.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF, Jr. and Lei XG (1998) Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 128, 1070-1076.
- Cho ES, Jang YJ, Hwang MK, Kang NJ, Lee KW and Lee HJ (2009) Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutat Res* 661, 18-24.
- Cho JS, Chang MS and Rho HM (2001a) Transcriptional activation of the human Cu/Zn superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through the xenobiotic-responsive element. *Mol Genet Genomics* 266, 133-141.
- Cho SG, Lee YH, Park HS, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom SJ, Kim MJ, Chang TS, Choi SY, Shim J, Kim Y, Dong MS, Lee MJ, Kim SG, Ichijo H and Choi EJ (2001b) Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 276, 12749-12755.
- Chvasta TE and Cooke AR (1971) Emptying and absorption of caffeine from the human stomach. *Gastroenterology* 61, 838-843.
- Clifford M (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence und dietary burden. *J Sci Food Agric* 79, 362-370
- Cohen P, Holmes CF and Tsukitani Y (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15, 98-102.
- Coles BF and Kadlubar FF (2003) Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors* 17, 115-130.
- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR and Park BK (2008) The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246, 24-33.
- Crack PJ and Taylor JM (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 38, 1433-1444.

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW and Diehl JA (2004) The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24, 8477-8486.

Czok G (1965) On the question of the share of chlorogenic acid, trigonelline and coffee oil in the physiological effects of coffee beverages. *Second Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés*. Paris, 3-7 mai 1965: IFCC, Paris

D

Dashwood WM, Orner GA and Dashwood RH (2002) Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 584-588.

Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N and Seva C (1999) Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors. *J Biol Chem* 274, 20657-20663.

De Roos B, Meyboom S, Kosmeijer-Schuil TG and Katan MB (1998) Absorption and urinary excretion of the coffee diterpenes cafestol and kahweol in healthy ileostomy volunteers. *J Intern Med* 244, 451-460.

del Castillo MD, Ames JM and Gordon MH (2002) Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 50, 3698-3703.

Denison MS, Fisher JM and Whitlock JP, Jr. (1988) The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 263, 17221-17224.

Deutscher Kaffeverband e.V., Hamburg: Pressemitteilung vom 22.04.2010

Ding Y, Choi KJ, Kim JH, Han X, Piao Y, Jeong JH, Choe W, Kang I, Ha J, Forman HJ, Lee J, Yoon KS and Kim SS (2008) Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *Am J Pathol* 172, 1529-1541.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M and Talalay P (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1

are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11908-11913.

Dinkova-Kostova AT and Talalay P (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys* 501, 116-123.

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M and Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32, 1102-1115.

Dlugosz L and Bracken MB (1992) Reproductive effects of caffeine: a review and theoretical analysis. *Epidemiol Rev* 14, 83-100.

Dunwiddie TV and Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24, 31-55.

E

Eggler AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB and Mesecar AD (2005) Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10070-10075.

Evans P and Halliwell B (1999) Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 884, 19-40.

F

Fabbro M and Henderson BR (2003) Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* 282, 59-69.

Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P and Lozniewski A (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7610-7615.

Fehr M, Dissertation (2010) Mechanismen der genotoxischen Wirkung von Alternaria-Toxinen. *Universität Karlsruhe*.

Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V and Ding M (2005) Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem* 280, 27888-27895.

Fenton HJH (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc (London)* 65, 899-910.

Ferguson LR (2009) Nutrigenomics Approaches to Functional Foods. *J Am Diet Assoc* 109, 452-458

Furukawa M and Xiong Y (2005) BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol* 25, 162-171.

G

Ganmaa D, Willett WC, Li TY, Feskanich D, van Dam RM, Lopez-Garcia E, Hunter DJ and Holmes MD (2008) Coffee, tea, caffeine and risk of breast cancer: a 22-year follow-up. *Int J Cancer* 122, 2071-2076.

Gasdaska PY, Fisher H and Powis G (1995) An alternatively spliced form of NQO1 (DT-diaphorase) messenger RNA lacking the putative quinone substrate binding site is present in human normal and tumor tissues. *Cancer Res* 55, 2542-2547.

Giacomelli C, Miranda Fda S, Goncalves NS and Spinelli A (2004) Antioxidant activity of phenolic and related compounds: a density functional theory study on the O-H bond dissociation enthalpy. *Redox Rep* 9, 263-269.

Giovannucci E (1998) Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *Am J Epidemiol* 147, 1043-1052.

Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C and Scalbert A (2003) Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 133, 1853-1859.

Greenberg JA, Boozer CN and Geliebter A (2006) Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr* 84, 682-693.

Griffith OW (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27, 922-935.

Gross G, Jaccard E and Huggett AC (1997) Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. *Food Chem Toxicol* 35, 547-554.

Guha N, Chang JS, Chokkalingam AP, Wiemels JL, Smith MT and Buffler PA (2008) NQO1 polymorphisms and de novo childhood leukemia: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 168, 1221-1232.

Guttmacher AE and Collins FS (2002) Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med* 347, 1512-1520.

H

Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.

Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J and Long LH (2000) Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 50, 251-257.

Hammar N, Andersson T, Alfredsson L, Reuterwall C, Nilsson T, Hallqvist J, Knutsson A and Ahlbom A (2003) Association of boiled and filtered coffee with incidence of first nonfatal myocardial infarction: the SHEEP and the VHEEP study. *J Intern Med* 253, 653-659.

Hanks SK and Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576-596.

Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A and Biswal S (2009) Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 46, 443-453.

Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 51-88.

Hayes JD and McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, 273-300.

Hayes JD and McMahon M (2009) NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 34, 176-188.

Hayes JD and Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 445-600.

Hayes JD and Strange RC (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61, 154-166.

He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM and Alam J (2001) Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 276, 20858-20865.

- He X, Chen MG, Lin GX and Ma Q (2006) Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x Maf to the antioxidant response element enhancer. *J Biol Chem* 281, 23620-23631.
- Hegele J, Munch G and Pischetsrieder M (2009) Identification of hydrogen peroxide as a major cytotoxic component in Maillard reaction mixtures and coffee. *Mol Nutr Food Res* 53, 760-769.
- Hershko A and Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Higdon JV and Frei B (2006) Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46, 101-123.
- Higgins LG, Cavin C, Itoh K, Yamamoto M and Hayes JD (2008) Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol* 226, 328-337.
- Hirai H, Kubo H, Yamaya M, Nakayama K, Numasaki M, Kobayashi S, Suzuki S, Shibahara S and Sasaki H (2003) Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 102, 1619-1621.
- Hirakawa N, Okauchi R, Miura Y and Yagasaki K (2005) Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 653-658.
- Hiramoto K, Li X, Makimoto M, Kato T and Kikugawa K (1998) Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. *Mutat Res* 419, 43-51.
- Holtzclaw WD, Dinkova-Kostova AT and Talalay P (2004) Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv Enzyme Regul* 44, 335-367.
- Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV and Yang CS (2005) Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res* 65, 8049-8056.
- Hu LT, Stamberg J and Pan S (1996) The NAD(P)H:quinone oxidoreductase locus in human colon carcinoma HCT 116 cells resistant to mitomycin C. *Cancer Res* 56, 5253-5259.

- Huang HC, Nguyen T and Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12475-12480.
- Huang HC, Nguyen T and Pickett CB (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277, 42769-42774.
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ and Conney AH (1988) Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48, 5941-5946.
- Huang Z, Li J, Zhang S and Zhang X (2009) Inorganic arsenic modulates the expression of selenoproteins in mouse embryonic stem cell. *Toxicol Lett* 187, 69-76.
- Hwang YP, Yun HJ, Chun HK, Chung YC, Kim HK, Jeong MH, Yoon TR and Jeong HG (2009) Protective mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage. *Chem Biol Interact* 181, 366-376.

I

- Illy A and Viani R (1995) Espresso coffee, the chemistry of quality. *Academic Press*
- Illy E (2002) The complexity of coffee. *Sci Am* 286, 86-91.
- Itagaki SK, Kobayashi T, Kitagawa Y, Iwata S, Suwa Y, Nukaya H and Tsuji K (1992) Cytotoxicity of coffee in human intestinal cells in vitro and its inhibition by peroxidase. *Toxicol In Vitro* 6, 417-421.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M and Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD and Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T and Yamamoto M (2003) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 8, 379-391.

Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida K and Fujita T (2004) In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J Agric Food Chem* 52, 4893-4898.

J

Jaiswal AK (2000) Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 29, 254-262.

Jaiswal AK (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36, 1199-1207.

Jeong WS, Jun M and Kong AN (2006) Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid Redox Signal* 8, 99-106.

Jeong WS, Keum YS, Chen C, Jain MR, Shen G, Kim JH, Li W and Kong AN (2005) Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *J Biochem Mol Biol* 38, 167-176.

Joseph P and Jaiswal AK (1994) NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8413-8417.

K

Kahle K, Huemmer W, Kempf M, Scheppach W, Erk T and Richling E (2007) Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J Agric Food Chem* 55, 10605-10614.

Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP and Strassburg CP (2010) Coffee induces expression of glucuronosyltransferases via the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. *Gastroenterology*.

Kang KW, Lee SJ, Park JW and Kim SG (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* 62, 1001-1010.

- Kang KW, Ryu JH and Kim SG (2000) The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction by decreased glutathione in H4IIE hepatoma cells. *Mol Pharmacol* 58, 1017-1025.
- Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG and Yamamoto M (2004) Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2046-2051.
- Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE and Vartapetian AB (2005) Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 25, 1089-1099.
- Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S and Mori H (2000) Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol* 38, 467-471.
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A and Yamamoto M (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 6, 857-868.
- Katsuoka F, Motohashi H, Ishii T, Aburatani H, Engel JD and Yamamoto M (2005) Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol Cell Biol* 25, 8044-8051.
- Keen JH and Jakoby WB (1978) Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J Biol Chem* 253, 5654-5657.
- Kensler TW and Wakabayashi N (2010) Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 31, 90-99.
- Kensler TW, Wakabayashi N and Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 89-116.
- Kern M, Fridrich D, Reichert J, Skrbek S, Nussler A, Hofem S, Vatter S, Pahlke G, Rufer C and Marko D (2007) Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol Nutr Food Res* 51, 1163-1172.

- Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G and Marko D (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 49, 317-328.
- Keum YS, Jeong WS and Kong AN (2004) Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res* 555, 191-202.
- Keum YS, Yu S, Chang PP, Yuan X, Kim JH, Xu C, Han J, Agarwal A and Kong AN (2006) Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res* 66, 8804-8813.
- Kim BC, Jeon WK, Hong HY, Jeon KB, Hahn JH, Kim YM, Numazawa S, Yosida T, Park EH and Lim CJ (2007) The anti-inflammatory activity of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curt.) is mediated through the PKCdelta/Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. *J Ethnopharmacol* 113, 240-247.
- Kim BR, Hu R, Keum YS, Hebbar V, Shen G, Nair SS and Kong AN (2003) Effects of glutathione on antioxidant response element-mediated gene expression and apoptosis elicited by sulforaphane. *Cancer Res* 63, 7520-7525.
- Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Ikawa S, Watanabe M, Arai H, Sasaki H, Higuchi S, Okita N, Takase S, Saito H, Takahashi K and Shibahara S (1997) Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet* 100, 145-147.
- Kimura M, Yamamoto T, Zhang J, Itoh K, Kyo M, Kamiya T, Aburatani H, Katsuoka F, Kurokawa H, Tanaka T, Motohashi H and Yamamoto M (2007) Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf homodimer. *J Biol Chem* 282, 33681-33690.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsui M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K and Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24, 7130-7139.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K and Yamamoto M (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26, 221-229.

- Kosaka T, Yoshino J, Inui K, Wakabayashi T, Kobayashi T, Watanabe S, Hayashi S, Hirokawa Y, Shiraishi T, Yamamoto T, Tsuji M, Katoh T and Watanabe M **(2009)** Involvement of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and superoxide dismutase polymorphisms in ulcerative colitis. *DNA Cell Biol* 28, 625-631.
- Kudo N, Taoka H, Toda T, Yoshida M and Horinouchi S **(1999)** A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* 274, 15151-15158.
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M and Kensler TW **(2002)** Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 22, 2883-2892.
- Kweon MH, Adhami VM, Lee JS and Mukhtar H **(2006)** Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem* 281, 33761-33772.
- Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M **(2001)** Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem* 75, 223-230

L

- La Vecchia C **(2005)** Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. *J Hepatol* 42, 444-446.
- Lam LK, Sporn VL and Wattenberg LW **(1982)** Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. *Cancer Res* 42, 1193-1198.
- Lampe JW and Peterson S **(2002)** Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *J Nutr* 132, 2991-2994.
- Lane JD, Adcock RA, Williams RB and Kuhn CM **(1990)** Caffeine effects on cardiovascular and neuroendocrine responses to acute psychosocial stress and their relationship to level of habitual caffeine consumption. *Psychosom Med* 52, 320-336.
- Lang R, Wahl A, Skurk T, Yagar EF, Schmiech L, Eggers R, Hauner H and Hofmann T **(2010)** Development of a hydrophilic liquid interaction chromatography-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based stable isotope

- dilution analysis and pharmacokinetic studies on bioactive pyridines in human plasma and urine after coffee consumption. *Anal Chem* 82, 1486-1497.
- Lapidot T, Walker MD and Kanner J (2002) Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro. *J Agric Food Chem* 50, 7220-7225.
- Larsson SC and Wolk A (2007) Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 132, 1740-1745.
- Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Bernstein L, van den Brandt PA, Buring JE, Cho E, English D, Folsom AR, Freudenheim JL, Gile GG, Giovannucci E, Horn-Ross PL, Leitzmann M, Marshall JR, Mannisto S, McCullough ML, Miller AB, Parker AS, Pietinen P, Rodriguez C, Rohan TE, Schatzkin A, Schouten LJ, Willett WC, Wolk A, Zhang SM and Smith-Warner SA (2007) Intakes of coffee, tea, milk, soda and juice and renal cell cancer in a pooled analysis of 13 prospective studies. *Int J Cancer* 121, 2246-2253.
- Lee JM and Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37, 139-143.
- Lei XG, Evenson JK, Thompson KM and Sunde RA (1995) Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr* 125, 1438-1446.
- Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD and Darley-Usmar VM (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 378, 373-382.
- Lewin B (2004) Genes VIII. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education
- Li C and Stocker R (2009) Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. *Redox Rep* 14, 95-101.
- Lim JH, Park HS, Choi JK, Lee IS and Choi HJ (2007) Isoorientin induces Nrf2 pathway-driven antioxidant response through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Arch Pharm Res* 30, 1590-1598.
- Lin CW, Wu MJ, Liu IY, Su JD and Yen JH (2010) Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *J Agric Food Chem* 58, 4477-4486.

- Lin W, Shen G, Yuan X, Jain MR, Yu S, Zhang A, Chen JD and Kong AN (2006) Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *J Biochem Mol Biol* 39, 304-310.
- Lind C, Hochstein P and Ernster L (1982) DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch Biochem Biophys* 216, 178-185.
- Lindl T (2002) Zell- und Gewebeskultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Lledias F, Rangel P and Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 273, 10630-10637.
- Lo HW and Ali-Osman F (2007) Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 7, 367-374.
- Löffler G, Petrides P, Heinrich PP (2007) Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag*.
- Long LH, Clement MV and Halliwell B (2000) Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 50-53.
- Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30, 42-59.

M

- Ma Q, Kinneer K, Bi Y, Chan JY and Kan YW (2004) Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem J* 377, 205-213.
- MacMahon B, Yen S, Trichopoulos D, Warren K and Nardi G (1981) Coffee and cancer of the pancreas. *N Engl J Med* 304, 630-633.
- Maier HG (1981) Kaffee. *Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg*
- Manandhar S, Cho JM, Kim JA, Kensler TW and Kwak MK (2007) Induction of Nrf2-regulated genes by 3H-1, 2-dithiole-3-thione through the ERK signaling pathway in murine keratinocytes. *Eur J Pharmacol* 577, 17-27.

- Mandel H (2002) Update on Coffeine consumption, disposition and action. *Food Chem Toxicol* 40, 1231-1234.
- Marklund SL (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7634-7638.
- Marklund SL (1984) Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* 220, 269-272.
- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.
- Marnett LJ, Riggins JN and West JD (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111, 583-593.
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM and Cuadrado A (2004) Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279, 8919-8929.
- Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lanken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY and Kleeberger SR (2007) Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J* 21, 2237-2246.
- McCall MR and Frei B (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 26, 1034-1053.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F and Lei XG (2004) Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8852-8857.
- McCord JM and Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055.
- McCusker RR, Goldberger BA and Cone EJ (2003) Caffeine content of specialty coffees. *J Anal Toxicol* 27, 520-522.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M and Hayes JD (2003) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 278, 21592-21600.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M and Hayes JD (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-

- sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 279, 31556-31567.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M and Hayes JD (2006) Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* 281, 24756-24768.
- Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220, 472-477.
- Miao W, Hu L, Scrivens PJ and Batist G (2005) Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem* 280, 20340-20348.
- Mimura J and Fujii-Kuriyama Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619, 263-268.
- Mohler J, Mahaffey JW, Deutsch E and Vani K (1995) Control of Drosophila head segment identity by the bZIP homeotic gene cnc. *Development* 121, 237-247.
- Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC and Donangelo C (2007) Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr* 137, 2196-2201.
- Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD and Yamamoto M (2002) Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294, 1-12.
- Mulcahy RT and Gipp JJ (1995) Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 227-233.
- Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH and Gipp JJ (1997) Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem* 272, 7445-7454.
- Muller C, Lang R and Hofmann T (2006) Quantitative precursor studies on di- and trihydroxybenzene formation during coffee roasting using "in bean" model experiments and stable isotope dilution analysis. *J Agric Food Chem* 54, 10086-10091.

Muscat S, Pelka J, Hegele J, Weigle B, Munch G and Pischetsrieder M (2007) Coffee and Maillard products activate NF-kappaB in macrophages via H₂O₂ production. *Mol Nutr Food Res* 51, 525-535.

N

Nardini M, Cirillo E, Natella F and Scaccini C (2002) Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem* 50, 5735-5741.

Nardini M, Natella F, Scaccini C and Ghiselli A (2006) Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *J Nutr Biochem* 17, 14-22.

Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A and Feeley M (2003) Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* 20, 1-30.

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS and Pickett CB (2003) Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 278, 4536-4541.

Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS and Pickett CB (2005) Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 280, 32485-32492.

Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ and Pickett CB (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 25, 10895-10906.

Niture SK, Jain AK and Jaiswal AK (2009) Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* 122, 4452-4464.

O

Ogata S, Takeuchi M, Teradaira S, Yamamoto N, Iwata K, Okumura K and Taguchi H (2002) Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 641-645.

Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H and Igarashi K (2001) Heme mediates derepression of Maf

recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 20, 2835-2843.

Okcu MF, Selvan M, Wang LE, Stout L, Erana R, Airewele G, Adatto P, Hess K, Ali-Osman F, Groves M, Yung AW, Levin VA, Wei Q and Bondy M (2004) Glutathione S-transferase polymorphisms and survival in primary malignant glioma. *Clin Cancer Res* 10, 2618-2625.

Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM and Katan MB (2003) Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr* 133, 1806-1814.

Olthof MR, Hollman PC and Katan MB (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131, 66-71.

P

Pan SS, Forrest GL, Akman SA and Hu LT (1995) NAD(P)H:quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. *Cancer Res* 55, 330-335.

Pan SS, Han Y, Farabaugh P and Xia H (2002) Implication of alternative splicing for expression of a variant NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 with a single nucleotide polymorphism at 465C>T. *Pharmacogenetics* 12, 479-488.

Panfili E, Sandri G and Ernster L (1991) Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett* 290, 35-37.

Park EY and Rho HM (2002) The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem* 240, 47-55.

Paur I, Balstad TR and Blomhoff R (2010) Degree of roasting is the main determinant of the effects of coffee on NF-kappaB and EpRE. *Free Radic Biol Med* 48, 1218-1227.

Pettenuzzo LF, Noschang C, von Pozzer Toigo E, Fachin A, Vendite D and Dalmaz C (2008) Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* 95, 295-301.

Piantadosi CA (2008) Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 45, 562-569.

- Pickart CM (2001) Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 8, 499-504.
- Pool-Zobel B, Veeriah S and Bohmer FD (2005) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* 591, 74-92.
- Poquet L, Clifford MN and Williamson G (2008) Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. *Arch Biochem Biophys* 476, 196-204.
- Prester T, Holtzclaw WD, Zhang Y and Talalay P (1993) Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2965-2969.
- Prochaska HJ, De Long MJ and Talalay P (1985) On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8232-8236.
- Prochaska HJ and Talalay P (1988) Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* 48, 4776-4782.

R

- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P and Kensler TW (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3410-3415.
- Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM and Biswal S (2004) Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 114, 1248-1259.
- Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M and Klaassen CD (2009) Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 108, 35-47.
- Robertson D, Frolich JC, Carr RK, Watson JT, Hollifield JW, Shand DG and Oates JA (1978) Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N Engl J Med* 298, 181-186.
- Rojo AI, Salina M, Salazar M, Takahashi S, Suske G, Calvo V, de Sagarra MR and Cuadrado A (2006) Regulation of heme oxygenase-1 gene expression through the

phosphatidylinositol 3-kinase/PKC-zeta pathway and Sp1. *Free Radic Biol Med* 41, 247-261.

Rushmore TH, King RG, Paulson KE and Pickett CB (1990) 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* 87, 3826-3830.

Rushmore TH, Morton MR and Pickett CB (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266, 11632-11639.

Rustan AC, Halvorsen B, Huggett AC, Ranheim T and Drevon CA (1997) Effect of coffee lipids (cafestol and kahweol) on regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2140-2149.

S

Safranow K and Machoy Z (2005) Methylated purines in urinary stones. *Clin Chem* 51, 1493-1498.

Scalbert A and Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.

Sekhar KR, Spitz DR, Harris S, Nguyen TT, Meredith MJ, Holt JT, Gius D, Marnett LJ, Summar ML and Freeman ML (2002) Redox-sensitive interaction between KIAA0132 and Nrf2 mediates indomethacin-induced expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Free Radic Biol Med* 32, 650-662.

Seripa D, Matera MG, Dal Forno G, Gravina C, Masullo C, Daniele A, Binetti G, Bonvicini C, Squitti R, Palermo MT, Davis DG, Antuono P, Wekstein DR, Dobrina A, Gennarelli M and Fazio VM (2005) Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 26, 455-464.

Sheehan D, Meade G, Foley VM and Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1-16.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of

- drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 414-423.
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291-295.
- Sies H and Stahl W (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62, 1315S-1321S.
- Sim WL, Han MY and Huang D (2009) Quantification of antioxidant capacity in a microemulsion system: synergistic effects of chlorogenic acid with alpha-tocopherol. *J Agric Food Chem* 57, 3409-3414.
- Singleton JW and Laster L (1965) Biliverdin reductase of guinea pig liver. *J Biol Chem* 240, 4780-4789.
- Snyder GH, Cennerazzo MJ, Karalis AJ and Field D (1981) Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry* 20, 6509-6519.
- Somoza V, Lindenmeier M, Wenzel E, Frank O, Erbersdobler HF and Hofmann T (2003) Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. *J Agric Food Chem* 51, 6861-6869.
- Sommerfeld K, Diplomarbeit (2007) Modulierung des Nrf2-Gehaltes von HT29-Zellen durch ausgewählte Kaffeeinhaltsstoffe. *Universität Karlsruhe*.
- Stadler RH, Varga N, Hau J, Vera FA and Welti DH (2002a) Alkylpyridiniums. 1. Formation in model systems via thermal degradation of trigonelline. *J Agric Food Chem* 50, 1192-1199.
- Stadler RH, Varga N, Milo C, Schilter B, Vera FA and Welti DH (2002b) Alkylpyridiniums. 2. Isolation and quantification in roasted and ground coffees. *J Agric Food Chem* 50, 1200-1206.
- Stalmach A, Steiling H, Williamson G and Crozier A (2010) Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch Biochem Biophys* 501, 98-105.
- Steinkellner H, Hoelzl C, Uhl M, Cavin C, Haidinger G, Gsur A, Schmid R, Kundi M, Bichler J and Knasmüller S (2005) Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects lymphocytes against (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: results of controlled human intervention trials. *Mutat Res* 591, 264-275.

- Stennert A and Maier HG (1994) Trigonelline in coffee. II. Content of green, roasted and instant coffee. *Z Lebensm Unters Forsch* 199, 198-200.
- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S and Alam J (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* 278, 2396-2402.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN and Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M and Igarashi K (2002) Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21, 5216-5224.
- Suzen HS, Gucyener E, Sakalli O, Uckun Z, Kose G, Ustel D and Duydu Y (2010) CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Mol Biol Rep* 37, 87-92.

T

- Talalay P, De Long MJ and Prochaska HJ (1988) Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8261-8265.
- Talalay P, Fahey JW, Holtzclaw WD, Prestera T and Zhang Y (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett* 82-83, 173-179.
- Tao KS, Wang W, Wang L, Cao DY, Li YQ, Wu SX and Dou KF (2008) The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. *Med Hypotheses* 71, 730-736.
- Tavani A and La Vecchia C (2004) Coffee, decaffeinated coffee, tea and cancer of the colon and rectum: a review of epidemiological studies, 1990-2003. *Cancer Causes Control* 15, 743-757.
- Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW and Biswal S (2006) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest* 116, 984-995.

- Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M and Biswal S **(2002)** Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 62, 5196-5203.
- Tohda C, Nakamura N, Komatsu K and Hattori M **(1999)** Trigonelline-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biol Pharm Bull* 22, 679-682.
- Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T and Yamamoto M **(2006a)** Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 26, 2887-2900.
- Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F and Yamamoto M **(2006b)** Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* 387, 1311-1320.
- Townsend DM **(2007)** S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv* 7, 313-324.
- Townsend DM and Tew KD **(2003)** The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369-7375.
- Trinh K, Andrews L, Krause J, Hanak T, Lee D, Gelb M and Pallanck L **(2010)** Decaffeinated coffee and nicotine-free tobacco provide neuroprotection in Drosophila models of Parkinson's disease through an NRF2-dependent mechanism. *J Neurosci* 30, 5525-5532.

U

- Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, de Cabo R and Csiszar A **(2010)** Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H18-24.
- Urgert R, Schulz AG and Katan MB **(1995)** Effects of cafestol and kahweol from coffee grounds on serum lipids and serum liver enzymes in humans. *Am J Clin Nutr* 61, 149-154.

V

- van Dam RM **(2006)** Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16, 69-77.

- van Dam RM and Hu FB (2005) Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA* 294, 97-104.
- van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ and van Dam RM (2009) Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care* 32, 1023-1025.
- Vasiliou V, Puga A, Chang CY, Tabor MW and Nebert DW (1995) Interaction between the Ah receptor and proteins binding to the AP-1-like electrophile response element (EpRE) during murine phase II [Ah] battery gene expression. *Biochem Pharmacol* 50, 2057-2068.
- Velichkova M and Hasson T (2005) Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol* 25, 4501-4513.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Venugopal R and Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14960-14965.
- Venugopal R and Jaiswal AK (1998) Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145-3156.
- Viani R, Horman I (1974) Thermal behavior of trigonelline. *J Food Sci* 39, 1216-1217.
- Volz N, Diplomarbeit (2007) Der Einfluss polyphenolreicher Extrakte auf Elemente zellulärer Signaltransduktionskaskaden *in vitro*. *Universität Karlsruhe*.
- Votavová L, Voldrich M, Sevcki R, Cizkova H, Mlejnecka J, Stolar M and Fleism T (2009) Changes of Antioxidant Capacity of Robusta Coffee during Roasting. *Czech J Food Sci* 27, Special Issue.

W

- Wada T, Gao J and Xie W (2009) PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 20, 273-279.

- Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW and Talalay P (2004) Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2040-2045.
- Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD and Yamamoto M (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 35, 238-245.
- Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S and Kensler TW (2010) When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxid Redox Signal*.
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP and Williams RL (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 6, 909-919.
- Walsh AC, Feulner JA and Reilly A (2001) Evidence for functionally significant polymorphism of human glutamate cysteine ligase catalytic subunit: association with glutathione levels and drug resistance in the National Cancer Institute tumor cell line panel. *Toxicol Sci* 61, 218-223.
- Wang H and Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27, 612-616.
- Wang X, Tomso DJ, Chorley BN, Cho HY, Cheung VG, Kleeberger SR and Bell DA (2007) Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum Mol Genet* 16, 1188-1200.
- Watai Y, Kobayashi A, Nagase H, Mizukami M, McEvoy J, Singer JD, Itoh K and Yamamoto M (2007) Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* 12, 1163-1178.
- WHO Library Cataloguing in Publication Data (2002) National cancer control programmes: policies and managerial guidelines 2nd ed.
- Wilks A (2002) Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid Redox Signal* 4, 603-614.
- Williams CH (1976) Flavin-containing dehydrogenases. *Enzymes* 13, 89-173.
- Williams RT (1967) Comparative patterns of drug metabolism. *Fed Proc* 26, 1029-1039.

- Wingler K, Bocher M, Flohe L, Kollmus H and Brigelius-Flohe R (1999) mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem* 259, 149-157.
- Wong CC, Meinel W, Glatt HR, Barron D, Stalmach A, Steiling H, Crozier A and Williamson G (2009) In vitro and in vivo conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans. *J Nutr Biochem*.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR and Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134, 489-492.
- Wu X, Skog K and Jagerstad M (1997) Trigonelline, a naturally occurring constituent of green coffee beans behind the mutagenic activity of roasted coffee? *Mutat Res* 391, 171-177.
- Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD and Panayotou G (1996) Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16, 1722-1733.

Y

- Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A, Ishii Y, Kure S, Koyama A, Sakamoto T, Sekizawa K, Motohashi H and Yamamoto M (2004) Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 72-79.
- Yang H, Magilnick N, Lee C, Kalmaz D, Ou X, Chan JY and Lu SC (2005) Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF-kappaB and AP-1. *Mol Cell Biol* 25, 5933-5946.
- Yang MS, Chan HW and Yu LC (2006) Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology* 226, 126-130.
- Yang Y, Chen Y, Johansson E, Schneider SN, Shertzer HG, Nebert DW and Dalton TP (2007) Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. *Biochem Pharmacol* 74, 372-381.
- Yeh CT and Yen GC (2006) Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr* 136, 11-15.

- Yen WJ, Wang BS, Chang LW and Duh PD (2005) Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem* 53, 2658-2663.
- Yoshinari O, Sato H and Igarashi K (2009) Anti-diabetic effects of pumpkin and its components, trigonelline and nicotinic acid, on Goto-Kakizaki rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 1033-1041.
- Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J and Kong AN (1999) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 274, 27545-27552.
- Yu R, Tan TH and Kong AN (1997) Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 272, 28962-28970.
- Yuyama S and Kawano Y (1996) Urinary excretion of N1-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid and the fate of remaining of trigonelline. *Adv Exp Med Biol* 398, 599-603.
- Yuyama S and Suzuki T (1991) The excretion of N1-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid and related compounds in human subjects after oral administration of nicotinic acid, trigonelline and N1-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid. *Adv Exp Med Biol* 294, 475-479.

Z

- Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F and van den Brandt PA (2004) The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21, 392-401.
- Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K and Igarashi K (2007) Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol Cell Biol* 27, 6962-6971.
- Zhang DD and Hannink M (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23, 8137-8151.
- Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ and Hannink M (2004) Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 24, 10941-10953.

- Zhang Y (2001) Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. *Carcinogenesis* 22, 425-431.
- Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL and Li Y (2005) Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* 579, 3029-3036.
- Zill H, Bek S, Hofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, Weigle B, Erbersdobler HF, Scheidler S, Busch AE and Faist V (2003) RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 311-315.
- Zipper LM and Mulcahy RT (2002) The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem* 277, 36544-36552.

8 Anhangsverzeichnis

8.1 Abstrakt der Dissertation (deutsch)

8.2 Abstract (englisch)

8.3 Publikationsliste

8.4 Verwendete Formeln

8.5 Dank

8.6 Lebenslauf

8.1 Abstract der Dissertation (deutsch)

Im Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch drei Kaffees bzw. deren Extrakte (KEs) die durch Röstung als Merkmal unterschiedliche Gehalte der Inhaltsstoffe *n*-Chlorogensäure (CGA) und *N*-Methylpyridinium besitzen.

Alle drei KEs vermittelten in den verschiedenen Testsystemen *in vitro* in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) eine Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme. Die zwei NMP-reichen KEs, NMP-KE sowie Brazil Blend (BB)-KE, zeigten eine potente Aktivierung der Nrf2 Kerntranslokation. Als Weiterleitung des Signales ließ sich eine Zunahme ARE-regulierter Gentranskripte ausgewählter Phase II Enzyme nach 3 h und 24 h Inkubation mit NMP-KE und BB-KE mittels Real Time PCR beobachten. Ebenso induzierte der CGA-reiche CGA-KE potent die Gentranskription ausgewählter Phase-II-Enzyme nach 3 h und 24 h. Eine Steigerung der Glutathion-S-Transferase (GST)-Enzymaktivität konnte für BB-KE und CGA-KE nach 24 h und 48 h festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob Kaffee Brazil Blend auch *in vivo* eine Induktion der Transkription von Phase-II-Enzymen und Nrf2 aufweist, wurde dieser im Rahmen einer humanen Interventionsstudie eingesetzt. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Nrf2 Gentranskription in peripheren Blutlymphozyten nach vierwöchiger Intervention mit Kaffee Brazil Blend im Mittel aller Probanden.

Durch die Untersuchung der Bioaktivität einzelner Kaffeeinhaltsstoffe in HT29-Zellen gelang die genauere Charakterisierung des Kaffeeinhaltsstoffes Trigonellin. Im pM bis nM Konzentrationsbereich ließ sich nach der Inkubation mit Trigonellin eine Abnahme des Gesamtproteingehaltes von Nrf2 beobachten, was sich nachgeschaltet auch in einer Abnahme an Gentranskripten von einzelnen Phase-II-Enzymen widerspiegelte. Im Gegensatz dazu zeigte die Koinkubation von Trigonellin und CGA in konsumrelevanten Konzentrationen sowohl eine signifikante Zunahme der Transkriptgehalte der GSTT1, NQO1, HO1 und Nrf2 als auch eine signifikante Steigerung der GST-Enzymaktivität. Möglicherweise stellen die Kaffeeinhaltsstoffe CGA und Trigonellin eine Wirkstoffkombination dar, die eine zentrale Rolle beim chemopräventiven Potential, im Sinne einer Steigerung der enzymatischen Abwehr, von Kaffee einnehmen.

8.2 Abstract (englisch)

Focus of this work was to characterize the influence on ARE-regulated phase-II-enzymes by three coffees respectively coffeeextracts (KEs), which differ in the amounts of *n*-chlorogenic acid (CGA) und *N*-methylpyridinium (NMP) due to distinct roasting conditions.

All three KEs showed bioactive effect in human colon carcinoma cells (HT29) within the investigated test systems. A potent activation of Nrf2 translocation could be observed by NMP-rich coffees, NMP-KE and Brazil Blend (BB)-KE. Both extracts increased gene transcription of phase II enzymes after 3 h and 24 h of incubation, indicating a downstream transference of the Nrf2 signal. Furthermore, the CGA-rich CGA-KE demonstrated a significant elevation of phase II gene transcription, as well. The BB-KE and CGA-KE were also identified as potent inducers of glutathione S-transferases (GST) enzyme activity.

To assign the bioactivity of coffee Brazil Blend in the *in vivo* situation a human intervention study was conducted. A four weeks consumption of coffee Brazil Blend significantly increased the Nrf2 gene transcription in peripheral blood lymphocytes in the average of the participants.

Furthermore this work could be characterized in more detail the coffee constituent trigonelline. The incubation of HT29-cells with trigonelline led to a decrease of Nrf2 protein level. In addition a significant down regulation in gene transcription of selected phase II enzymes was verified. In contrast, the combination of trigonelline and CGA was found to elevate significantly the transcript level of GSTT1, NQO1, HO1 und Nrf2 as well as the GST-enzyme activity. It is tempting to speculate that the combination of trigonelline and CGA could induce the enzymatic defence. Thus trigonelline and CGA play possibly a central role for the chemopreventive properties of coffee.

8.3 Publikationsliste

- **Nadine Volz**, Ute Boettler, Gudrun Pahlke, Nicole Teller, Herbert Stiebitz, Gerhard Bytof, Ingo Lantz, Roman Lang, Thomas Hofmann, Rudolf Eggers and Doris Marko (2010) coffee consumption induces Nrf2 transcription in humans (in preparation)
- **Nadine Volz**, Ute Boettler, Nicole Teller and Doris Marko (2010) Potent induction of phase-II-enzymes by combination of the coffee components trigonelline and chlorogenic acid in HT29 colon carcinoma cells (in preparation)
- Ute Boettler, Katharina Sommerfeld, **Nadine Volz**, Gudrun Pahlke, Nicole Teller, Veronika Somoza, Roman Lang, Thomas Hofmann, Doris Marko. (2010) Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. J Nutr Biochem. Epub ahead of print
- Fridrich D, Kern M, Pahlke G, **Volz N**, Will F, Dietrich H, Marko D (2007) Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. Mol. Nutr. Food Res. 51(5), 594-601
- Ute Boettler, **Nadine Volz**, Gudrun Pahlke, Nicole Teller, Christine Kotyczka, Veronika Somoza, Herbert Stiebitz, Gerhard Bytof, Ingo Lantz, Roman Lang, Thomas Hofmann, Rudolf Eggers and Doris Marko (2010) Coffees rich in chlorogenic acid or *N*-methylpyridinium as inducers of chemopreventive phase II enzymes via the Nrf2/ARE pathway *in vitro* and *in vivo* (in preparation)

Posterbeiträge

- GDCh-Jahrestagung Chemie 2008 in Kaiserslautern, 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag 08.09.-10.09.2008. U. Boettler, M. Fehr, G. Pahlke, **N. Volz**, C. Kropat, M. Esselen, S. Bächler und D. Marko, Induktion von oxidativem Stress durch das Mykotoxin Alternariol
- 30. Mycotoxin Workshop, Utrecht, Netherlands, 28.04-30.04. 2008. M. Fehr, U. Boettler, **N. Volz**, C. Kropat, G. Pahlke, M. Esselen and D. Marko. Induction of oxidative stress by Alternaria toxins

8.4 Verwendete Formeln

Lineare Regression

$$y = mx + b$$

y-Achsenabschnitt (A):

$$A = \frac{\left(\sum_i y_i \right) \left(\sum_i x_i^2 \right) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum (x_i \cdot y_i) \right)}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n \sum (x_i \cdot y_i) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i y_i \right)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i \right)^2$$

Fehler der Steigung (m_B):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnittes (m_A):

$$m_A = \sqrt{\frac{S \sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

Arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$)

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung (σ_{n-1})

$$\sigma_{n-1} = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ausreißertest nach Nalimov (r)

$$r = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\sigma_{n-1}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}} \quad x^* : \text{Testwert}$$

Ausreißerkriterium: $x^* = \text{Ausreißer}$, wenn $r >$

1,409	bei n = 3
1,645	bei n = 4
1,757	bei n = 5
1,814	bei n = 6
1,848	bei n = 7
1,870	bei n = 8

8.5 Dank

Puh geschafft, die Dissertation ist fertig. Zahlreiche Leute haben allerdings ihren Teil dazu beigetragen und denen will ich die folgenden Seiten widmen.

Mein Dank gilt

...zu allererst Doris, die mir diese Arbeit durch ihr in mich gesetztes Vertrauen ermöglicht hat und mir damit die Tür zur faszinierenden Welt der Wissenschaft öffnete. Ebenso danke ich Gudrun, die für mich immer eine zuverlässige Anlaufstelle war, bei Fragen im Bereich der Gentranskriptionsuntersuchungen.

... Prof. Somoza (DGE), Prof. Eisenbrand (TU Kaiserslautern) für die Unterstützung im Rahmen der Humanstudien sowie Prof. Hofmann (TU München) für die Bereitstellung der Testsubstanzen. Insbesondere möchte ich mich bei Roman Lang, Tamara Bakuradze und Christine Kotyczka für die gute Zusammenarbeit im Projekt und die netten Stunden während der Projekttreffen bedanken.

...meinen tollen Kollegen im Arbeitskreis: Diana, Jessi, Melanie, Matthias und Costa standen mir mit Rat und Tat zu Seite und trugen wesentlich dazu bei, dass ich mich von Anfang an wohlfühlt habe. Ein ganz besonderer Dank geht an meine wagemutigen Kollegen Ute, Nicole, Helge, Christoph, Volker, Christopher, Joanna, Simone und Swantje, die mit mir das „Abenteuer Wien“ eingegangen sind. In den letzten Monaten haben wir echt viel Neues, Spannendens manchmal auch Nervenaufreibendes zusammen erlebt und dennoch mir bleibt nur eins zu sagen: Ich werde euch vermissen!

...Volker, der es schafft mich mit seinem unübertrefflichen Humor immer wieder zu begeistern und die Welt ein Stück fröhlicher werden lässt.

...Nicole, auf die ich in den letzten Monaten durch ihren engagierten Einsatz als Korrekturleserin und Ratgeberin bei Fragen rund um die Promotion immer zählen konnte. Im besonderen Maße danke ich Nicole allerdings für die vielen gemeinsamen Unternehmungen, durch die wir Wien Stück für Stück entdecken konnten und wir so eine unvergessliche Zeit hatten.

...Ute, meiner Projektpartnerin der Kaffeestudie, die mir mit ihrer Hilfsbereitschaft, ihrer kollegialen Art und ihrer Freundschaft treu zu Seite stand - ich finde wir waren ein spitzen Team.

...meiner Schwester Sarah und Simone, die mir durch kritisches Lesen und Kommentieren dieser Dissertation eine große Hilfe waren.

...meinen Freunden in der Heimat: Simone, Bianca, Sarah, Gräfel, Alexandra und René die sich immer wenn ich mal wieder im „Ländle“ bin, Zeit nehmen um den Geschichten aus der großen Stadt zu lauschen und bei Kurt-Cobain-Lagerfeuerabenden die Promotion weit weg erscheinen lassen.

...meiner tollen Mama, die mich immer unterstützte und für mich der „Fels in der Brandung“ bedeutet.

...Christian, mein Begleiter. Selbst 800 Kilometer gegen Osten schrecken dich nicht ab, mit mir nach Wien zu kommen um mir durch deine Nähe und Tatkraft das Gefühl zu geben einen wundervollen Menschen an meiner Seite zu wissen.

8.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadine Volz
Wohnort: Sturzgasse 46/29
1150 Wien, Österreich
Geburtsdatum: 06.02.1982
Geburtsort: Achern
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988-07/1992 Grundschule Gamshurst
09/1992-07/1998 Robert-Schuman Realschule Achern
09/1998-07/2001 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Offenburg
26/06/2001 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2001-06/2007 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)
02/04/2004 Erster Abschnitt (Vordiplom) der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
11/2006-06/2007 Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie mit dem Thema „Der Einfluss polyphenolreicher Extrakte auf Elemente zellulärer Signaltransduktionskaskaden in vitro“
05/06/2007 Zweiter Prüfungsabschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker und Abschluss des Studiengangs Diplom Lebensmittelchemie

07/2007-05/2009	Promotionsarbeit im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. D. Marko an der Universität Karlsruhe am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie
06/2009-10/2009	Fertigstellung der Promotionsarbeit im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. D. Marko an der Universität Wien, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie
seit 2007	Weiterbildung zur Fachtoxikologin DGPT

Hiermit bestätige ich, Nadine Volz die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Wien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Wien, den
