



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Modulation proliferationsassoziierter Parameter der
Bioaktivität eines Heidelbeerextrakts (*Vaccinium
myrtillus* L.) mittels Fraktionierung bzw.
Mikroformulierung“

Verfasser

Diplom Lebensmittelchemiker Christopher Kropat

angestrebter akademischer Grad

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 791 419

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt: Chemie

Betreuerin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

Für meine Mutter

„Kids, you tried your best and you failed miserably. The lesson is, never try.“

Homer Simpson

Prüfungskommission:

Univ.-Prof. Dr. M. Cichna-Markl (Vorsitz)

Univ.-Prof. Dr. D. Marko

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. M. Murkovic

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2008 bis Juni 2009 im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Doris Marko im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie der chemischen Fakultät der Universität Karlsruhe begonnen. Nach einem Standortwechsel der Arbeitsgruppe an die Universität Wien wurde die Arbeit von Juli 2009 bis Oktober 2012 im Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der chemischen Fakultät der Universität Wien ebenfalls unter der Betreuung von Frau Univ.-Prof. Dr. Doris Marko abgeschlossen.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. D. Marko für die Vergabe der interessanten Aufgabenstellung und des Arbeitsplatzes sowie ihrer ausgezeichneten Betreuung und intensiven Förderung. Weiterhin danke ich den Gutachtern Frau Univ.-Prof. M. Cichna-Markl und Herrn Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. M. Murkovic.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Der EGFR-Signalweg	3
2.1.1	Aufbau und Struktur der ErbB-Rezeptorfamilie	3
2.1.2	Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung	4
2.1.3	Nachgeschaltete Signalwege	6
2.1.4	Relevanz von RTK und nachgeschalteter Signalelemente in der Tumorgenese	8
2.1.5	Der EGFR als Target in der Chemotherapie	9
2.2	Der Nrf2/Keap1-Signalweg	11
2.2.1	Strukturelle Eigenschaften von Nrf2	11
2.2.2	Strukturelle Eigenschaften von Keap1	12
2.2.3	Der Nrf2/Keap1-Komplex	12
2.2.4	Das ARE (<i>antioxidant responsive element</i>)	13
2.2.5	Molekulare Grundlagen der Nrf2-Aktivierung	13
2.2.6	Aktivierung durch ROS	16
2.2.7	Aktivierung durch direkte Induktoren (<i>small Molecules</i>)	16
2.2.8	Aktivierung durch vorgeschaltete Signalkaskaden	20
2.2.9	Nrf2/ARE-abhängige Gene	22
2.2.10	Die Rolle des Nrf2/Keap1-Signalwegs in Tumorgenese und -therapie	25
2.3	Topoisomerasen	26
2.3.1	Klassifizierung	26
2.3.2	Topoisomerasehemmstoffe	26
2.4	Anthocyane	29
2.4.1	Struktur	29
2.4.2	Stabilität	30
2.4.3	Vorkommen	32
2.4.4	Aufnahme	35
2.4.5	Metabolisierung und Ausscheidung	37
2.4.6	Wasserstoffperoxidbildung in Zellkultursystemen	38
2.5	Biologische Wirkung von Anthocyanen	40
2.5.1	Antioxidative Eigenschaften	40
2.5.2	Chemopräventive Eigenschaften	43

2.6	Verkapselungsmethoden von Lebensmittelinhaltsstoffen	48
2.6.1	Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln (MPK)	49
2.6.2	Pektinamidbasierte Hohlkapseln (PHK)	50
2.6.3	Doppelemulsionsbasierte multidisperse Hüllkapseln (DMH)	50
2.6.4	Citruspektinkapseln (CPK)	51
3	Problemstellung	53
4	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Anthocyanfreisetzung aus Kapselsystemen	55
4.1.1	Unverkapselter HBE	57
4.1.2	Extraktbeladene MPK	59
4.1.3	Extraktbeladene PHK	59
4.1.4	Vergleich der Kapselsysteme	62
4.2	Modulation der HBE-Bioaktivität durch Verkapselung <i>in vitro</i>	65
4.2.1	Beeinflussung der EGFR-Aktivität	65
4.2.2	Beeinflussung des Tumorzellwachstums	81
4.2.3	Potentiell adverse Effekte durch Topoisomerasegiftung	87
4.3	Bioaktivität ausgewählter HBE-Subfraktionen und isolierter Inhaltsstoffe	89
4.3.1	Cyanidin und Cy-3-glc	89
4.3.2	HBE-Subfraktionen	92
4.3.3	Einfluss auf die EGFR-Aktivität	95
4.3.4	Chlorogensäure	101
4.3.5	Einfluss auf das Zellwachstum	103
4.4	Einfluss auf die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene	107
4.4.1	Bioaktivität HBE-beladener Kapselsysteme <i>in vivo</i>	107
4.4.2	Bioaktivität ausgewählter HBE-Inhaltsstoffe und -Abbauprodukte <i>in vitro</i>	114
4.5	Gesamtdiskussion	117
5	Zusammenfassung	145
6	Material und Methoden	149
6.1	Mathematische Berechnungen	149
6.2	Zellkultur	151
6.2.1	Verwendete Zelllinien	151
6.2.2	Wechseln des Zellkulturmediums	151
6.2.3	Passagieren der Zelllinien	151
6.2.4	Einfrieren von Zellen	152
6.2.5	Auftauen von Zellen	152
6.2.6	Mykoplasmentest	153
6.2.7	Zellzahlbestimmung	153
6.2.8	Inkubation mit Testsubstanzen bzw. Kapselsystemen	154

6.2.9	Lösungen	154
6.3	Quantitative Real-Time PCR	156
6.3.1	Zellinkubation	156
6.3.2	RNA-Isolierung	156
6.3.3	RNA-Integrität	157
6.3.4	Reverse Transkription	158
6.3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	159
6.3.6	SYBR Green I	160
6.3.7	Quantifizierung	160
6.4	Proteinbestimmung nach Bradford	162
6.5	Western Blot Analyse zur Bestimmung der EGFR-Aktivität	164
6.5.1	Gelelektrophorese	164
6.5.2	Proteintransfer	168
6.5.3	Immunodetektion	169
6.6	HPLC-Analytik	171
6.7	Konzeption der Humanstudie	174
6.7.1	Verzehr von Extrakt bzw. Kapseln und diätetischer Verlauf der Studie	174
6.7.2	Probennahme	175
6.7.3	Isolierung von PBMC	175
6.8	WST-1-Assay	177
6.9	Sulforhodamin-B-Assay	178
6.10	Trypanblauausschlusstest	180
6.11	ICE-Bioassay	181
6.12	Nrf2-Luciferase-Reportergenassay	185
6.13	Chemikalien	187
6.14	gebrauchsfertige Lösungen	189
6.15	Verwendete Kits	190
6.16	Proteine, Nukleinsäuren	190
6.17	Verbrauchsmaterialien	190
6.18	Geräte	191
7	Literaturverzeichnis	193
8	Anhang	235

Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten, daraus abgeleitete Größen sowie geläufige Abkürzungen sind nicht aufgelistet.

AF	Anthocyanhaltige Subfraktion
Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbonrezeptor
ÄK	Äquivalenzkonzentration
AMP	Adenosinmonophosphat
-arab	-arabinosid
AP-1/2	Transkriptionsfaktoren (<i>Activator protein 1</i>)
APC ^{Min}	Verlust des Adenomatöses Polyposis Coli Protein/Gen
APS	Ammoniumdioxopersulfat
AR	Amphiregulin
ARE	Antioxidationsresponsives Element (<i>Antioxidant responsive element</i>)
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ASK	Apoptosesignalregulierte Kinase 1
Asp	Asparagin
ATF1	Transkriptionsfaktor (<i>cAMP-dependent transcription factor</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Kurvenintegral (<i>Area under the curve</i>)
BAD, Bax	Proapoptotische Proteine
Bcl-2	Familie pro- bzw. antiapoptotischer Proteine
2-BHA	2(3)- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol
BR	Biliverdinreduktase
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	Keap1-Domäne (<i>Broad-complex, tramtrack and bric-à-brac</i>)
BTC	Betacellulin
bZIP	Proteinmotiv (<i>Basic leucine zipper</i>)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBG	Zytosolische β -Glucosidase
CDDO	2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure
CDDO-Im	CDDO-Imidazolid
CF	Kopigmentfraktion
c-Fos	Transkriptionsfaktor
CFp	Kopigmentfraktion, polar
CFu	Kopigmentfraktion, unpolar

c-Myc	Transkriptionsfaktor
CNC	Proteinmotiv (<i>Cap'n'collar</i>)
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CPK	Citruspektinkapseln
CREB	Transkriptionsfaktor (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
CTR	C-terminale Region
Cy	Cyanidin
CVD	Herz-Kreislaufkrankung
DAD	Diodenarraydetektor
DAG	Diacylglycerol
DCF	2',7'-Dichlordihydrofluorescein
Del	Delphinidin
Del-3,5-diglc	Delphinidin-3,5-di- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid
DLG	Aminosäuremotiv
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMH	Doppelmulsionsbasierte, multidisperse Hüllkapseln
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominantnegative Kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAB	DNA-Bindungsdomäne von Nrf2
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Elk-1/2	Transkriptionsfaktoren (<i>Ets-like kinase 1/2</i>)
EP	Epigen
EPG	Epiregulin
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinase
ETGE	Aminosäuremotiv
FF	Anthocyanfreie Subfraktion
FKS	Fötales Kälberserum
FRAP	Methode zur Erfassung antioxidativer Kapazität (<i>Ferric reducing antioxidant potential assay</i>)
GA	Gallussäure
-gal	-galactosid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
γ -GC	γ -Glutamylcystein
γ -GCL	γ -Glutamylcysteinyligase
GDH	UDP-Glucose-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt

-glc	-glucosid
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
-gluc	-glucuronid
-glyc	-glycosid
Gly	Glycin
GPCR	G-Proteingekoppelte Rezeptor (<i>G protein coupled receptor</i>)
GPx	Glutathionperoxidase
Grb2	Adapterprotein (<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>)
GRE	Glucocorticoidresponsives Element
GS	Glutathionsynthase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GSK	Glycogensynthasekinase
GSR	Glutathionreduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
HB-EGF	Heparinbindender EGF
HBE	Heidelbeerextrakt 25 % (Symrise)
HMG14	DNA-bindendes Protein (<i>High mobility group protein 14</i>)
HO-1	Hämoxigenase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HT29	Humane Kolonkarzinomzelllinie
IP	Ileostomieprobanden
IP3	Inositoltriphosphat
IVR	Keap1-Domäne (<i>Intervening region</i>)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KP	Kontrollprobanden
4-KPR	4-Ketopinoresinol
LDL	Lipoprotein (<i>Low density lipoprotein</i>)
Leu	Leucin
LPH	Lactat/Phloridzin-Hydrolase
LOEL	Niedrigste Substanzkonzentration mit Wirkung (<i>Lowest observed effect level</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>Limit of Quantification</i>)
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MEK1/2	MAPKK/ERK-Kinasen
MP	Molkenprotein
MPK	Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln
MSK1/2	Mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase 1/2
Mv	Malvidin
mTOR	Rapamycinbindendes Protein (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)

mTORC2	mTOR-Komplex (<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>)
Neh1 – 6	Nrf2-Domänen (<i>Nrf2-ECH homology</i>)
NF- κ B	Transkriptionsfaktor (<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>)
NOEC	Höchste Substanzkonzentration ohne Wirkung (<i>No observed effect concentration</i>)
NQO1	NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase 1
NRG	Neuregulin
Nrf2	Transkriptionsfaktor (<i>NF-E2 related factor-2</i>)
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>Non small cell lung cancer</i>)
NTR	N-terminale Region
ORAC	Methode zur Erfassung antioxidativer Kapazität (<i>Oxygen radical absorbance capacity assay</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre peripheren Blutzellen
PCA	Protocatechusäure
PCDL	Phosphatidylcholinabgereichertes Lecitin (<i>Phosphatidylcholine-depleted lecithin</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PDGFR	Blutplättchenwachstumsfaktorrezeptor (<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>)
PDPK1	Phosphatidylinositolabhängige Proteinkinase 1 (<i>Phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1</i>)
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PEITC	Phenethylisothiocyanat
Peo	Peonidin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PF	Polymerfraktion
PGA	Phloroglucinolaldehyd
PHK	Pektinamidbasierte Hohlkapseln
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA/B/C	Proteinkinase A/B/C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pt	Petunidin
PTB	Phosphotyrosinbindende Domäne

qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Rbx1	Ring Box Protein 1
-rham	-rhamnosid
RK	Realkonzentration
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RSK	Ribosomale S6-Kinase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SA	Syringasäure
SAAD	Entzug schwefelhaltiger Aminosäuren (<i>Sulfur amino acid deprivation</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Ser	Serin
SH2	Proteinbindungsdomäne (<i>Sarc homology 2</i>)
SOD	Superoxiddismutase
SOS	Adapterprotein (<i>Son of Sevenless</i>)
SRB	Sulforhodamin B
SRF	Transkriptionsfaktor (<i>Serum response factor</i>)
Src	Tyrosinkinase
TCA	Trichloressigsäure
<i>t</i> -BQ	<i>tert</i> -Butylchinon
<i>t</i> -BHQ	<i>tert</i> -Butylhydrochinon
TEAC	Methode zur Erfassung antioxidativer Kapazität (<i>Trolox-equivalent antioxidant capacity assay</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF α	Transformierender Wachstumsfaktor α (<i>Transforming Growth Factor α</i>)
Thr	Threonin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
t_R	Retentionszeit
Tyr	Tyrphostin AG1478
Ub	Ubiquitin
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>)
WST-1	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (<i>Water-soluble tetrazolium salt</i>)
XRE	Xenobiotikaresponsive Element
-xyl	-xylosid

1 Einleitung

Der demographische Wandel führt insbesondere in Deutschland zu einem Umbau der Alterszusammensetzung hin zu älteren Menschen und begünstigt somit Krebserkrankungen, deren Erkrankungsgipfel im höheren Alter liegt [Pritzkeleit *et al.*, 2010]. So stellen Tumorerkrankungen nach Krankheiten des Herzkreislaufsystems in Deutschland (2009) die zweithäufigste, natürliche Todesursache dar [Statistisches Bundesamt, 2011]. Die Inzidenz an Krebs zu erkranken, wird neben Umweltfaktoren vor allem durch die Lebensweise, insbesondere die Ernährung, beeinflusst [Parkin *et al.*, 2011]. Die Nachfrage nach Nahrungsmitteln, die sich präventiv auf die Gesundheit auswirken, ist daher gegenwärtig hoch. Insbesondere der Konsum von Obst und Gemüse, die reich an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen sind, ist im Fokus der Präventionsforschung [Boeing *et al.*, 2006, González *et al.*, 2006]. Insbesondere Anthocyane wurden in zahlreichen *in vitro* und *in vivo*-Studien ein hohes Maß an potentiell chemopräventiven Wirkungen zugeschrieben [Rossi *et al.*, 2006, Cooke *et al.*, 2005, 2006]. Die regelmäßige Zufuhr von frischem Obst und Gemüse stellt sich jedoch für viele Menschen, vor allem im beruflichen Alltag, als schwierig heraus. *Functional Food* bietet dem Verbraucher den Brückenschlag, sich möglichst unkompliziert zu ernähren und dennoch ausreichend präventive Pflanzeninhaltsstoffe zu sich zu nehmen [Roberts Jr., 2009]. Eine Vielzahl angereicherter Lebensmittel ist bereits auf dem Markt und erfreut sich großer Beliebtheit beim Konsumenten [BFEL, 2005].

Mikro- und Nanoverkapselung stellen Werkzeuge der Lebensmittelindustrie dar, mit denen die Mengen an Phytochemikalien in Nahrungsmitteln substanziell erhöht werden können, ohne dass sensorische Nachteile in Kauf genommen werden müssen [Champagne und Fustier, 2007]. Gleichzeitig können durch diese Formulierungen die oftmals sensiblen Substanzen in der Lebensmittelmatrix stabilisiert werden. Anthocyane weisen außerhalb der pflanzlichen Zelle im neutralen Medium eine niedrige Stabilität auf [Jackman *et al.*, 1987]. Darüber hinaus besitzen anthocyanreiche Pflanzenextrakte oft einen intensiv adstringenten, metallischen Geschmack und färben Lebensmittel dunkel. Durch Verkapselung solcher Extrakte können sensible Verbindungen, beispielsweise durch Absenken des pH-Werts innerhalb der Kompartimente, im Lebensmittel stabilisiert und unerwünschte sensorische Eigenschaften maskiert werden. Darüber hinaus lassen sich über Coatingmaterial und -schichtdicke Freisetzungsort und -geschwindigkeit der verkapselten Inhaltsstoffe einstellen, sodass Stabilität und Bioverfügbarkeit im Gastrointestinaltrakt beeinflusst werden können [Gouin, 2004].

Die Verkapselung von anthocyanreichen Extrakten zur Einbringung in Lebensmittel, wie Sauermilchprodukte oder Konfitüren, stellt ein aussichtsreiches Verfahren dar, bei gleichzeitiger Einsparung von Rohstoffen die Bioaktivität, beispielsweise chemopräventive

Eigenschaften, zu steigern. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Verkapselungsart auf die Bioaktivität eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts an verschiedenen Parametern *in vitro* und *in vivo* untersucht. Im Fokus stand außerdem die zweckmäßige Einbringung der makroskopischen Partikel in Zellkultursysteme und die Identifizierung bioaktiver Substanzgruppen im verwendeten Extrakt. Als biologische Endpunkte wurden *in vitro* der Einfluss auf den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), die Aktivität von Topoisomerasen und das Wachstum von Kolonkarzinomzellen gewählt. *In vivo* sollte der Einfluss des Extrakts vor und nach Verkapselung auf die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in menschlichen Blutzellen betrachtet werden. Die Untersuchungen leisten einen Beitrag zur Optimierung von Verkapselungsmethoden hinsichtlich chemopräventiver Eigenschaften von Phytochemikalien. Die vorliegende Arbeit verschreibt sich somit dem Ziel, einen konkreten Beitrag zur Entwicklung von Verkapselungssystemen zu leisten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Der EGFR-Signalweg

Die Dysregulation zellulärer Signalwege durch Überexpression oder Mutationen beteiligter Proteine ist eine häufige Ursache für die Ausbildung von Tumoren. Insbesondere der Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) ist in Neoplasien von Lunge und Kolon häufig entartet [Hynes und Lane, 2005]. Der EGFR-Signalweg stellt daher ein wichtiges zelluläres Ziel in der Chemotherapie und -prävention dar [Arora und Scholar, 2005] und ist eines der Schlüsselemente in der vorliegenden Arbeit. Struktur, Signalweg und die Relevanz in Tumorgenese und -therapie sollen daher im Kontext dieser Arbeit ausführlich erläutert werden.

2.1.1 Aufbau und Struktur der ErbB-Rezeptorfamilie

Der humane EGFR (auch ErbB1 oder Her1) gehört mit den strukturell eng verwandten Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 (auch Her2, Her3 und Her4) zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK). In dieser Familie stellen sie die Klasse der ErbB-Rezeptoren, Glycoproteine mit Molekülmassen zwischen 170 und 200 kDa, dar [Yarden und Slwkowski, 2001].

Der strukturelle Aufbau ist bei allen Mitgliedern homolog: Eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (~ 620 AS) ist über eine α -helikale Transmembrandomäne (~ 23 AS) jeweils mit der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne verbunden (Abbildung 1). Die extrazelluläre Domäne ist zu einem hohen Anteil glycosyliert und kann in vier Subdomänen (I–IV) unterteilt werden [Lax *et al.*, 1988, Zhen *et al.*, 2003]. Die Ligandenbindungsdomänen I und III sowie die cysteinreichen Subdomänen II und IV sind jeweils homolog zueinander. Der hohe Cysteinanteil in diesen Domänen spielt eine Rolle für die Proteinstruktur, da diese insbesondere durch

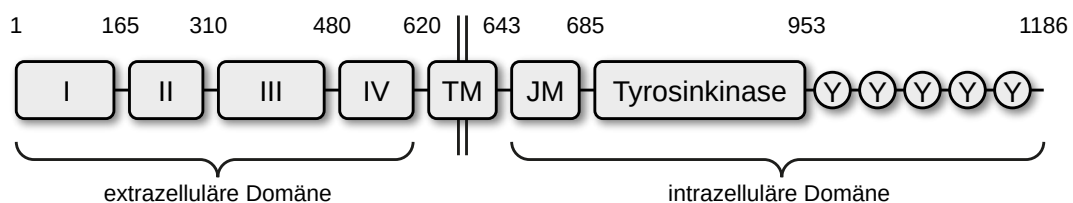


Abbildung 1: Struktureller Aufbau der ErbB-Rezeptoren. Abkürzungen: I–IV: extrazelluläre Subdomänen; JM: Juxtamembrandomäne; TM: Transmembrandomäne; Y: Tyrosinreste der regulatorischen Region. Modifiziert nach Burgess *et al.* [2003].

Disulfidbrücken stabilisiert wird [Abe *et al.*, 1998]. Die intrazelluläre Domäne der ErbB-Rezeptoren ist unterteilt in eine Juxtamembran- (~ 40 AS) und Tyrosinkinasedomäne (~ 260 AS), sowie die C-terminale, regulatorische Region (~ 232 AS), die einen hohen Anteil an Tyrosinresten enthält [Burgess *et al.*, 2003].

Die einzelnen Mitglieder der ErbB-Familie unterscheiden sich vor allem funktionell voneinander. ErbB2 ist nicht in der Lage, Liganden zu binden, besitzt aber eine aktive Kinasedomäne. Im Gegensatz dazu kann ErbB3 zwar Liganden binden, die Kinasedomäne ist jedoch konstitutiv inaktiv [Guy *et al.*, 1994, Burgess *et al.*, 2003]. Die Positionen der phosphorylierbaren Tyrosinreste in der regulatorischen Domäne unterscheiden sich zwischen den ErbB-Rezeptoren. Somit können, in Abhängigkeit des Rezeptors, unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden [Hynes und Lane, 2005]. Die phosphorylierbaren Tyrosinreste in der regulatorischen Region des EGFR befinden sich an den Positionen 992, 1045, 1068, 1086, 1148, und 1173 [Hynes und Lane, 2005].

2.1.2 Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung

Die Bindungsaffinität der ErbB-Rezeptoren zu aktivierenden Liganden ist unterschiedlich. Für den EGFR existieren mindestens sieben verschiedene Peptidliganden: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), transformierender Wachstumsfaktor α (TGF α), heparinbindender EGF (HB-EGF) sowie die vier Neureguline Amphiregulin (AR), Betacellulin (BTC), Epigen (EP) und Epiregulin (EPG) (Abbildung 2) [Harris *et al.*, 2003]. Für ErbB2 existieren keine bekannten, direkt aktivierenden Liganden [Citri *et al.*, 2003]. ErbB3 wird von den Neuregulinen NRG1 und NRG2 aktiviert. Die Aktivierung von ErbB4 erfolgt durch NRG1–4 sowie BTC, HB-EGF und EPR. Die ErbB-Rezeptorliganden werden zunächst als membranständige Proteine exprimiert und schließlich durch proteolytische Spaltung in den extrazellulären Raum sezerniert [Harris *et al.*, 2003].

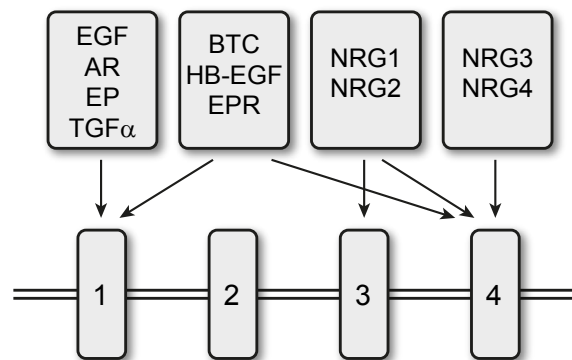


Abbildung 2: Bindung EGF-ähnlicher Liganden an ErbB-Rezeptoren. Abkürzungen: 1: EGFR; 2–4: ErbB2–ErbB4; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; AR: Amphiregulin; TGF α : transformierender Wachstumsfaktor α ; EP: Epigen; BTC: Betacellulin; HB-EGF: heparinbindender EGF; EPR: Epiregulin; NRG1–4: Neuregulin 1–4. Modifiziert nach Olayioye *et al.* [2000], Harris *et al.* [2003].

Im inaktiven Zustand liegen ErbB-Rezeptoren als Monomere vor. Ihre extrazelluläre Domäne nimmt eine autoinhibierte Konformation ein, die eine Dimerisierung mit anderen

Rezeptoren nicht zulässt. Die Bindung eines aktivierenden Liganden, beispielsweise EGF, an die Subdomänen I und III führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoraußenseite, wodurch die Dimerisierungsschleife an Subdomäne II freigelegt wird (Abbildung 3) [Ogiso *et al.*, 2002]. Der aktivierte Rezeptor kann so mit anderen ErbB-Rezeptoren dimerisieren.

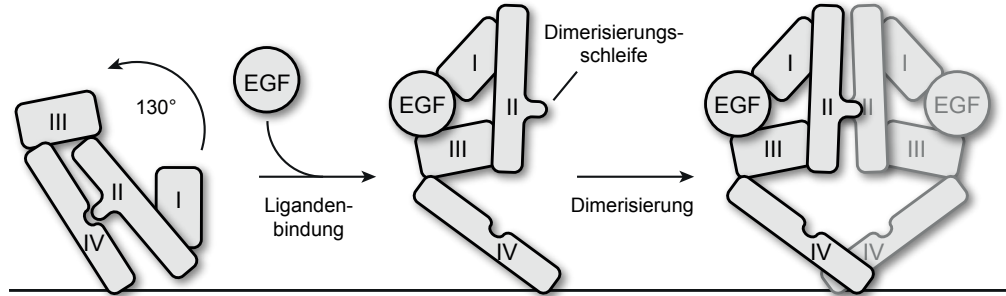


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konformationsänderung durch Ligandenbindung und Homodimerisierung der extrazellulären Domänen zweier EGF-Rezeptoren. Abkürzungen: EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; I–IV: Extrazelluläre Subdomänen. Modifiziert nach Burgess *et al.* [2003].

Sowohl Homodimere zwischen EGFR, ErbB3 und ErbB4 als auch Heterodimere zwischen allen Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie wurden beschrieben [Burgess *et al.*, 2003]. ErbB2-Homodimere können aufgrund der fehlenden Ligandenaffinität nicht gebildet werden, die Monomere fungieren jedoch als bevorzugte Heterodimerisierungspartner der anderen ErbB-Rezeptoren [Tzahar *et al.*, 1996, Graus-Porta *et al.*, 1997]. Das Vorkommen inaktiver Rezeptordimere erweiterte die Theorie der Rezeptoraktivierung durch Dimerisierung: Chung *et al.* [2010] konnten zeigen, dass ligandenfreie Monomere und Dimere in einem steten Gleichgewicht stehen. Die Ligandenbindung verschiebt dieses jedoch zugunsten der Dimere.

Das katalytische Zentrum der Kinasedomäne besteht aus einer Aktivierungsschleife mit einem stark konservierten Tyrosinrest (Tyr₈₄₅) in der C-terminalen Seite der Tyrosinkinasedomäne und einer α -Helix auf der N-terminalen Seite [Stamos *et al.*, 2002]. Die Strukturen im Zentrum sind im monomeren Zustand korrekt ausgerichtet. Dennoch liegt die Kinasedomäne in diesem Zustand autoinhibiert vor. Die Dimerisierung zweier ErbB-Rezeptoren, vermittelt durch deren extrazellulären Domänen, führt zur räumlichen Annähe-

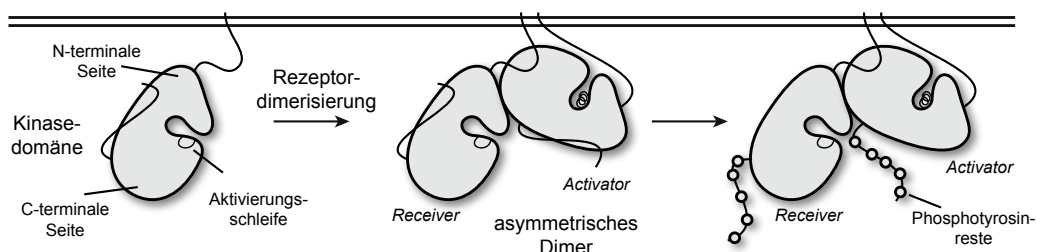


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dimerisierung der intrazellulären Kinasedomänen zweier EGF-Rezeptoren. Modifiziert nach Jura *et al.* [2009].

rung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen (Abbildung 4). Die Juxtamembrandomänen dimerisieren spontan und richten die Tyrosinkinasedomänen korrekt zueinander aus [Jura *et al.*, 2009]. Diese bilden, im Gegensatz zur extrazellulären Domäne, ein asymmetrisches Dimer, wobei die C-terminale Seite der aktivierenden Kinasedomäne („*Activator*“) mit der N-terminalen Seite der zu aktivierenden Kinasedomäne („*Receiver*“) interagiert. Die *Receiver*-Kinase wird allosterisch aktiviert und kann die Tyrosinreste der regulatorischen Region der *Activator*-Kinase phosphorylieren [Zhang *et al.*, 2006]. Die Phosphorylierung des konservierten Tyrosinrests der Aktivierungsschleife ist jedoch für die Aktivierung der Kinasefunktion nicht notwendig [Jura *et al.*, 2009, Red Brewer *et al.*, 2009]. Hubbard [2006] gehen davon aus, dass beide Kinasedomänen ihre Rollen (*Activator* $\Leftrightarrow$ *Receiver*) in dynamischer Weise abwechseln. Durch Phosphorylierung von Tyrosinresten der regulatorischen Domäne entsteht eine Reihe an Bindungsstellen für unterschiedliche Adapterproteine, die ihrerseits Startpunkte für nachgeschaltete Signalkaskaden darstellen.

2.1.3 Nachgeschaltete Signalwege

Die Tyrosinphosphorylierung regulatorischer Regionen von ErbB-Rezeptoren hat die Rekrutierung verschiedener Adapterproteine zur Folge. Obwohl sich die Muster der angelagerten Proteine für die einzelnen ErbB-Rezeptoren teilweise gleichen, werden nachgeschaltete Signalwege in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Eines der wichtigsten Adapterproteine, Grb2, besitzt zwei funktionelle Bindedomänen. Mit der ersten Domäne, SH2, bindet es an phosphorylierte Tyrosinreste aktivierter ErbB-Rezeptoren und mit der zweiten, SH3, können weitere Adapterproteine, unter anderem der Nukleotidaustauschfaktor SOS (*Son of sevenless*), gebunden werden. Eine andere, wichtige Bindungsdomäne von ErbB-Adapterproteinen ist die phosphotyrosinbindende Domäne (PTB-Domäne) [Pawson, 2004].

Signalwege, die ErbB-Rezeptoren nachgeschaltet sind, werden unter anderem über mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK-Signalwege) oder die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K-Signalweg) vermittelt. Einen weiteren Signalweg stellt die Proteinkinase C-vermittelte Signalkaskade (PKC-Signalweg) dar. Im weiteren Verlauf der theoretischen Einführung soll näher auf den ERK1/2-vermittelten (extrazellulär regulierte Kinase) MAPK-Signalweg eingegangen werden.

Der ERK1/2-MAPK-Signalweg

MAPK-Signalwege sind in der Regel in drei Ebenen gegliedert: Die eigentliche MAPK, einen MAPK-Aktivator (MAPK-Kinase, MAPKK) und einen MAPKK-Aktivator (MAPK-Kinase-Kinase, MAPKKK) (Abbildung 5). Die Signaltransduktion stellt eine sequentielle Phosphorylierung der einzelnen Komponenten dar, wodurch diese katalytische Aktivität erhalten und die jeweils folgende Kinase aktivieren können [Schaeffer und Weber, 1999]. In Säugerzellen gibt es insgesamt vier bekannte MAPK-Kaskaden. Die Wichtigsten hierbei sind die ERK1/2-Kaskade, die insbesondere Zellwachstum und Differenzierung reguliert, sowie die JNK- und p38-MAPK-Kaskaden, die hauptsächlich auf zellulären Stress reagieren und unter

anderem Entzündungen oder Apoptosesignale vermitteln [Robinson und Cobb, 1997, Lewis *et al.*, 1998, Ip und Davis, 1998].

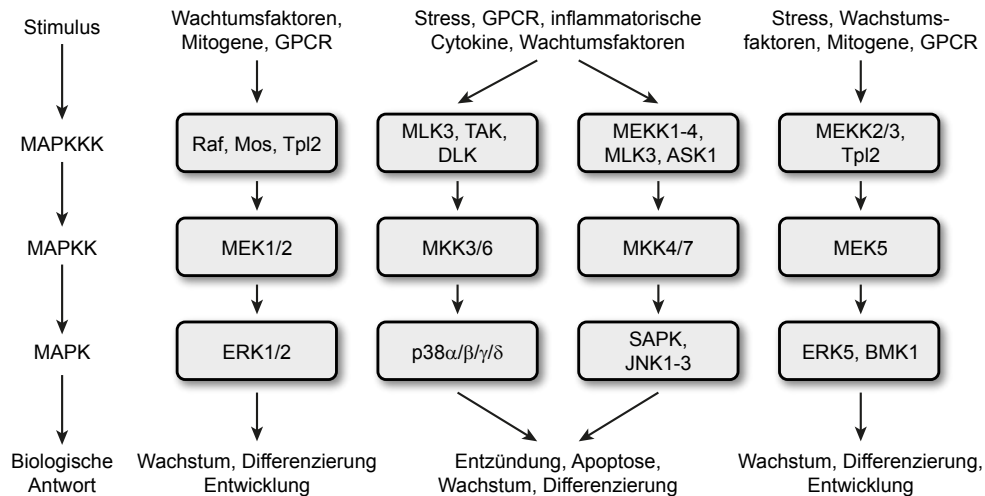


Abbildung 5: Eukaryotische MAPK-Kaskaden. Abkürzungen: ASK1: *Apoptosis signal regulating kinase 1*; BMK1: *Big MAPK-1*; DLK: *Dual leucine zipper-bearing kinase*; GPCR: *G protein-coupled receptor*; JNK: *c-Jun N-terminal kinase*; MEK1/2: *MAPKK/ERK kinases 1/2*; MKK: *MAPK kinase*; MLK: *Mixed lineage kinase*; SAPK: *Stress-activated protein kinase*; TAK: *TGFβ activated kinase*. Modifiziert nach Junttila *et al.* [2008].

Die ERK1/2-MAPK-Kaskade besteht aus der MAPKKK Raf, den MAPKK MEK1 und -2 (MAPKK/ERK-Kinasen 1/2) sowie den MAPK ERK1 und -2 (Abbildung 6). Die Signaltransduktion wird durch die Dimerisierung des übergeordneten Transmembranrezeptors ausgelöst. Im Falle der ErbB-Rezeptoren wird der Nukleotidaustauschfaktor SOS durch das Adapterprotein Grb2 aktiviert. SOS wird nahe der Zellmembran fixiert und kann das membrangebundene Ras aktivieren, indem Ras-gekoppeltes Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) austauscht wird [Moodie *et al.*, 1993, Chang *et al.*, 2000]. Aktivierte Ras rekrutiert nun weitere Raf-Isoformen (A-Raf, B-Raf bzw. Raf-1) an die Zellmembran, wo diese mit Ras dimerisieren. Ras kann nun die gebundenen Raf-Isoformen durch Phosphorylierung aktivieren [Warne *et al.*, 1993, Moodie und Wolfman, 1994, Zhang und Guan, 2001]. Darüber hinaus wird die Aktivität der Raf-Isoformen durch weitere Faktoren reguliert [Song *et al.*, 2001, Tzivion *et al.*, 2001]. Die Raf-Isoformen wiederum phosphorylieren mit unterschiedlicher Aktivität die in der Kaskade nachgeschalteten Elemente MEK1 und -2. Beide MEK-Isoformen sind in der Lage, die MAPK ERK1 und -2 zu aktivieren.

ERK induziert vor allem Transkriptionsfaktoren und besitzt somit regulatorische Wirkung für die Transkription. Insbesondere werden Gene, die Relevanz im Zellzyklus und somit für das Zellwachstum besitzen, über die ERK-vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren induziert [Brunet *et al.*, 1999]. ERK1 und -2 können im phosphorylierten Zustand in den Zellkern translozieren und dort direkt oder indirekt über die mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase 1/2 (MSK1/2) durch Phosphorylierung diverse Transkriptionsfaktoren aktivieren [Deak *et al.*, 1998] (Abbildung 6). Die wichtigen Transkriptionsfaktoren, die durch ERK1/2-

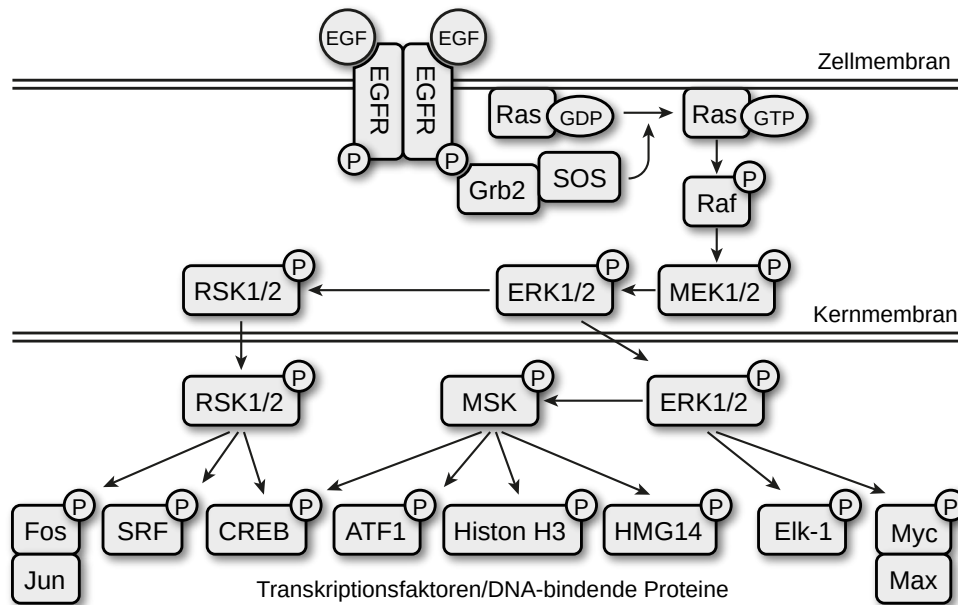


Abbildung 6: Schematische Darstellung des ERK1/2-MAPK-Signalwegs, aktiviert durch ein EGFR-Homodimer. Abkürzungen: ATF: *Cyclic AMP-dependent transcription factor*; CREB: *cAMP response element-binding protein*; ERK: *Extracellular signal-regulated kinases*; GDP: Guanosindiphosphat; Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*; GTP: Guanosintriphosphat; HMG: *High mobility group protein*; MEK: MAPKK/ERK-Kinase; MSK: *Mitogen- and stress-activated protein kinase*; Raf: Ser/Thr-Kinase; Ras: GTP-abhängiges Signalelement; RSK: *Ribosomal Protein S6 Kinases*; SOS: Nukleotidaustauschfaktor (*Son of sevenless*); SRF: *Serum response factor*; Myc, Max, Fos, Jun: Transkriptionsfaktoren. Modifiziert nach Dhillon *et al.* [2007], Anjum und Blenis [2008].

Phosphorylierung direkt aktiviert werden sind Elk-1 und c-Myc [Marais *et al.*, 1993, Gupta *et al.*, 1993]. Indirekt (via MSK1 und -2) werden unter anderem die Transkriptionsfaktoren CREB (*cAMP response element-binding protein*) und ATF1 sowie die Proteine Histon H3 und HMG14 durch Phosphorylierung aktiviert [Deak *et al.*, 1998, Gupta und Prywes, 2002, Soloaga *et al.*, 2003]. ERK1 und -2 können darüber hinaus auch indirekt die Transkription beeinflussen, indem sie im Zytosol das Protein ribosomale S6-Kinase (RSK) phosphorylieren [Chen *et al.*, 1991]. Phosphoryliertes RSK kann nun in den Zellkern translozieren und dort Transkriptionsfaktoren wie c-Fos [Chen *et al.*, 1993], SRF oder CREB aktivieren [Xing *et al.*, 1996].

Über die Transkriptionsregulation hinaus werden von ERK1 und -2 auch weitere, zytosolische Proteine, wie die cPLA₂ (zytosolische Phospholipase A₂), Topoisomerase II α und MNK (*MAPK-interacting kinase*) aktiviert [Ulisse *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 1999, Waskiewicz *et al.*, 1997]. ERK ist somit in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert.

2.1.4 Relevanz von RTK und nachgeschalteter Signalelemente in der Tumorgenese

RTK-Signalwege können an verschiedenen Positionen durch Mutationen der entsprechenden Gene modifiziert werden, sodass sie ein verstärktes Zellwachstum und letztendlich die Ausbil-

derung von Tumoren begünstigen. So wurde die Überexpression verschiedener RTK-Liganden, wie TGF α , Amphiregulin oder HB-EGF in neoplastischen Geweben beobachtet [Sandgren *et al.*, 1990, Piepkorn, 1996, Ongusaha *et al.*, 2004]. Die RTK-Aktivität kann entweder durch Überexpression, Amplifikation oder durch aktivierende Mutationen erhöht werden. Die Überexpression verschiedener ErbB-Rezeptoren ist eng vergesellschaftet mit Neoplasien von Kolon, Lunge und Brust [Hynes und Lane, 2005]. Die Amplifikation von Rezeptorgenen im Erbgut führt letztendlich ebenfalls zur Überexpression von Proteine. Amplifikationen des ErbB2-Gens sind unter anderem in der Entwicklung von Mammakarzinomen involviert [Slamon *et al.*, 1987].

Für ErbB-Rezeptoren sind zahlreiche aktivierende Mutationen beschrieben. Eine bekannte EGFR-Mutante, die vor allem in Glioblastomen beobachtet wird, ist die konstitutiv aktive Deletionsmutante EGFRvIII, bei der große Teile der extrazellulären Bindungsdomäne fehlen [Kuan *et al.*, 2000]. Eine EGFR-Punktmutante, die $\sim 40-45\%$ aller EGFR-Mutationen darstellt, ist EGFR_{L858R}, bei der Leu₈₅₈ gegen Arginin ausgetauscht ist [Sharma *et al.*, 2007]. Diese Mutation führt zu einer verstärkten ATP-Bindungsaffinität des Rezeptors und folglich einer erhöhten Aktivität [Carey *et al.*, 2006].

Schließlich können nachgeschaltete Signalelemente in der ERK1/2-MAPK-Kaskade oder im PI3K-Signalweg aktivierende Mutationen erfahren. Prominente Beispiele hierfür sind Mutationen in K-Ras, B-Raf und PI3K [Barault *et al.*, 2008].

2.1.5 Der EGFR als Target in der Chemotherapie

Antineoplastische Primärchemotherapeutika wie Cis- oder Carboplatin unterscheiden nicht zwischen schnell proliferierenden (z. B. Hämoytoblasten oder Enterozyten) und transformierten Zellen. Eine Folge sind teilweise starke Nebenwirkung während oder nach einer Medikation. Die Suche nach spezifischen Therapien gegen Tumorerkrankungen stellt derzeit eine Herausforderung für die Onkologie dar. Eine vielversprechende Klasse an spezifischen Chemotherapeutika ist die der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) [Arora und Scholar, 2005]. TKI werden insbesondere gegen verschiedene Rezeptoren der RTK-Familie eingesetzt, die in bestimmten Tumoren dysreguliert vorliegen. Eine TKI-Klasse, die Rezeptoren der ErbB-Familie hemmt, sind Chinalozinderivate. Zu ihnen zählen Gefitinib (Abbildung 7A), Erlotinib und Lapatinib. Ebenfalls zu den Chinalozinderivaten gehört Tyrphostin AG 1478 (Abbildung 7B), der jedoch keine klinische Anwendung besitzt, sondern nur für *in vitro*-Experimente eingesetzt wird. Gefitinib, das spezifisch die EGFR-Aktivität hemmt, wurde 2003 von der FDA für den amerikanischen Markt unter dem Handelsnamen „Iressa[®]“ zur Behandlung von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) zugelassen. Insbesondere Tumorpationen mit der Mutante EGFR_{L858R} sprechen auf Gefitinib an, da der Inhibitor mit höherer Affinität im katalytischen Zentrum der Tyrosinkinase binden kann. Bei gleichzeitiger Mutation von EGFR_{T790M} bilden sich jedoch Resistenzen gegen den TKI aus [Pao *et al.*, 2005]. Die objektiven Ansprechraten auf Gefitinib in klinischen Phase II-Studien sind mit 12–18 % daher niedrig [Fukuoka *et al.*, 2003, Kris *et al.*, 2003]. An neuen Therapiekonzepten, wie der

Kombinationsmedikation von TKI mit monoklonalen Antikörpern, wird gegenwärtig geforscht [Wang *et al.*, 2012].

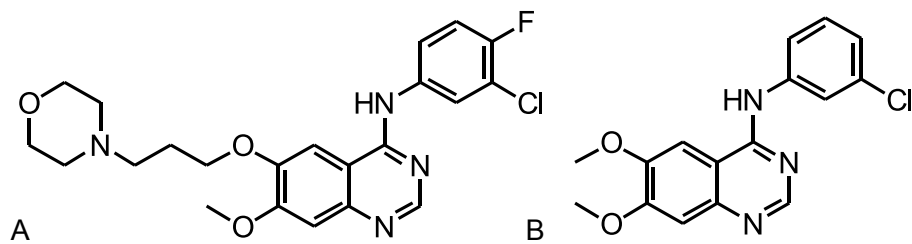


Abbildung 7: Chemische Strukturen der Tyrosinkinaseinhibitoren A) Gefitinib und B) Tyrphostin AG 1478.

2.2 Der Nrf2/Keap1-Signalweg

Ein Schutzsystem vor zellulärem, oxidativem Stress bietet der Nrf2/Keap1-Signalweg. Dieses System reagiert auf verschiedene Arten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder spezifische Aktivatoren, die sowohl exo- als auch endogenen Ursprungs sein können, indem es die Transkription und folglich die Expression von Genen induziert, die zur antioxidativen Abwehr der Zelle beitragen. Der Transkriptionsfaktor *NF-E2 related factor-2* (Nrf2) befindet sich im Zytosol gebunden an das Adapterprotein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1). Die Induktion von Nrf2 wird ausgelöst durch oxidativen Stress oder chemische Induktoren, die mit Cysteinresten von Keap1 reagieren und folglich den Abbau von Nrf2 unterbinden. Nrf2 akkumuliert im Zytosol und transloziert in Folge in den Zellkern. Dort bindet das Protein zusammen mit *small-Maf*-Proteinen (sMaf) als Transkriptionsfaktor an ARE (*antioxidant responsive elements*) verschiedener Gene, die vor allem in den Phase II-Metabolismus involviert sind (Abbildung 8).

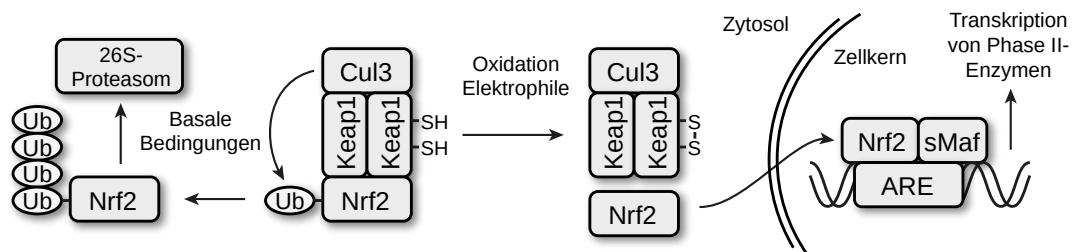


Abbildung 8: „Sequester and Release“-Modell der Nrf2-Aktivierung. Abkürzungen: ARE: *Antioxidant responsive element*; Cul3: *Cullin 3*; Keap1: *Kelch like ECH associated protein 1*; Nrf2: *NF-E2 related factor-2*; sMaf: *small Maf*; Ub: Ubiquitin. Modifiziert nach Dinkova-Kostova *et al.* [2002].

2.2.1 Strukturelle Eigenschaften von Nrf2

Nrf2 gehört zur Familie der *Cap'n'collar*-Proteine (CNC), zu denen auch die Mitglieder Nrf1 und -3 sowie Bach1 und -2 zählen [Motohashi *et al.*, 2002]. Das Protein Nrf2 besteht aus 605 Aminosäuren, die in sechs funktionelle Nrf2-ECH-homologe Domänen (Neh1–6) gegliedert sind (Abbildung 9A) [Itoh *et al.*, 1999]. Neh1 schließt die CNC-Region zur DNA-Bindung und die bZIP-Struktur (*Basic leucine zipper*) zur Heterodimerisierung mit sMaf-Proteinen [Itoh *et al.*, 1997] ein. Neh3–5 sind Transaktivierungsdomänen, die für die Funktion als Transkriptionsfaktor notwendig sind [Zhang *et al.*, 2007]. Neh2 beinhaltet Bindungsstellen für das Protein Keap1, die als negativer Regulator dienen, indem sie Nrf2 im Zytosol lokalisieren [Itoh *et al.*, 1999]. Der Kontakt zu Keap1 wird insbesondere durch zwei Bindungsmotive (ETGE und DLG) vermittelt, die sich innerhalb der Neh2-Domäne befinden und über eine α -Helix miteinander verbunden sind [Katoh *et al.*, 2005, McMahon *et al.*, 2006, Tong *et al.*, 2006]. Beim ETGE-Motiv handelt es sich um die evolutionär konservierte Abfolge der Aminosäuren Glu₇₉-Thr₈₀-Gly₈₁-Glu₈₂ [Kobayashi *et al.*, 2002]. Auch die DLG-Sequenz ist in eukaryotischen Zellen konserviert und stellt die AS-Folge Gln₂₆-Asp₂₇-X₂₈-Asp₂₉-Leu₃₀-Gly₃₁

dar, wobei X je nach Spezies entweder Isoleucin oder Valin repräsentiert [McMahon *et al.*, 2006]. Die α -Helix zwischen diesen beiden Motiven enthält sieben Lysinreste, die durch die Ubiquitinligase Cul3 ubiquitinyliert werden können [Zhang *et al.*, 2004].

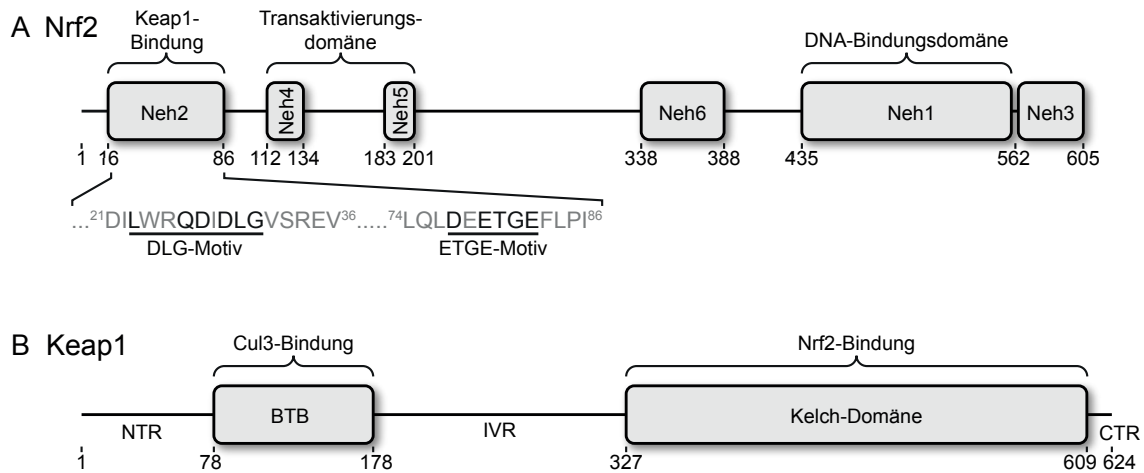


Abbildung 9: Domänen der Proteine A) Nrf2 und B) Keap1. Abkürzungen: BTB: *Broad-complex, tramtrack and bric-à-brac*; CTR: C-terminale Region; Cul3: Cullin 3; IVR: *Intervening region*; Keap1: *Kelch like ECH associated protein 1*; Neh1–6: *Nrf2-ECH homology 1–6*; Nrf2: *NF-E2 related factor-2*; NTR: N-terminale Region. Modifiziert nach Shibata *et al.* [2008b] und Baird und Dinkova-Kostova [2011].

2.2.2 Strukturelle Eigenschaften von Keap1

Keap1, bestehend aus 624 Aminosäuren, kann in fünf Domänen untergliedert werden (Abbildung 9B). Funktionelle Relevanz besitzen die *Broad-complex, tramtrack and bric-à-brac*-Domäne (BTB), eine cysteinreiche Brückendomäne (IVR, *Intervening region*) und die Kelch-Domäne mit sechs sogenannte Kelch-Motiven [Ogura *et al.*, 2010]. Bei diesen Motiven handelt es sich um stark konservierte β -Faltblattstrukturen, die insbesondere der Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen dienen [Adams *et al.*, 2000]. In der Kelch-Domäne sind die Kelch-Motive propellerartig, in sechsfacher Symmetrie zueinander angeordnet.

Keap1 ist mit 27 Cysteinresten ein außergewöhnlich cysteinreiches Protein. Zehn dieser Cysteinreste besitzen aufgrund angrenzender, positiv geladener Aminosäurereste einen niedrigen pK_a und sind somit reaktiv gegenüber Elektrophilen [Copples *et al.*, 2008]. Die proximale positive Ladung der basischen Aminosäuren stabilisiert das Thiolation, das als Übergangszustand von Reaktionen mit dem Cysteinrest auftritt [Snyder *et al.*, 1981].

2.2.3 Der Nrf2/Keap1-Komplex

Keap1 liegt im Zytosol als Homodimer vor. Die Verknüpfung beider Moleküle erfolgt über deren BTB-Domänen [Zipper und Mulcahy, 2002]. Der Komplex ist im Zytosol über die beiden Kelch-Domänen mit dem Aktinzytoskelett assoziiert [Kang *et al.*, 2004]. Die Bindung zu Nrf2 erfolgt ebenfalls über die Kelch-Domänen, wobei das ETGE- und das DLG-Motiv eines Nrf2-Moleküls mit jeweils einer Kelch-Domäne des Keap1-Dimers interagieren [Katoh

et al., 2005]. Somit ergibt sich ein Nrf2/Keap1-Heterotrimer mit einer Stöchiometrie von 1:2. Aus der höhere Anzahl an elektrostatischen Wechselwirkungen von Keap1 mit dem ETGE-Motiv resultiert eine um zwei Größenordnungen stärkere Bindungsaffinität im Vergleich zur Bindung mit dem DLG-Motiv [Tong *et al.*, 2007]. Dieser Unterschied in den Bindungsstärken spielt eine Rolle im „*Hinge and Latch*“-Modell der Nrf2-Aktivierung (Abschnitt 2.2.5).

Das so gebildete Heterotrimer ist über die beiden BTB-Domänen der Keap1-Moleküle mit dem Protein Cul3 assoziiert [Zhang *et al.*, 2004, Furukawa und Xiong, 2005]. Cul3 dient in einem Komplex mit Ring Box Protein 1 (Rbx1) als Ubiquitinligase und führt Nrf2 durch Ubiquitinylierung dem 26S-Proteasom zu (Abschnitt 2.2.5) [Cullinan *et al.*, 2004]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch Keap1 selber durch Cul3 ubiquitinyliert, jedoch über einen proteasomunabhängigen Weg abgebaut wird [Zhang *et al.*, 2005].

2.2.4 Das ARE (*antioxidant responsive element*)

Das ARE, auch EpRE (*elektrophile responsive element*), ist ein *cis*-Element im Promotor vieler Gene, die vor allem für Phase II-Enzyme kodieren. Das funktionelle Promotorelement ARE wurde bereits charakterisiert, bevor die Funktion von Nrf2 aufgeklärt war [Rushmore und Pickett, 1990]. Benannt wurde das ARE aufgrund der starken Resonanz (engl. *response*) gegenüber phenolischer Antioxidantien [Rushmore *et al.*, 1991]. Beim ARE handelt es sich um ein evolutionär stark konserviertes Motiv mit der Konsensussequenz 5'-TGACnnnGC-3', wobei n ein beliebiges Nukleotid darstellt. An diese Sequenz können verschiedene Transkriptionsfaktoren, insbesondere solche der AP-1-Superfamilie, binden. Dazu zählen neben den CNC-Proteinen Nrf1–-3 sowie Bach1 und -2 auch Faktoren wie c-Jun und c-Fos [Moi *et al.*, 1994]. Nrf2 muss zunächst mit Proteinen der sMaf-Familie (MafF, -G und -K) heterodimerisieren, um als Transkriptionsfaktor an die DNA binden zu können [Blank und Andrews, 1997, Motohashi *et al.*, 2002]. Die Heterodimerisierung der beiden Proteine findet über deren bZIP-Motive statt. sMaf-Proteine können darüber hinaus auch als Homodimere an das ARE binden. Im Gegensatz zu Nrf2 fehlt ihnen jedoch eine Transaktivierungsdomäne, sodass sMaf-Homodimere vielmehr als Transkriptionsrepressoren dienen [Toki *et al.*, 1997]. Während Nrf2 selber nicht in der Lage ist, Homodimere auszubilden [Vinson *et al.*, 2002], besitzen Nrf2/sMaf-Heterodimere eine hohe ARE-Erkennungsspezifität und leiten durch DNA-Bindung die Transkription entsprechender Gene ein [Toki *et al.*, 1997]. Anhand der Nukleotidsequenz des ARE konnte eine Vielzahl an Nrf2/ARE-regulierter Gene identifiziert werden, von denen ausgewählte in Abschnitt 2.2.9 erläutert werden.

2.2.5 Molekulare Grundlagen der Nrf2-Aktivierung

Für die Aktivierung von Nrf2 durch oxidativen Stress oder direkte Induktoren existieren, abhängig vom jeweiligen Induktor, verschiedene Modelle. In einem frühen Ansatz wurde das „*Sequester and Release*“-Modell (vom engl. „festhalten“ und „freisetzen“) auf der Basis von Untersuchungen an murinen Proteinen entwickelt. Unter basalen Bedingungen wird Nrf2 durch das Keap1-Homodimer am Zytoskelett fixiert. Induktoren reagieren mit Cysteinresten

der IVR-Region und setzen Nrf2 frei. Das freie Nrf2 transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor (Abbildung 8) [Dinkova-Kostova *et al.*, 2001, Wakabayashi *et al.*, 2004]. Neuere Studien ergaben jedoch, dass die zuvor gezeigte Dissoziation des Nrf2/Keap1-Komplexes unter Verwendung humaner Proteine durch klassische Nrf2-Aktivatoren wie Sulforaphan oder 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (Abschnitt 2.2.7) nicht möglich ist [Eggler *et al.*, 2005].

Untersuchungen deuteten darauf hin, dass der Nrf2/Keap1-Signalweg durch verminderten proteosomalen Abbau von Nrf2 induziert wird [Sekhar *et al.*, 2000, Stewart *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2003]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinligase Cul3 mit Nrf2 und Keap1 in einem Komplex vorliegt [Kobayashi *et al.*, 2004, Cullinan *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2004, Furukawa und Xiong, 2005]. Diese Beobachtungen erweiterten das „*Sequester and Release*“-Modell. Unter basalen Bedingungen liegt Nrf2 im Zytosol gebunden an Keap1 vor. Nrf2 erfährt einen sehr schnellen Turnover, in dem es ständig durch den Ubiquitinligasekomplex aus Cul3 und Rbx1 markiert wird und somit dem 26S-Proteasom zugeführt wird. Nrf2-Induktoren reagieren mit spezifischen Cysteinresten von Keap1, wodurch Nrf2 vor der Ubiquitylierung geschützt wird und folglich im Zytosol akkumuliert. Dies führt letztendlich zur verstärkten Kerntranslokation und Transkription Nrf2/ARE-abhängiger Gene. Für die Unterbindung des proteosomalen Abbaus von Nrf2 wurden, in Abhängigkeit der chemischen Eigenschaften der Induktoren, unterschiedliche Modelle vorgeschlagen: Zwei dieser Modelle, die Dissoziation von Keap1 und Cul3 und das „*Hinge and Latch*“-Modell sollen folgenden näher betrachtet werden.

Dissoziation von Keap1 und Cul3

Die Dissoziation von Keap1 und Cul3 durch Induktion mit verschiedenen Nrf2-Aktivatoren konnte in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden [Zhang *et al.*, 2004, Gao *et al.*, 2007, Rachakonda *et al.*, 2008]. Diese Wirkung konnte vor allem für Substanzen gezeigt werden, die mit dem Cysteinrest Cys₁₅₁ der BTB-Domäne von Keap1 reagieren, darunter *tert*-Butylhydrochinon (*t*-BHQ), Sulforaphan oder *N*-Iodacetyl-*N*-biotinylhexylendiamin (IAB). Die Reaktivität dieses Cysteinrests wird durch umliegende, positive Ladungen erhöht. Darüber

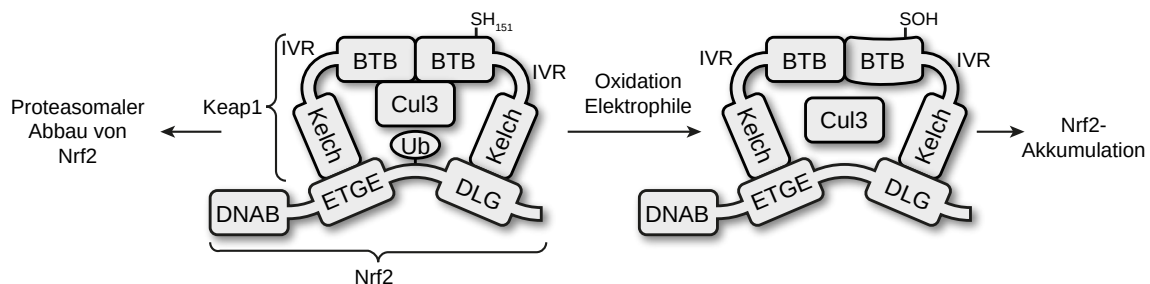


Abbildung 10: Aktivierung von Nrf2 durch Dissoziation von Keap1 und Cul3. Abkürzungen: BTB: *Broad-complex, tramtrack and bric-à-brac*; Cul3: *Cullin 3*; DNAB: DNA-Bindungsdomäne; DLG und ETGE: Aminosäuremotif; IVR: *Intervening region*; Keap1: *Kelch like ECH associated protein 1*; Nrf2: *NF-E2 related factor-2*; Ub: Ubiquitin. Modifiziert nach Baird und Dinkova-Kostova [2011].

hinaus liegt der Rest verdeckt zwischen vier Aminosäuren, sodass eine Konjugationsreaktion möglicherweise mit einer Konformationsänderung der BTB-Domäne einhergeht. Die Änderung der Tertiärstruktur des Proteins könnte zu einer Dissoziation zwischen Keap1 und Cul3 führen. Cul3 ist folglich nicht mehr in der Lage, Nrf2 für den proteasomalen Abbau zu markieren, wodurch eine Akkumulation von Nrf2 im Zytosol resultiert (Abbildung 10). Diese führt schließlich zu einem erhöhten Nrf2-Influx in den Zellkern und der damit verbundenen Induktion Nrf2/ARE-regulierter Gene [Rachakonda *et al.*, 2008, Eggler *et al.*, 2009, McMahon *et al.*, 2010, Baird und Dinkova-Kostova, 2011].

Das „Hinge and Latch“-Modell

Das „Hinge and Latch“-Modell (vom engl. „Scharnier“ und „einrasten“ im Sinne eines Türmechanismus) erklärt vor allem die Interaktion des Nrf2/Keap1-Modells mit Induktoren, die an Cysteinreste der IVR, insbesondere Cys₂₇₃ und Cys₂₈₈, binden.

Unter basalen Bedingungen wird Nrf2 über die beiden Motive DLG und ETGE an das Keap1-Homodimer gebunden, wobei die beiden Motive mit jeweils unterschiedlichen Keap1-Molekülen assoziiert sind (Abbildung 11) [Katoh *et al.*, 2005, McMahon *et al.*, 2006]. Die Orientierung von Nrf2 zu Keap1 wird durch die Bindung an diesen zwei Punkten stabilisiert, sodass Nrf2 gegenüber der Cul3-Ubiquitinligase korrekt ausgerichtet ist. Die Ubiquitinylierung von Nrf2 findet an den Lysinresten der α -Helix zwischen dem DLG- und dem ETGE-Motiv statt [Zhang *et al.*, 2004]. Die Ubiquitinmarkierung führt Nrf2 dem 26S-Proteasom zu, wodurch der Transkriptionsfaktor einem raschen Turnover unterliegt. Der freigewordene Keap1/Cul3-Komplex kann daraufhin mit *de novo*-gebildetem Nrf2 besetzt werden. Durch die Reaktion von Elektrophilen mit den Cysteinresten der IVR wird eine Konformationsänderung von Keap1 induziert, woraufhin die vergleichsweise schwache Bindung zwischen dem DLG-Motiv und Keap1 aufgebrochen wird. Nrf2 ist weiterhin über das ETGE-Motiv mit Keap1 verbunden, jedoch nicht mehr korrekt zu Cul3 ausgerichtet. Somit kann sich das Protein weder von Keap1 lösen, noch für den proteasomalen Abbau markiert werden. *De novo*-synthetisiertes Nrf2 akkumuliert im Zytosol, da es nicht mehr über den Keap1/Cul3-Komplex umgesetzt werden kann und transloziert in erhöhtem Maße in den Zellkern.

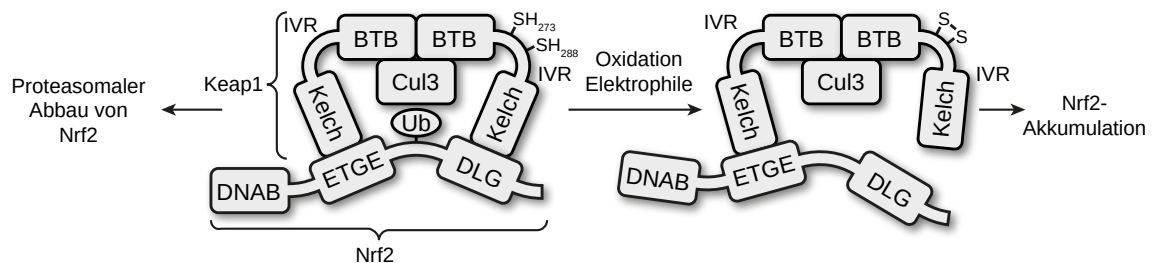


Abbildung 11: Nrf2-Aktivierung über das „Hinge and Latch“-Modell. Abkürzungen: BTB: *Broad-complex, tramtrack and bric-à-brac*; Cul3: *Cullin 3*; DNAB: DNA-Bindungsdomäne; DLG und ETGE: Aminosäuremotive; IVR: *Intervening region*; Keap1: *Kelch like ECH associated protein 1*; Nrf2: *NF-E2 related factor-2*; Ub: Ubiquitin. Modifiziert nach Tong *et al.* [2007].

Weitere Modelle

Eine Reihe weitere Mechanismen zur Aktivierung von Nrf2 wurden postuliert, die jedoch kontrovers diskutiert werden. So gibt es Hinweise, dass die Aktivität von Nrf2 über ein nukleär-/zytoplasmatischen Transport (*Shuttling*) von Keap1 reguliert wird. Die Entdeckung eines nukleären Exportsignals in der IVR-Domäne von Keap1 führte zu der Annahme, dass Keap1 in der Lage ist, in den Kern einzudringen und Nrf2 zu exportieren. Unter Einfluss von Induktoren oder ROS würde der Keap1-Import in den Nukleus jedoch unterdrückt. Durch den verminderten Nrf2-Export wäre letztendlich eine nukleäre Akkumulation diese Moleküls die Folge [Karapetian *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2005, Velichkova und Hasson, 2005]. Obwohl dieses Modell in bestimmten Punkten tatsächlich Erklärungsansätze für die Aktivierung des Nrf2/Keap1-Signalwegs bietet, können andere Beobachtungen damit nicht erklärt werden [Baird und Dinkova-Kostova, 2011].

Schließlich existieren noch andere, untergeordnete Modelle, wie die Ubiquitinylierung von Keap1 durch Cul3 [Zhang *et al.*, 2005], transkriptionelle und translationale Regulation der Nrf2-Proteinmenge [Kwak *et al.*, 2002, Purdom-Dickinson *et al.*, 2007] sowie die Aktivitätsregulierung von Nrf2 durch Phosphorylierung [Huang *et al.*, 2002].

2.2.6 Aktivierung durch ROS

ROS, wie Hydroxylradikale, ($\text{OH}^\cdot$), Superoxidanionradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen in der Zelle unter anderem durch Redoxcycling von Chinonen oder als Folge ionisierter Strahlung [Gille und Sigler, 1995]. Redoxsensitive Cysteinreste, wie die aktiven Cysteinreste in Keap1 (Abschnitt 2.2.2), sind in der Lage, mit ROS zu reagieren. Die Oxidation dieser Reste führt zur Bildung der äußerst reaktiven Sulfensäure ($-\text{SOH}$), die daraufhin entweder Disulfidbrücken mit benachbarten Cysteinresten ausbildet oder weiter zur Sulfin- ($-\text{SO}_2\text{H}$) oder Sulfonsäure ($-\text{SO}_3\text{H}$) oxidiert wird [Winterbourn und Hampton, 2008]. Weiterhin kann Sulfensäure mit nahestehenden Stickstoffatomen zu Sulfenamid reagieren. Durch diese Modifikationen kann es zu Änderungen der Tertiärstruktur der entsprechenden Moleküle kommen, wodurch diese entweder aktiviert oder deaktiviert werden. Für Keap1 konnte z. B. die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys₂₇₃ und Cys₂₈₈ infolge oxidativen Stresses und eine damit verbundene Konformationsänderung des Proteins nachgewiesen werden [Wakabayashi *et al.*, 2004]. Mit Ausnahme der Oxidation von Sulfon- und Sulfinsäure sind diese Modifikationen reversibel und können durch reduzierende Systeme, wie Thioredoxin oder Peroxiredoxin, rückgängig gemacht werden [Roos und Messens, 2011].

2.2.7 Aktivierung durch direkte Induktoren (*small Molecules*)

Direkte Phase II-Enzyminduktoren lassen sich in zwei Klassen einteilen: bi- und monofunktionale Induktoren [Talalay *et al.*, 1988]. Bifunktionalen Induktoren sind beispielsweise Dioxine, polycyclische Aromaten, Azofarbstoffe oder Naphthoflavone. Sie induzieren sowohl Phase I- als auch Phase II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Die Aktivierung von Phase I-Enzymen, unter anderem verschiedene, Zytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, wird

Tabelle 1: Chemische Klassen monofunktionaler Phase II-Enzyminduktoren und deren Aktivität. Abkürzungen: CD-Wert: Konzentration, durch die NQO1-Enzymaktivität verdoppelt wird, ermittelt in Hepa1c1c7-Zellen; n. a.: nicht aktiv. Referenzen: a) Prestera *et al.* [1993a]; b) Dinkova-Kostova *et al.* [2001]; c) Dinkova-Kostova *et al.* [2005b]; d) Itoh *et al.* [2004]; e) Prestera *et al.* [1993b]; f) Egner *et al.* [1994]; g) Khachick *et al.* [1999]. Modifiziert nach Dinkova-Kostova *et al.* [2005a] und Prestera *et al.* [1993a].

Chemische Klasse	Bekannte Beispiele	CD-Wert
Oxidierbare Diphenole, Phenylendiamine und Chinone	<i>t</i> -BHQ (<i>tert</i> -Butylhydrochinon)	6,0 μM^{a}
	Hydrochinon	5,3 μM^{a}
	Catechol	4,5 μM^{a}
	Resorcinol	n. a. ^a
Michael-Reaktions-akzeptoren	Curcumin	7,5 μM^{b}
	2,2'-Dihydroxychalkon	4,7 μM^{b}
	2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure (CDDO)	2,3 nM ^c
	CDDO-Methylester	1,0 nM ^c
	CDDO-Imidazolid	3,3 nM ^c
	15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J ₂ ^d	
Isothiocyanate und Sulfoxythiocarbamate	Sulforaphan	210 nM ^a
	Benzylisothiocyanat	3,7 μM^{a}
Dithiocarbamate	Pyrrolidindithiocarbamat ^e	
1,2-Dithiol-3-thione	Oltipraz ^f	
Konjugierte Polyene	β -Carotin	14 μM^{g}
	Lycopin	25 μM^{g}
	(3 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-Zeaxanthin	2,2 μM^{g}
Hydroperoxide	Wasserstoffperoxid	560 μM^{a}
	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	140 μM^{a}
Trivalente Arsen-derivate	Phenylarsinioxid	57 nM ^a
	NaAsO ₂	2,4 μM^{a}
Schwermetalle	HgCl ₂	520 nM ^a
	CdCl ₂	11 μM^{a}
	ZnCl ₂	220 μM^{a}
Vicinale Dimercaptane	2,3-Dimercapto-1-propanol	12 μM^{a}
	1,2-Ethandithiol	21 μM^{a}

über den intrazellulären Arylhydrocarbonrezeptor (Ah-Rezeptor) vermittelt, der letztendlich als Transkriptionsfaktor an das XRE (*xenobiotic responsive element*) bindet [Pollenz und Barbour, 2000]. Monofunktionale Phase II-Enzyminduktoren beeinflussen den Ah-Rezeptor nicht und sind häufig Nrf2/ARE-vermittelt. Sie lassen sich aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in zehn Klassen unterteilen, die in Tabelle 1 mit ausgewählten Beispiele aufgelistet sind. Die Gemeinsamkeit dieser Verbindungen stellt vor allem ihr elektrophiler Charakter und ihre Fähigkeit, mit Cysteinresten zu reagieren, dar [Talalay *et al.*, 1988]. Einige der bekanntesten Phase II-Enzyminduktoren werden im Folgenden näher erläutert.

Sulforaphan

Das Isothiocyanat Sulforaphan (Abbildung 12A) kommt hauptsächlich in Vertretern der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) vor und ist in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorhanden [Kushad *et al.*, 1999]. Neben Sulforaphan enthält Broccoli auch weitere Isothiocyanate [Cartea und Velasco, 2008]. Diese liegen in Pflanzen gebunden, in Form sogenannter Senfölglycoside (Glucosinolate), vor. Sulforaphan liegt in pflanzlichen Zellen als Glucoraphanin glycosidisch gebunden vor [Kushad *et al.*, 1999]. Die Freisetzung von Isothiocyanaten aus Glucosinolaten erfolgt enzymatisch mithilfe des Enzyms Myrosinase. Dies kann einerseits in der Pflanze geschehen, wenn Substrat und Enzym, die in pflanzlichen Zellen durch Kompartimentierung getrennt vorliegen, durch Schädigung der Zellen in Kontakt kommen [Bones und Rossiter, 1996]. Andererseits besitzen Bakterien des humanen Gastrointestinaltrakts (GIT) Myrosinaseaktivität [Oginsky *et al.*, 1965], sodass auch nach Verzehr von intaktem Glucoraphanin Sulforaphan freigesetzt und letztendlich resorbiert werden kann [Lai *et al.*, 2010].

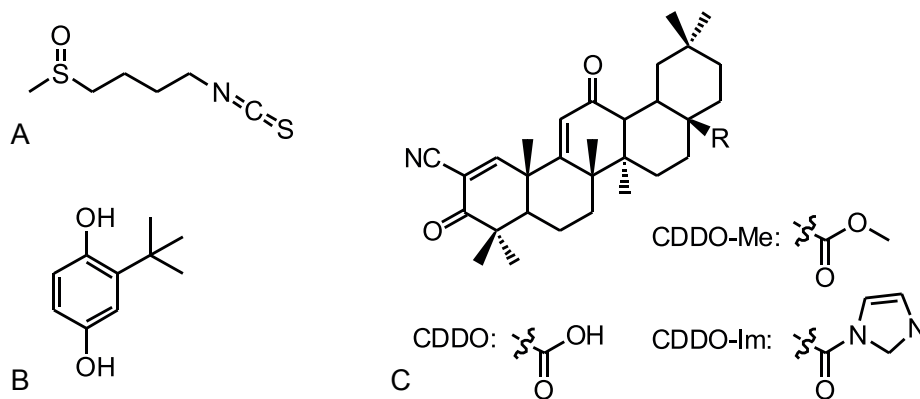


Abbildung 12: Strukturen bekannter Phase II-Enzyminduktoren. A) Sulforaphan; B) *tert*-Butylhydrochinon; C) 2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure (CDDO) mit den Derivaten CDDO-Methylester (CDDO-Me) und CDDO-Imidazolid (CDDO-Im).

Die NQO1-induzierende Wirkung von Sulforaphan wurde erstmals von Zhang *et al.* [1992] beschrieben. In weiteren Studien wurde diese Wirkung auch für andere Enzyme des Phase II-Metabolismus bestätigt [Juge *et al.*, 2007]. Die direkte Interaktion zwischen Sulforaphan und dem Nrf2/Keap1-Signalweg konnte ebenfalls gezeigt werden [Dinkova-Kostova *et al.*, 2002]. Die Aktivierung von Nrf2 erfolgt durch Adduktbildung von Sulforaphan an Keap1-Cysteinresten. Die Adduktbildung ist nicht auf die drei Reste Cys₁₅₁, Cys₂₇₃ und Cys₂₈₈ beschränkt, sondern kann an nahezu allen der 27 aktiven Cysteinreste von Keap1 erfolgen. Die Cysteinreste der BTB und der IVR-Domäne spielen eine untergeordnete Rolle, während die Cysteinreste der Kelchdomäne eine hohe Affinität zu Sulforaphan aufweisen. Die Aktivierung des Nrf2/Keap1-Signalwegs kann somit vielmehr über das „Hinge and Latch“-Modell erklärt werden, als über die Dissoziation von Keap1 und Cul3 [Hong *et al.*, 2005].

Neben der Beeinflussung des Nrf2/Keap1-Signalwegs und der damit verbundenen Phase II-

Enzyminduktion konnten für Sulforaphan zahlreiche weitere protektive Effekte festgestellt werden, wie die verringerte Transkription von Phase I-Enzymen [Mahéo *et al.*, 1997] oder die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion von Tumorzellen [Chiao *et al.*, 2002]. In der Summe könnten diese Eigenschaften die tumorhemmende Wirkung von Sulforaphan erklären, die in zahlreichen Tierstudien gezeigt wurde [Zhang *et al.*, 1994, Fahey *et al.*, 1997, Gerhäuser *et al.*, 1997, Fahey *et al.*, 2002]. Der Konsum von Broccoli konnte darüber hinaus in einer Humanstudie von Joseph *et al.* [2004] mit einem verringerten Risiko der Ausbildung von Prostatatumoren in Verbindung gebracht werden.

Oxidierbare *ortho*- und *para*-Diphenole

Zu den ersten Substanzen, für die eine Phase II-induzierende Wirkung nachgewiesen wurde, gehören oxidierbare Diphenole bzw. deren entsprechende Chinone. Bereits in den späten 1970er Jahren konnte für den Lebensmittelzusatzstoff 2(3)-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol (2-BHA) eine chemopräventive Wirkung in CD-1 Mäusen gezeigt werden, die zuvor mit Benzo[*a*]pyren behandelt wurden. Diese Wirkung ging einher mit der Induktion verschiedener Phase II-Enzyme [Benson *et al.*, 1978]. Für das Demethylierungsprodukt *t*-BHQ, (Abbildung 12B) konnte später in Struktur-/Aktivitätsuntersuchungen eine noch potentere Wirkung im Vergleich zu 2-BHA gezeigt werden [Prochaska *et al.*, 1985a]. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass *t*-BHQ und dessen Strukturanaloga in der Zelle zunächst zu entsprechenden Chinonen oxidiert werden müssen, um als ultimative Induktoren zu wirken [Prochaska *et al.*, 1985b, Bensasson *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2010]. Wang *et al.* [2010] zeigten außerdem, dass *tert*-Butylchinon (*t*-BQ), nicht jedoch *t*-BHQ, mit Cysteinresten von Keap1 in einem 4:1-Verhältnis reagieren.

Dem Mechanismus der direkten Nrf2-Induktion durch *t*-BHQ steht die Auffassung gegenüber, dass die Nrf2-Aktivierung ROS-vermittelt abläuft. Pinkus *et al.* [1996] konnten zeigen, dass *t*-BQ intrazellulär oxidativen Stress verursacht und gleichzeitig die Expression von Phase II-Enzymen über die Transkriptionsfaktoren *Activator protein 1* (AP-1) und *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB) induziert. Koinkubation mit Antioxidantien wie GSH oder *N*-Acetylcystein konnte dagegen die Induktion dieser Gene unterbinden. In einer darauf aufbauenden Untersuchung konnte die *t*-BHQ-induzierte ROS-Produktion in den Mitochondrien lokalisiert werden [Imhoff und Hansen, 2010]. Diese ist vermutlich auf Redoxcycling zurückzuführen, bei dem durch alternierende Transformation des vollständig oxidierten Chinon in das reduzierte Hydrochinon über ein radikalisches Intermediat Hydroxyradikale freigesetzt werden [van Ommen *et al.*, 1992]. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass *t*-BHQ zwar ein deutlich stärkerer Redoxcyclor als das nichtkonjugierte Hydrochinon ist [van Ommen *et al.*, 1992], beide Substanzen aber in ähnlichem Maße Phase II-Enzyme induzieren (Tabelle 1) [Dinkova-Kostova *et al.*, 2005a].

Für verschiedene *ortho*- und *para*-Hydrochinone konnten *in vivo* chemopräventive Eigenschaften in F344-Ratten gezeigt werden, wie die Verringerung der Lebertumorinzidenz [Fukushima *et al.*, 1991], die Reduktion hepatischer, präneoplastischer Foci [Hasegawa *et al.*,

1992] oder die Verringerung der Multiplizität von Kolonadenokarzinomen [Hirose *et al.*, 1993]. In diesen Studien wurden jedoch auch adverse Effekte dieser Substanzen beschrieben, darunter die signifikante Induktion von Papillomen in Speiseröhre und Vormagen der Tiere [Fukushima *et al.*, 1991, Hirose *et al.*, 1993] oder die erhöhte Inzidenz thyroïdaler Hyperplasien [Hirose *et al.*, 1993].

Michaelakzeptoren

Die Michaelreaktion beschreibt eine 1,4-Addition eines doppelt stabilisierten Nukleophils (Michaeldonor) an eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe (Michaelakzeptor) [Michael, 1887]. Bereits Talalay *et al.* [1988] erkannten, dass viele der Phase II-Enzyminduktoren Michaelakzeptorgruppen beinhalten und dass die Stärke der Induktoren mit der Reaktivität dieser Gruppen korreliert [Dinkova-Kostova *et al.*, 2001]. Auch die Aktivität vieler Naturstoffe, wie Zimtsäurederivate, Curcuminoide, Cumarine oder Chalkone ist auf diese funktionelle Gruppe zurückzuführen. Die direkte Interaktion zwischen Michaelakzeptoren und Cysteinresten von Keap1 konnte von Dinkova-Kostova *et al.* [2002] nachgewiesen werden. Die Autoren zeigten, dass Induktoren aufgrund struktureller Unterschiede mit verschiedenen Cysteinresten von Keap1 interagieren. Häufig werden zwei Cysteinreste in räumlicher Nähe, entweder über den Induktor oder über eine Disulfidbrücke, vernetzt oder aber zwei Induktormoleküle bilden jeweils kovalente Bindungen zu diesen beiden Cysteinresten aus.

Die Reaktivität von Michaelakzeptorgruppen hängt stark von elektronenziehenden Substituenten innerhalb desselben Moleküls ab. So konnten Michaelakzeptoren durch gleichzeitige Konjugation mit Cyano- und Carbonylgruppen von extrem hoher Potenz synthetisiert werden. Beispiele hierfür sind das synthetische Triterpenoid 2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäure (CDDO) sowie verschiedene Derivate dieser Verbindung (Tabelle 1 bzw. Abbildung 12C) [Dinkova-Kostova *et al.*, 2005b]. CDDO ist ein Derivat der natürlich vorkommenden Oleanolsäure, die in der japanischen und chinesischen Medizin eingesetzt wird. Ausschlaggebend für das hohe Potential dieser Induktoren ist das Vorhandensein zweier Michaelakzeptoren mit definiertem Abstand innerhalb eines Moleküls [Dinkova-Kostova *et al.*, 2005b].

Das chemopräventive Potential von CDDO und dessen Derivaten konnte in verschiedenen Tierstudien gezeigt werden. Bereits niedrige Konzentrationen an CDDO-Methylester (CDDO-Me), Abbildung 12C) reichten aus, um die Inzidenz chemisch induzierter Prostata-, Lungen- und Brustumoren in Mäusen zu senken [Gao *et al.*, 2011, Liby *et al.*, 2007, Ling *et al.*, 2007].

2.2.8 Aktivierung durch vorgeschaltete Signalkaskaden

Oxidativer Stress und elektrophile Substanzen können, neben Keap1, weitere zelluläre Signalwege beeinflussen, die unter Umständen einen Einfluss auf die Nrf2-Aktivität ausüben. So konnten MAPK-Kaskaden [Yu *et al.*, 1999], der PKC- [Huang *et al.*, 2000] und der PI3K-Signalweg [Lee *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2001] mit der Aktivierung von Nrf2 in Verbindung

gebracht werden. Huang *et al.* [2002] zeigten, dass die Nrf2-Aktivität durch Phosphorylierung von Ser₄₀ des Nrf2-Moleküls reguliert werden kann. Im Folgenden soll auf den Zusammenhang der drei erwähnten Signalwege zur Nrf2-Aktivierung eingegangen werden.

Aktivierung durch MAPK-Signalkaskaden

In Untersuchungen, in denen die MAPK-Kaskaden entweder mittels Kinaseinhibitoren oder durch molekularbiologische Methoden (Überexpression der Wildtyp- bzw. dominantnegativer Kinasen, siRNA-Knockdown oder Gen-Knockout) manipuliert wurden, konnte die Beteiligung aller relevanten Signalwege (ERK1/2, JNK und p38) an der Nrf2-Aktivierung aufgezeigt werden (repräsentative Studien in Tabelle 2). Zwischen den einzelnen Studien wurden jedoch widersprüchliche Ergebnisse beobachtet. Sun *et al.* [2009] zeigten, dass die direkte Phosphorylierung von Nrf2 durch MAPK nur eine untergeordnete Rolle für die Aktivierung des Proteins zu spielen scheint. Die Autoren gingen davon aus, dass die Nrf2-Aktivität vielmehr über indirekte Mechanismen durch MAPK reguliert wird.

Tabelle 2: Auswahl an Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen MAPK-Kaskaden und der Nrf2-Aktivität aufgezeigt wurde. Abkürzungen: ARE-Luc: ARE-Luciferase-Assay; DN: dominantnegative Kinase; γ GCL: γ -Glutamylcysteinylase; PD98059: spezifische MEK1-Inhibitor; PDKC: Pyrrolidindithiocarbamat; PEITC: Phenethylisothiocyanat; SB202190/SB203580: spezifische p38-Inhibitoren; *t*-BHQ: *tert*-Butylhydrochinon. Referenzen: a) Yu *et al.* [1999]; b) Zipper und Mulcahy [2000]; c) Yu *et al.* [2000]; d) Alam *et al.* [2000]; e) Keum *et al.* [2003]; f) Xu *et al.* [2006b]; g) Kim *et al.* [2008]. Modifiziert nach Sun *et al.* [2009].

MAPK-Manipulation	Nrf2-Induktor	biol. Endpunkt	Nrf2-Aktivität
PD98059, DN-ERK2	<i>t</i> -BHQ, Sulforaphan	NQO1-Aktivität, ARE-Luc	30 – 60 % Abnahme ^a
PD98059, SB202190	PDKC	γ GCL-Transkription, ARE-Luc	~ 100 % Abnahme ^b
MEKK1-, TAK1-, ASK1-, MKK4/6-Überexpression		ARE-Luc	3 – 18-fache Induktion ^c
p38 α -Überexpression	<i>t</i> -BHQ	ARE-Luc	30 – 40 % Abnahme ^c
SB203580, DN-p38 α	CdCl ₂	ARE-Luc	70 – 80 % Abnahme ^d
PD98059, DN-JNK1/2-, DN-ERK1/2-Expression	CdCl ₂	ARE-Luc	keine Änderung ^d
JNK1-Überexpression	PEITC	ARE-Luc	~ 6-fache Induktion ^e
DN-JNK1-Expression	PEITC	ARE-Luc	20 – 70 % Abnahme ^e
MKK4-, JNK1- Überexpression	PEITC	ARE-Luc, HO-1-Expression	3-fache Induktion ^f
DN-ERK2-, DN JNK1- Expression	PEITC	ARE-Luc	40 – 50 % Abnahme ^f
U0126, DN-ERK1- DN-ERK2-Expression	15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandin J ₂	HO-1-Expression, ARE-Luc	30 – 80 % Abnahme ^g

Aktivierung durch den PKC-Signalweg

Huang *et al.* [2000] konnten mit isopenmarkiertem Phosphat zeigen, dass Nrf2 infolge einer Induktion durch den Nrf2/ARE-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat phosphoryliert wird. Weiterhin konnten die Autoren nachweisen, dass die Nrf2-Induktion durch die PKC-Inhibitoren Staurosporin und Ro-32-0432 gehemmt wird. Darüber hinaus zeigten sie mit aufgereinigtem Nrf2 eine direkte Phosphorylierung durch PKC (Abschnitt 2.1.3). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass PKC zumindest einen Einfluss auf die Nrf2-vermittelte Genexpression besitzt. In einer späteren Studie konnten die gleichen Autoren Ser₄₀ als Phosphorylierungsposition in Nrf2 identifizieren [Huang *et al.*, 2002].

Aktivierung durch den PI3K/Akt-Signalweg

Kang *et al.* [2000] konnten durch Experimente mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 nachweisen, dass die GSTA2-Transkription und Aktivierung des ARE vom PI3K/Akt-Signalweg abhängig ist. Lee *et al.* [2001] zeigten, dass Nrf2 direkt durch den PI3K/Akt-Signalweg reguliert werden kann. Eine Reihe weiterer Studien, in denen der PI3K/Akt-Signalweg mittels spezifischer Kinaseinhibitoren oder durch molekularbiologische Methoden (Überexpression der Wildtyp- bzw. dominantnegativer Kinasen, siRNA-Knockdown oder Gen-Knockout) manipuliert wurde, unterstreicht die Beteiligung des PI3K-Signalwegs an der Nrf2-Aktivierung (Tabelle 3). Auch eine Phosphorylierung von Nrf2 an Ser₄₀ durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs konnte gezeigt werden [Salazar *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2012].

2.2.9 Nrf2/ARE-abhängige Gene

Anhand der Nukleotidsequenz des ARE konnte eine Vielzahl Nrf2/ARE-regulierter Gene identifiziert werden. Enzyme, deren Gene ARE-reguliert werden, sind unter anderem NQO1, γ -Glutamylcysteinylase (γ GCL), Hämoxygenase 1 (HO-1), Glutathionperoxidase (GPx), Glutathionreduktase (GSR) und Mitglieder der UDP-Glucuronosyltransferase- sowie Glutathion-S-Transferasefamilien (UGT und GST). Diese Enzyme sind nicht ausschließlich im Phase II-Metabolismus im Sinne von Konjugationsreaktionen involviert. Der Begriff „Phase II-Enzyme“ wurde im Kontext der Literatur zum Nrf2/Keap1-Signalwegs erweitert und wird sinngemäß für Enzyme ARE-regulierter Gene verwendet. Die Eigenschaften der für diese Arbeit relevanten Nrf2/ARE-regulierten Enzyme werden im Folgenden kurz erläutert.

Hämoxygenase 1 (HO-1)

Die Familie der Hämoxygenasen umfasst zwei Isoenzyme. Während HO-1 durch oxidativen Stress induzierbar ist, wird HO-2 konstitutiv exprimiert [Maines, 1997]. Die Beteiligung des ARE an der Regulation muriner HO-1 wurde von Alam *et al.* [1995] gezeigt. HO-1 katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Abbaureaktion von prooxidativem

Tabelle 3: Auswahl an Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt-Signalweg und der Nrf2-Aktivität aufgezeigt wurden. Abkürzungen: 4-KPR: 4-Ketopinoresinol; ARE-Luc: ARE-Luciferaseassay; DN: dominantnegative Kinase; LY294002: spezifischer PI3K-Inhibitor; SAAD: Entzug schwefelhaltiger Aminosäuren; SOD: Superoxiddismutase; *t*-BHQ: *tert*-Butylhydrochinon. Referenzen: a) Kang *et al.* [2000]; b) Kang *et al.* [2001]; c) Lee *et al.* [2001]; d) Martin *et al.* [2004]; e) Hamdulay *et al.* [2010]; f) Chen *et al.* [2012]; g) Hsu *et al.* [2012].

PI3K-Manipulation	Nrf2-Induktor	biol. Endpunkt	Nrf2-Aktivität
Wortmannin, LY294002	SAAD	rGSTA2-Transkription, ARE-Aktivierung	kompletter Rückgang ^a
Wortmannin, LY294002	<i>t</i> -BHQ	rGSTA2-Transkription, -Expression	kompletter Rückgang ^b
PI3K-Überexpression		ARE-Luc	3 – 4-fache Induktion ^c
Wortmannin, LY294002	<i>t</i> -BHQ	Nrf2-Translokation	Abnahme ^c
Wortmannin, LY294002	<i>t</i> -BHQ	ARE-Luc, NQO1-Express.	80 – 100 % Abnahme ^c
LY294002	Carnosol	HO-1-Expression	Abnahme ^d
DN-Akt1	Carnosol	ARE-Luc	50 – 60 % Abnahme ^d
LY294002, DN-Akt	Celecoxib	HO-1-Expression	~ 60 % Abnahme ^e
Wortmannin, LY294002	4-KPR	ARE-Luc	30 – 80 % Abnahme ^f
Akt-siRNA	4-KPR	p-Nrf2, HO-1-Expression	keine Induktion ^f
LY294002	Berberin	HO-1-Expression, SOD-Aktivität	~ 30 % Abnahme ^g

Häm zu antioxidativ wirksamen Bilirubin [Maines, 1997]:



Anschließend wird das entstandene Bilverdin über die Biliverdinreduktase (BR) weiter zu Bilirubin umgesetzt und nach weiterer Metabolisierung über Fäzes und Harn ausgeschieden (Abbildung 13) [Voet und Voet, 2004].

Die protektiven Effekte von HO-1 werden insbesondere durch den Abbau von Häm und der Generierung von Bilirubin vermittelt. Während Häm als prooxidativ beschrieben wurde, ist das Abbauprodukt Bilirubin antioxidativ wirksam und in der Lage, auch größere Mengen an H_2O_2 abzufangen [Doré *et al.*, 1999]. Neben der Verminderung tumorinitiierender Effekte wurde eine erhöhte HO-1-Aktivität jedoch auch mit der Begünstigung der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht. So spielt die HO-1 eine Rolle in der Tumorangio-genese [Deramaudt *et al.*, 1998] und HO-1-Überexpression konnte im Mausmodell mit beschleunigtem Tumorwachstum korreliert werden [Was *et al.*, 2006]. Die optimal ausbalancierte HO-1-Aktivität ist somit Voraussetzung für eine protektive Wirkung.

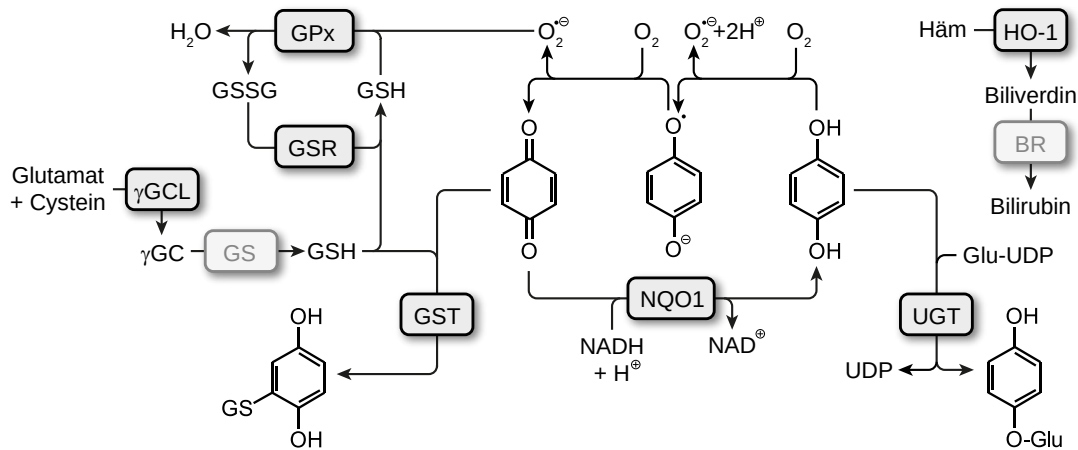


Abbildung 13: Interaktion von Enzymen des Phase II-Metabolismus (BR und GS sind nicht Nrf2/ARE-reguliert). Abkürzungen: BR: Biliverdinreduktase; γ GC: γ -Glutamylcystein; γ GCL: γ -Glutamylcysteinligase; Glu: Glucuronsäure; GPx: Glutathionperoxidase; GS: Glutathionsynthetase; GSH: Glutathion (reduziert); GSR: Glutathionreduktase; GSSG: Glutathion (oxidiert); GST: Glutathion-S-Transferase; HO-1: Hämoxygenase 1; NQO1: NAD(P)H:Chinonoxido-reduktase 1; UDP: Uridindiphosphat; UGT: UDP-Glucuronosyltransferase. Modifiziert nach [Kensler *et al.*, 2007].

NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO1)

Das Enzym NQO1 ist ein FAD-abhängiges Flavoprotein, das ubiquitär in allen Zellen exprimiert wird [Jaiswal, 2000]. Es reduziert Chinone und deren Derivate in einer Zwei-Elektronenreaktion unter Verbrauch von NADH oder NADPH zu Hydrochinonen. Folglich wird der elektrophile Charakter der Substanz entfernt und darüber hinaus kann die Substanz anschließend durch UGT mit Glucuronsäure konjugiert werden (Abbildung 13). Die Zelle wird somit vor Redoxcycling, oxidativem Stress und letztendlich irreversibler Schädigung geschützt. Neben dem ARE besitzt das NQO1-Gen weitere *Enhancer* im Promotor, sodass Nrf2 zwar einen wichtigen, jedoch nicht den einzigen Induktor darstellt [Jaiswal, 1991, Li und Jaiswal, 1992, Xie *et al.*, 1995].

γ -Glutamylcysteinligase (γ GCL)

Die γ GCL ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der *de novo*-Synthese von GSH. GSH wird für die Konjugation mit Elektrophilen und zum Abbau von Peroxiden durch GPx benötigt (Abbildung 13). Das Enzym γ GCL besteht aus zwei Untereinheiten. Die Schwerere (γ GCL_c) stellt die katalytische und die Leichtere (γ GCL_m) die regulatorische Untereinheit dar. In den Promotern der Gene beider Untereinheiten konnten ARE identifiziert werden [Mulcahy *et al.*, 1997, Moinova und Mulcahy, 1999].

Glutathion-S-Transferasen (GST)

Die GST lassen sich in drei Familien (zytosolische, mitochondriale und mikrosomale GST) einteilen [Jakobsson *et al.*, 1999, Ladner *et al.*, 2004, Robinson *et al.*, 2004]. Sie sind in der Lage, Elektrophile, wie α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen und Chinone, aber auch

endogene Substanzen mit GSH zu konjugieren [Keen und Jakoby, 1978, Hayes und Pulford, 1995]. Diese Reaktion stellt den ersten Schritt bei der Metabolisierung dieser Substanzen zu Mercaptursäuren dar, die schließlich mit dem Harn ausgeschieden werden können [Keen und Jakoby, 1978]. Darüber hinaus sind die Enzyme in die Biosynthese von Leukotrienen, Prostaglandinen, Testosteron und Progesteron sowie den Abbau von Tyrosin und Phenylalanin involviert [Soderstrom *et al.*, 1985, Beuckmann *et al.*, 2000, Johansson und Mannervik, 2001, Fernández-Cañón und Peñalva, 1998].

GST-Gene besitzen neben dem ARE ebenfalls weitere *Enhancer* in ihrem Promotor, darunter XRE und GRE (*glucocorticoid responsive elements*) sowie AP1- und AP2-Bindungsstellen [Rushmore *et al.*, 1990, Morel *et al.*, 1994, Lörper *et al.*, 1996].

2.2.10 Die Rolle des Nrf2/Keap1-Signalwegs in Tumorgenese und -therapie

Der Keap1/Nrf2-Signalweg wird aufgrund der Aktivierung von Phase II-Enzymen allgemein als protektiver Mechanismus hinsichtlich der Tumorentstehung angesehen. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass in Nrf2^{-/-}-Mäusen eine deutlich reduzierte Phase II-Enzymaktivität mit einer erhöhten Inzidenz an chemisch induzierter Magen-, Blasen- und Hauttumoren einhergeht [Ramos-Gomez *et al.*, 2001, Iida *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2006a]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Nrf2-Aktivität in Neoplasien der Haut (Maus) und der Prostata (Mensch) herunterreguliert war [Xu *et al.*, 2006a, Frohlich *et al.*, 2008]. Der Verlust der Nrf2-Aktivität in Tumoren könnte entweder in deaktivierenden Mutationen in Nrf2 oder aber in einem verstärktem Abbau durch Keap1/Cul3 begründet liegen [Kan *et al.*, 2010, Baird und Dinkova-Kostova, 2011].

Auf der anderen Seite konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass prokanzerogene Mechanismen auf eine erhöhte Nrf2-Aktivität zurückzuführen sind. Sowohl in Tumoren der Lunge als auch in Kopf-Hals-Tumoren wurden aktivierende Mutationen in den DLG- und ETGE-Motiven von Nrf2 nachgewiesen. Die erhöhte Bindung zu Keap1 verhindert den proteasomalen Abbau des Proteins mit der Folge einer Nrf2-Akkumulation [Shibata *et al.*, 2008b]. Weiterhin konnten inaktivierende Mutationen in Keap1 in Tumoren der Lunge, Brust und Gallenblasen aufgezeigt werden [Singh *et al.*, 2006, Nioi und Nguyen, 2007, Shibata *et al.*, 2008a]. Diese Daten weisen darauf hin, dass der Keap1/Nrf2-Signalweg für das Überleben von Tumoren von Vorteil sein kann: Der erhöhte Schutz vor Oxidantien und Elektrophilen durch Nrf2-aktivierende Mechanismen ist vor allem für Tumorzellen in ihrem redoxdysbalancierten Umfeld ein Selektionsvorteil [Kensler und Wakabayashi, 2010]. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Nrf2-Aktivität Tumoren vor antineoplastischen Chemotherapeutika (z. B. Etoposid, Doxorubicin oder Cisplatin) schützen kann [Singh *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2008].

2.3 Topoisomerasen

Die Topologie der DNA ist aufgrund von Replikation, Transkription, Rekombination und Chromatinstrukturierung ständigen Veränderungen unterworfen. Um diese zu organisieren bedarf es unter anderem der Enzymklasse der Topoisomerasen. Diese Enzyme sorgen für die Aufrechterhaltung der superspiralisierten Struktur der DNA, um Interaktionen mit Proteinen zu erleichtern und exzessives *Supercoiling* zu verhindern.

2.3.1 Klassifizierung

Topoisomerasen lassen sich in zwei unterschiedliche Typen unterteilen. Typ I-Topoisomerasen induzieren transiente DNA-Einzelstrangbrüche und können so einen Strang der Doppelhelix durch den anderen hindurchführen (Abbildung 14A). Torsionsspannungen des DNA-Strangs können verringert werden, wodurch übermäßiges *Supercoiling* verhindert wird. Vier humane Typ I-Isoformen wurden beschrieben: Topoisomerase I, III α , III β und die mitochondriale Topoisomerase I [Champoux, 2001].

Typ II-Topoisomerasen induzieren transiente Doppelstrangbrüche und sind folglich in der Lage DNA-Doppelstränge durch andere hindurchzuführen (Abbildung 14B). Zwei humane Isoformen der Typ II-Topoisomerasen sind bekannt: Topoisomerase II α und II β [Champoux, 2001].

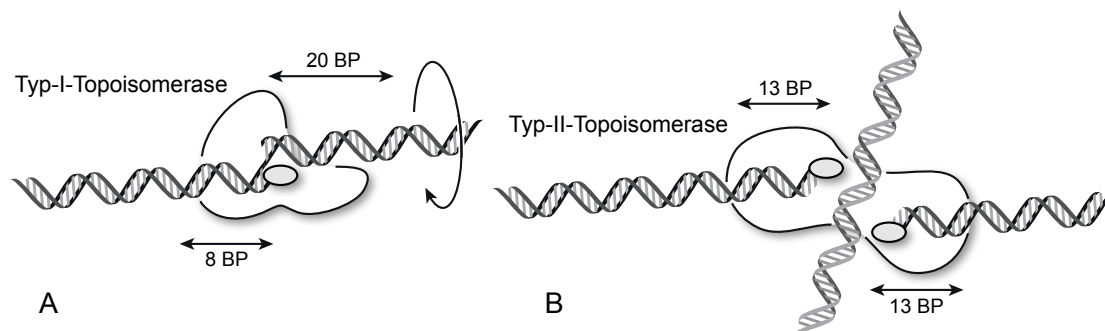


Abbildung 14: Schematische Darstellung der humanen Topoisomerasen Typ I und II. A) Typ-I-Topoisomerasen unterbinden Torsionsspannungen der DNA durch transiente Einzelstrangbrüche. B) Typ-II-Topoisomerasen induzieren transiente DNA-Doppelstrangbrüche, sodass Doppelstränge durch andere hindurchgeführt werden können. BP: Basenpaare. Modifiziert nach Salceda *et al.* [2006].

2.3.2 Topoisomerasehemmstoffe

Topoisomerasen können in ihrer Aktivität durch unterschiedliche Substanzen beeinflusst werden. Diese Hemmstoffe lassen sich in katalytische Inhibitoren und Topoisomerasegifte unterteilen. Diese sollen im Anschluss kurz erläutert werden.

Katalytische Inhibitoren

Katalytische Inhibitoren für Topoisomerasen stellen eine heterogene Gruppe chemischer Verbindungen dar. Ihrer Wirkung liegen unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrunde:

- Die Bindung von Topoisomerasen an die DNA wird behindert, beispielsweise durch interkalierende Substanzen wie Aclarubicin oder Chlorochin [Sørensen *et al.*, 1992, Jensen *et al.*, 1994].
- Nichtkovalente Komplexe zwischen Topoisomerasen und DNA werden nach der Religation des topoisomeraseinduzierten Strangbruchs stabilisiert. Beispiele hierfür sind Merabon oder das Bisdioxopiperazin ICRF-187 [Drake *et al.*, 1989, Sehested und Jensen, 1996].
- Die ATP-Bindungsstelle von Topoisomerasen wird kompetitiv gehemmt. Ein Beispiel ist das Cumarin Novobiocin, das als Antibiotikum eingesetzt wird, da es insbesondere bakterielle Topoisomerasen hemmt [Gellert *et al.*, 1976].

Topoisomerasegifte

Während der topoisomerasekatalysierten Reaktion wird ein kovalent gebundenes Intermediat (*cleavage complex*) zwischen DNA und dem Enzym ausgebildet. Dieser Übergangszustand ist sehr kurzlebig, kann jedoch durch sogenannte Topoisomerasegifte stabilisiert werden, sodass zuvor induzierte Strangbrüche nicht mehr geschlossen werden können.

Topoisomerase I-Gifte stabilisieren Intermediate zwischen DNA und Topoisomerasen I. Die Kollision eines solchen Komplexes mit dem Replikationsapparat überführt den induzierten Einzelstrang- in einen Doppelstrangbruch [Pommier *et al.*, 1998]. Die Stabilisierung von DNA/Topoisomerase II-Intermediaten durch Topoisomerase II-Gifte hingegen führt direkt zu DNA-Doppelstrangbrüchen. Topoisomerasegifte unterbrechen auch immer den katalytischen Zyklus des Enzyms.

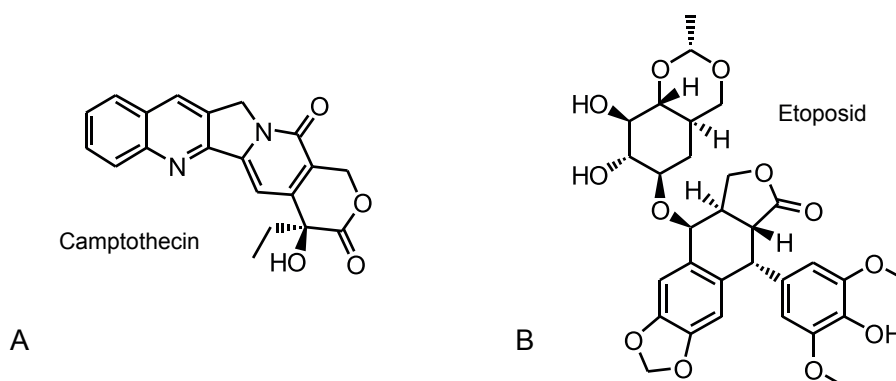


Abbildung 15: Strukturformeln der Topoisomerasegifte A) Camptothecin und B) Etoposid.

Ein Beispiel für ein Topoisomerase I-Gift ist Camptothecin (CPT, Abbildung 15A). Ein bekanntes Topoisomerase II-Gift ist Etoposid (ETO, Abbildung 15B). Beide Substanzen werden als Zytostatika in der Chemotherapie eingesetzt [Baldwin und Osheroﬀ, 2005].

2.4 Anthocyane

Anthocyane (abgeleitet von den griechischen Begriffen *anthos* (Blüte) und *kyanos* (blau)) sind eine Gruppe von über 500 Verbindungen, die für die intensiv rote bis blaue Färbung einer Vielzahl an Früchten und Blütenblättern verantwortlich sind [Kondo *et al.*, 1992, Torskangerpoll und Andersen, 2005, Andersen und Jordheim, 2006].

2.4.1 Struktur

Strukturell handelt es sich bei Anthocyanen um glycosidisch gebundene, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Aglyca der Anthocyane werden als Anthocyanidine bezeichnet. Anthocyanidine sind Polyphenole, die im engeren Sinne Mitglieder der Gruppe der Flavonoide darstellen (Abbildung 16A) [Castañeda Ovando *et al.*, 2009]. Weitere Vertreter der Flavonoidfamilie sind Flavonole (Quercetin, Myricetin), Flavan-3-ole ((+)-Catechin, (–)-Epigallocatechin-3-gallat) oder Flavanone (Hesperetin, Naringenin).

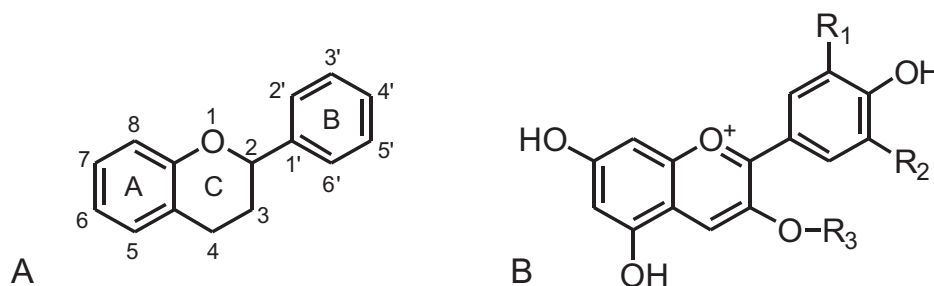


Abbildung 16: A) Flavonoid- und B) Anthocyangrundstruktur bei $\text{pH} \leq 2$. Substitutionsmuster siehe Tabelle 4.

In Anthocyanidinen bilden die Ringe A und C des Flavonoidgrundgerüsts eine positiv geladene Benzopyryliumstruktur aus (Abbildung 16B). Diese ist in Position 2 mit einer Phenylgruppe (B-Ring) verbunden und in den Positionen 3, 5 und 7 durch Hydroxygruppen substituiert [Castañeda Ovando *et al.*, 2009]. Durch Substitution der Positionen 3' und 5' des B-Rings mit Hydroxy- oder Methoxygruppen resultiert ein Spektrum verschiedener Anthocyanidine. Selten sind Anthocyanidine in den Positionen 3, 5, 6 und 7 der Benzopyryliumstruktur methoxyliert. Die Substitutionsmuster der häufigsten Anthocyanidine sind in Tabelle 4 dargestellt. Das am stärksten vertretene Anthocyanidin in Früchten ist Cyanidin (Cy, 50 %), gefolgt von Delphinidin (Del, 12 %) [Castañeda Ovando *et al.*, 2009]. Die in Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) vertretenen Aglyca sind Delphinidin, Cyanidin, Petunidin (Pt), Malvidin (Mv) und Peonidin (Peo) [Müller *et al.*, 2012].

Durch Konjugation der Aglyca mit Zuckern in 3-O- und/oder 5-O-Position wird die Struktur der Anthocyane gebildet. Eine große Anzahl natürlich vorkommender Anthocyane, konjugiert mit Mono-, Di- und Oligosacchariden ist beschrieben. Weitere Variationen entstehen durch Konjugation der Zuckerreste mit aliphatischen oder aromatischen Säuren [Veitch und Grayer, 2008]. In Heidelbeeren sind ausschließlich Glycoside mit den Monosac-

Tabelle 4: Substitutionsmuster häufiger Anthocyanidine und Phenolcarbonsäuren, die beim Abbau der entsprechenden Anthocyanidine entstehen.

Anthocyanidin	Phenolcarbonsäure	Substituent	
		-R1	-R2
Delphinidin	Gallussäure (GA)	-OH	-OH
Cyanidin	Protocatechusäure (PCA)	-OH	-H
Petunidin	3-O-Methylgallussäure	-OH	-OMe
Malvidin	Syringasäure (SA)	-OMe	-OMe
Peonidin	Vanillinsäure (VA)	-OMe	-H
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA)	-H	-H

chariden Glucose, Galactose und Arabinose in 3-O-Position vertreten [Müller *et al.*, 2012]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden Anthocyane wie im folgenden Beispiel abgekürzt: Unter Cy-3-glc ist das Anthocyan Cyanidin-3-O- β -D-glucopyranosid zu verstehen.

2.4.2 Stabilität

Die Chemie der Anthocyanidine ist komplex. Aufgrund ihrer positiven Ladung sind sie vergleichsweise reaktiv und werden in wässriger Lösung schnell abgebaut [Giusti und Wrolstad, 2003]. Hinsichtlich der Anthocyanidinstabilität spielt neben Faktoren wie Sauerstoff, Licht und Wärme vor allem der pH-Wert in wässrigen Lösungen eine wichtige Rolle [Jackman *et al.*, 1987]. In Lösung unterliegen Anthocyanidine einem dynamischen Gleichgewicht zwischen verschiedenen Formen. Klassischerweise treten, je nach pH-Wert, die fünf Formen Flavylumkation, Halbacetal, Flavenol, Flavenolatanion und die offene Chalkonstruktur auf

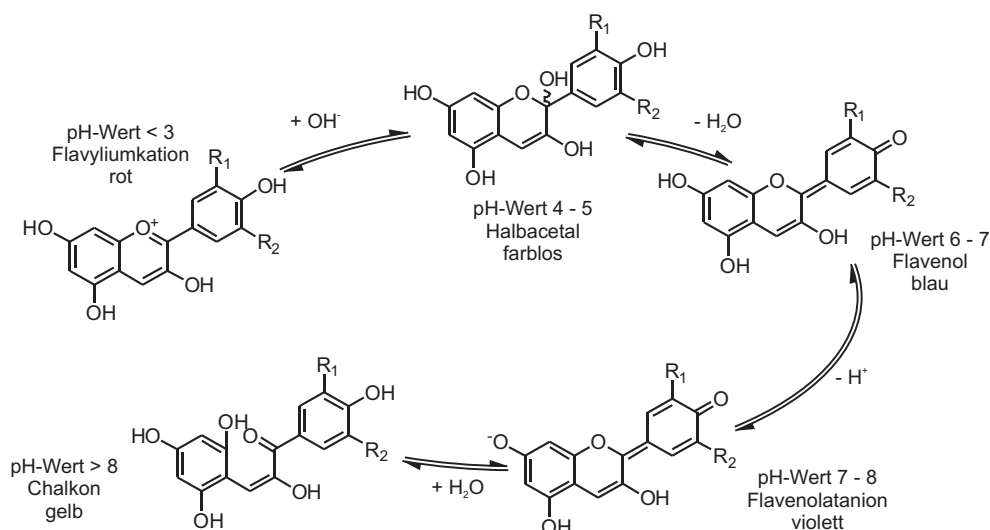


Abbildung 17: pH-Abhängigkeit der Anthocyanidinstruktur in wässriger Lösung

(Abbildung 17) [Freitas *et al.*, 2007]. Abweichend hiervon werden jedoch noch weitere Zwischenformen beschrieben, sodass sich bis zu acht unterschiedliche Intermediate ergeben [Asenstorfer *et al.*, 2003]. In der offenen Chalkonstruktur, die hauptsächlich bei $\text{pH} > 8$, jedoch auch in geringen Mengen bei neutralem pH auftreten, sind Anthocyanidine extrem instabil. Sie können in dieser Form spontan in eine Phenolcarbonsäure, deren Substitutionsmuster vom ursprünglichen Anthocyanidin abhängt (Tabelle 4), und Phloroglucinacetaldehyd zerfallen (Abbildung 18) [Fleschhut *et al.*, 2006]. In Anwesenheit von Mikroorganismen, beispielsweise im Intestinallumen des menschlichen Körpers, wird dieser Aldehyd unter Abspaltung einer C-Einheit weiter zu Phloroglucinolaldehyd abgebaut [Keppler und Humpf, 2005]. Anthocyanidine werden in neutraler Umgebung, abhängig vom Substitutionsmuster des B-Rings, innerhalb von wenigen Stunden (0,5–3 h) komplett abgebaut. Das mit Abstand instabilste Anthocyanidin stellt Delphinidin dar [Kern *et al.*, 2007].

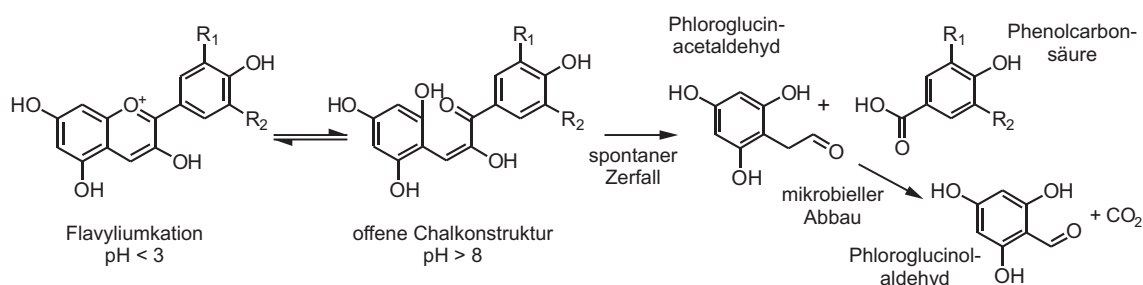


Abbildung 18: Zerfall von Anthocyanidinen unter neutralen bzw. basischen Bedingungen, modifiziert nach Fleschhut *et al.* [2006] und Keppler und Humpf [2005]. Substitutionsmuster der Phenolcarbonsäuren siehe Tabelle 4.

Glycosidisch gebundene Anthocyane sind in neutraler Umgebung geringfügig stabiler als Anthocyanidine, zerfallen jedoch innerhalb von Stunden [Keppler und Humpf, 2005]. In Anwesenheit mikrobieller β -Glucosidasen werden Anthocyane hydrolysiert und die resultierenden Anthocyanidine unterliegen dem oben beschriebenen, spontanen Zerfall. In steriler Umgebung wurde keine Hydrolyse zum freien Anthocyan beobachtet [Keppler und Humpf, 2005, Pérez-Vicente *et al.*, 2002]. Keppler und Humpf [2005] gehen davon aus, dass die Ringöffnung zur Chalkonstruktur und der Zerfall des Anthocyans stattfindet, bevor der Zuckerrest abgespalten wird. Weitere Transformationsprodukte wie Chalkon- und Cumaringlycoside wurden ebenfalls beschrieben [Keppler und Humpf, 2005].

Die Verringerung der Anthocyankonzentration in wässriger Lösung ist nicht ausschließlich auf dem Abbau der Monomere begründet. Eine weitere Ursache für diese Verminderung stellen Reaktionen mit weiteren Molekülen in der Lösung dar. So können Anthocyane miteinander zu Oligo- und Polymeren reagieren, die zu einer Bräunung der Anthocyanlösung führen [Fleschhut *et al.*, 2006, Brownmiller *et al.*, 2008]. Obwohl dieser Prozess bereits vergleichsweise früh beschrieben wurde [Williams und Hrazdina, 1979], sind die zugrundeliegenden Mechanismen derzeit noch nicht aufgeklärt. Eine weitere Reaktion, die zu einer Farbverminderung der Anthocyane führt, ist die Kondensation mit Ascorbinsäure [Poei-Langston und Wrolstad,

1981].

Neben Reaktionen, die zu einer Entfärbung der Anthocyanlösung führen, sind auch farbstabilisierende Reaktionen bekannt. So führt die Komplexbildung mit dreiwertigen Metallionen wie Al^{3+} zu einer erhöhten Farbintensität und -stabilität [Schreiber *et al.*, 2010]. Weitere wichtige Stabilisierungsreaktionen sind die Kopigmentierungsreaktion mit farblosen Polyphenolen [Boulton, 2001] und die Reaktion mit Phenolcarbonsäuren, Pyruvat oder Acetaldehyd zu sogenannten Pyranoanthocyanen [Bakker und Timberlake, 1997, Fulcrand *et al.*, 1998].

2.4.3 Vorkommen

Wichtige Anthocyanquellen der westlichen Nahrung sind Kirschen, Rotkohl sowie eine Vielzahl an rot gefärbten Beeren. Neben Früchten stellen Säfte und Wein nennenswerte Anthocyanquellen für den Menschen dar. In Pflanzen ist nahezu ausschließlich die glycosidisch gebundene Form der Anthocyane zu finden. Anthocyanidine werden lediglich in Spuren erfasst. Eine Übersicht der Anthocyangehalte verschiedener Obst- und Gemüsesorten ist in Tabelle 5 gegeben. Anthocyangehalte in Früchten sind abhängig von Kultivar und Reifegrad während der Ernte. Außerdem haben weitere Faktoren wie die Aufarbeitung der Früchte (z. B. Zellaufschluss, Extraktion) sowie die verwendete Analyseverfahren (z. B. HPLC-Analyse oder pH-Differenzialmethode) einen Einfluss auf den ermittelten Anthocyangehalt. Gehalte aus unterschiedlichen Studien sind daher nur schwer miteinander zu vergleichen. Tendenziell

Tabelle 5: Gesamtanthocyangehalte unterschiedlicher Obst- und Gemüsesorten. Referenzen: a) Pantelidis *et al.* [2007]; b) Kalt *et al.* [2001]; c) Prior *et al.* [1998]; d) Lee und Finn [2007]; e) Moyer *et al.* [2002]; f) Vvedenskaya und Vorsalova [2004]; g) McDougall *et al.* [2007]; h) Kim *et al.* [2005a]

Frucht	Botanischer Name	Herkunft	Anthocyangehalt [mg/100 g]
Brombeeren	<i>Rubus fruticosus</i>	Griechenland	114 – 149 ^a
Amerikanische Heidelbeeren (Kulturheidelbeeren)	<i>Vaccinium corymbosum</i>	USA	69 – 117 ^b
Wildheidelbeeren	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Deutschland	300 ^c
Holunderbeeren	<i>Sambucus canadensis</i>	USA	106 – 444 ^d
rote Himbeeren	<i>Rubus idaeus</i>	Griechenland	35 – 49 ^a
schwarze Himbeeren	<i>Rubus occidentalis</i> L.	USA	464 – 627 ^e
rote Johannisbeeren	<i>Ribes sativum</i>	Griechenland	36 – 50 ^a
schwarze Johannisbeeren	<i>Ribes nigrum</i> L.	USA	128 – 411 ^e
Moosbeeren („Cranberries“)	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	USA	74 – 102 ^f
Rotkraut	<i>Brassica oleracea</i> L.	Schottland	138 ^g
Sauerkirschen	<i>Prunus cerasus</i> L.	USA	146 – 312 ^h
Süßkirschen	<i>Prunus avium</i> L.	USA	92 – 147 ^h

besitzen dunkel gefärbte Obstsorten (Brombeeren, schwarze Johannisbeeren) einen höheren Anthocyangehalt als rot gefärbte Früchte (Himbeeren, rote Johannisbeeren) (Tabelle 5). Im Kontext dieser Arbeit soll im folgenden Abschnitt näher auf Heidelbeeren und die Zusammensetzung des in dieser Studie verwendeten Heidelbeerextrakts eingegangen werden.

Heidelbeeren und Heidelbeerextrakt (HBE)

Heidelbeeren (*Vaccinium*) umfassen ~ 400 – 450 Arten der Familie der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*). Bekannte Vertreter der Gattung stellen Preiselbeeren (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Großfrüchtige Moosbeeren („Cranberries“, *Vaccinium macrocarpon*), Amerikanische („Kulturheidelbeeren“, *Vaccinium angustifolium* (niederbuschig) bzw. *Vaccinium corymbosum* (hochbuschig)) und Europäische Heidelbeeren („Wildheidelbeeren“, *Vaccinium myrtillus* L.) dar [Franke *et al.*, 2007].

Die Früchte dieser Arten sind reich an Polyphenolen und enthalten hohe Konzentrationen an Anthocyanen. Amerikanische Heidelbeeren („Kulturheidelbeeren“) unterscheiden sich von der europäischen Form („Wildheidelbeeren“) durch die Lokalisierung der Anthocyane. Während bei der amerikanischen Form lediglich die Schale (Exokarp) pigmentiert ist, verteilen sich Anthocyane bei der europäischen Form über die gesamte Frucht (Perikarp).

Neben anderen bioaktiven Polyphenolen enthalten Heidelbeeren Tannine (Gerbstoffe) in Form oligomerer und polymerer Proanthocyanidine [Prior *et al.*, 2001, Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001]. Diese lassen sich, in Abhängigkeit ihrer monomeren Grundstrukturen, unter anderem in Procyanidine und Prodelphinidine unterteilen. Procyanidine setzen sich aus den Flavan-3-olmonomeren (+)-Catechin und (–)-Epicatechin zusammen. Die Verbindung der Monomere erfolgt meist über $4\beta \rightarrow 6$ - oder $4\beta \rightarrow 8$ -Verknüpfungen. Weiterhin sind Doppelverknüpfungen beschrieben, die über eine zusätzliche $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$ -Brücke verfügen

Tabelle 6: Polyphenolzusammensetzung des Heidelbeerextrakts, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Bestimmung bzw. Quantifizierung mittels HPLC-DAD-ESI-MS. Abkürzungen: t_R : Retentionszeit; n. q.: nicht quantifiziert. Modifiziert nach Juadjur und Winterhalter [2012].

Bestandteil	t_R [min]	Gehalt [%]			
			Caffeoylshikimisäure	32,30	n. q.
			5- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	32,39	n. q.
			<i>p</i> -Cumarsäure	40,30	n. m.
Gallussäure	8,03	0,15	Myricetingalactosid	40,44	n. q.
(+)-Gallocatechin	8,39	n. q.	Myricetinglucosid	42,33	n. q.
Protocatechusäure	13,20	0,21	Feruloylchinasäure	51,40	n. q.
(+)-Catechin	14,05	n. q.	Quercetingalactosid	55,91	0,34
Epigallocatechin	14,87	n. q.	Quercetinglucosid	56,71	n. q.
5-Hydroxyvanillinsäure	17,23	0,05	Quercetinglucuronid	57,45	0,41
Depsid	20,20	0,01	Cumaroyliridoid I	57,71	0,13
Kaffeesäurederivat	21,12	n. q.	Cumaroyliridoid II	58,52	n. q.
Chlorogensäure	22,97	1,10	Quercetinarabinosid	61,52	0,12
Proanthocyanidimer	24,40	n. q.	Quercetinrhamnosid	62,85	0,12
Kaffeesäure	26,39	n. m.	Myricetin	63,60	0,15
(–)-Epicatechin	28,48	n. q.	Cumarsäurederivat	68,11	n. q.
Phloroglucinolaldehyd	29,41	n. q.	Quercetin	70,91	0,28

[Karchesy und Hemingway, 1986]. Neben Procyanidinen sind in Heidelbeeren zu geringeren Anteilen auch Prodelphinidine (basierend auf (+)-Gallocatechin und (–)-Epigallocatechin) und Proanthocyanidine des „A-Typs“ (kombiniert aus Catechinen und Gallocatechinen) [Hellström *et al.*, 2009]. Hydrolysierbare Tannine, beispielsweise Ellagtannine, wurden in Heidelbeeren nicht nachgewiesen [Viljanen *et al.*, 2004, Nohynek *et al.*, 2006].

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit einem kommerziell erhältlichen Heidelbeerextrakt (HBE) „600761 Bilberry Extract 25 %“ der Firma Symrise (Holzminden, Deutschland) durchgeführt. Der Extrakt wurde aus Trester der europäischen Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) gewonnen. Laut Hersteller beträgt der Gesamtpolyphenolanteil nach Folin-Ciocalteu 46 % (w/w) und der Anthocyananteil 25 % (w/w). Neben Anthocyanen und weitere monomeren Polyphenolen enthält der Extrakt polymere Proanthocyanidine, Ballaststoffe zu 28,8 % (w/w) sowie Glucose (0,71 % (w/w)) und Fructose (0,84 % (w/w)). Die Polyphenolzusammensetzung des HBE wurde von Juadjur und Winterhalter [2012] näher charakterisiert und ist in Tabelle 6 aufgelistet. Die Anthocyanzusammensetzung des HBE wurde im Rahmen dieser Arbeit bestimmt und ist in Tabelle 13 angegeben.

Die Herstellung des Extrakts erfolgte laut Herstellerangaben nach einem mehrstufigen Verfahren. Polare Inhaltsstoffe aus Heidelbeertrester wurden mittels methanolischer Extraktion gelöst und nach Filtrations- und Aufkonzentrierungsschritten in einem säulenchromatographischen Verfahren (XAD-7) von Zuckern und Säuren befreit. Das polyphenolhaltige Eluat wurde gefriergetrocknet und vermahlen [persönliche Mitteilung Rudi Götz, Firma Symrise].

Tabelle 7: Humane Interventionsstudien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen. Abkürzungen: $c_{\max}$ maximale Plasmakonzentration; $t_{\max}$: Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; KG: Körpergewicht. Referenzen: a) Lapidot *et al.* [1998]; b) Bub *et al.* [2001]; c) Matsumoto *et al.* [2001]; d) Nielsen *et al.* [2003].

Lebensmittel	Anthocyan	Aufnahme	$c_{\max}$	$t_{\max}$	Ausscheidung
Rotwein (300 ml) ^a	Gesamtmenge	218,0 mg			1,5 – 5,0 %
Rotwein (500 ml) ^b	Mv-3-glc	68,6 mg	1,4 nM	20 min	0,02 %
entalkhol. Rotwein (500 ml) ^b	Mv-3-glc	57,7 mg	1,6 nM	90 min	0,02 %
roter Traubensaft (500 ml) ^b	Mv-3-glc	116,8 mg	2,8 nM	180 min	0,02 %
Anthocyanpräparat aus schwarzen Johannisbeeren ^c	Del-3-rut	1,68 mg/kg KG	59,9 nM	120 min	0,11 %
	Del-3-glc	1,04 mg/kg KG	19,5 nM	60 min	0,07 %
	Cy-3-rut	2,08 mg/kg KG	36,1 nM	120 min	0,10 %
	Cy-3-glc	1,24 mg/kg KG	4,9 nM	60 min	0,07 %
Anthocyanpräparat aus schwarzen Johannisbeeren ^d	Gesamtmenge	19,7 mg/kg KG	50 ng/ml	45 min	0,07 %

2.4.4 Aufnahme

Die tägliche Aufnahme von Anthocyanen wurde im Zuge unterschiedlicher Studien abgeschätzt. Zwischen den einzelnen Untersuchungen traten jedoch deutliche Abweichungen auf. Watzl *et al.* [2002] gaben für Deutschland eine tägliche Aufnahme von 2,7 mg pro Person mit einer Schwankungsbreite von 0–76 mg an. Die Autoren gaben zu Bedenken, dass bereits der tägliche Konsum eines Glases Rotwein (24–35 mg) diesen Wert deutlich erhöhen könne. Ein ähnlich hoher Wert wurde mit 12,5 mg/Tag für die USA angegeben [Wu *et al.*, 2006]. Deutlich höher lag dagegen die postulierte Anthocyanaufnahme für Personen in den USA nach Kühnau [1976] in Abhängigkeit zur Jahreszeit mit 180–215 mg/Tag. Die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen aus der Nahrung ist in Säugern mit weniger als 2 % sehr niedrig [Watzl *et al.*, 2002, Stoner *et al.*, 2005, Ichiyanagi *et al.*, 2006]. In einer Reihe von humanen Interventionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Anthocyanplasmaspiegel nach Verzehr anthocyanhaltiger Lebensmittel äußerst gering sind (Tabelle 7). In den meisten Fällen konnten bereits nach ~30 min Anthocyane im Plasma nachgewiesen werden. Die maximalen Plasmakonzentrationen stellten sich in Abhängigkeit des Lebensmittels nach 45–180 min ein. Diese schnelle Resorption spricht für eine Aufnahme der Anthocyane im Magen oder im oberen Dünndarmbereich. McGhie und Walton [2007] führten die geringe Bioverfügbarkeit von Anthocyanen auf die niedrige Aufnahme aus dem GIT zurück. Darüber hinaus geben die Autoren zu Bedenken, dass Anthocyane in Plasma und Urin analytisch vermutlich nur teilweise erfasst werden. *In vivo* liegt der Großteil der Anthocyane nicht in der detektierbaren Flavylumform, sondern vielmehr in der Halbacetal- oder der offenen Chalkonstruktur vor, und nimmt in dieser Form auch an Biotransformationsreaktionen teil. Chemische Modifikationen können dazu führen, dass die Anthocyane nicht mehr in der Lage sind, in die Flavylumform überzugehen. Eine Detektion mittels HPLC bei $\lambda = 530$ nm ist in diesem Fall nicht möglich.

Als klassischer Resorptionsort für Flavonoidglycoside im Körper gilt der Dünndarm

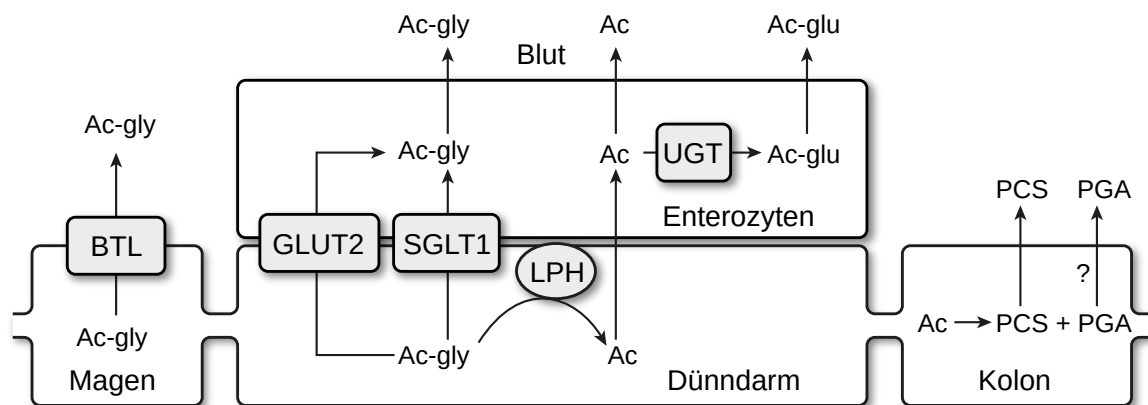


Abbildung 19: Aufnahme von Anthocyanen im Gastrointestinaltrakt. Abkürzungen: Ac: Anthocyanidine; Ac-gly: Anthocyanidinglycoside; Ac-glu: Anthocyananglucuronide; PCS: Phenolcarbonsäuren; PGA: Phloroglucinolaldehyd; BTL: Bilitranslocase; GLUT2: Glucosetransporter Typ 2; SGLT1: Natriumabhängiger Glucosetransporter 1; LPH: Lactat/Phloridzinhydrolase; CBG: Zytosolische β -Glucosidase; UGT: UDP-Glucuronyltransferase. Modifiziert nach Kay [2006] und McGhie und Walton [2007].

[Hollman *et al.*, 1995, Scalbert und Williamson, 2000, Williamson *et al.*, 2000]. Für Anthocyane werden im Dünndarm gegenwärtig zwei verschiedene Resorptionsmechanismen diskutiert. Da Anthocyane im Blut in glycosidischer Form gefunden wurden, wird davon ausgegangen, dass diese intakt resorbiert werden können. Für andere Flavonoidglycoside (z. B. verschiedene Quercetin-3-*O*-glycoside) konnte in Wistarratten gezeigt werden, dass diese über den natriumabhängigen Glucosetransporter 1 (SGLT1) aufgenommen werden können [Gee *et al.*, 2000]. Müllender *et al.* [2002] zeigten in einer humanen Interventionsstudie, dass Saccharose die Aufnahme von Cy-3-glc vermindert. Diese Tatsache spricht ebenfalls für eine aktive Aufnahme über den Glucosetransporter und könnte die Abweichungen in den Plasma- und Urinspiegeln zwischen den verschiedenen Humanstudien erklären. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Glucosetransporter Typ 2 (GLUT2) ebenfalls an der Anthocyanaufnahme beteiligt ist (Abbildung 19) [Faria *et al.*, 2009] .

Anthocyane wurden in geringer Menge auch in hydrolysierte Form (Anthocyanidine) [Talavéra *et al.*, 2005], bzw. als 3-*O*-Glucuronide im Plasma von Wistarratten nachgewiesen [Ichianagi *et al.*, 2005]. Kay *et al.* [2005] wiesen darüber hinaus in einer humanen Interventionsstudie Anthocyanglucuronide im Plasma nach, gaben die Glucuronidierungsposition jedoch nicht an. Das Auftreten der Aglyca sowie der Glucuronide in 3-*O*-Position setzt die Hydrolyse durch β -Glycosidasen voraus. Die Metabolisierungsprodukte traten im Serum bereits unter 1 h nach Verzehr auf, was darauf schließen lässt, dass die Spaltung bereits im Dün- und nicht im Dickdarm stattfand. Im oberen Dünndarm ist die mikrobielle Besiedelung jedoch sehr gering. Die einzige bekannte humane β -Glycosidase im Dünndarm ist die Lactat/Phloridzinhydrolase (LPH), die auf der Bürstensaummembran der Enterozyten lokalisiert ist. Day *et al.* [2000] konnten für verschiedene Flavonoidglycoside zeigen, dass diese von LPH gespalten werden. Die freigesetzten Aglyca sind im Neutralen weniger hydrophil als ihre entsprechenden Glycoside und können daher via passiver Diffusion von den Enterozyten aufgenommen werden. Noch in den Enterozyten könnte die Glucuronidierung mittels UDP-Glucuronyltransferase erfolgen (Abbildung 19) [Kay, 2006].

Der Magen wurde erst später als möglicher Resorptionsort in Betracht gezogen. Talavéra *et al.* [2003] und Passamonti *et al.* [2003] konnten durch Applikation von Anthocyanlösungen in Mägen anästhesierter Wistarratten nachweisen, dass die Substanzen direkt vom Magen aufgenommen werden. Passamonti *et al.* [2002] konnten den Transporter Bilitranslocase (BLT), der in epithelialen Zellen der gastrischen Mucosa lokalisiert ist, für die Anthocyanaufnahme vom Magen in den Blutkreislauf verantwortlich machen. Die Relevanz der gastrischen Anthocyanresorption im Menschen konnte durch eine Studie von Cai *et al.* [2011] bestätigt werden. Sie zeigten, dass Anthocyane, die über eine Schlundsonde direkt in den Magen appliziert werden, zu einem deutlich größeren Anteil resorbiert werden, als solche, die in den oberen Dünndarm eingebracht werden.

Im Gegensatz zum oberen Dünndarm ist der untere Dünndarm und der Kolon stark mit Mikroorganismen besiedelt, die in der Lage sind, Anthocyane abzubauen. Sie besitzen eine hohe β -Glucosidaseaktivität, sodass vor allem im Kolon die Aglyca der Anthocyane freigesetzt werden [Aura *et al.*, 2005]. Diese sind in der neutralen Umgebung des Kolons deutlich

instabiler als intakte Anthocyane und zerfallen spontan zu Phloroglucinacetaldehyd und der entsprechenden Phenolcarbonsäure [Fleschhut *et al.*, 2006]. Die intestinale Mikroflora setzt diesen initial gebildeten Aldehyd weiter zu Phloroglucinolaldehyd um (Abschnitt 2.4.2). Die Resorption der gebildeten Phenolcarbonsäuren konnte von Tsuda *et al.* [1999] im Blutplasma von Wistarratten gezeigt werden. Für die Aufnahme von Phloroglucinolaldehyd wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt. Dies ist eventuell auf die hohe Reaktivität von Phloroglucinolaldehyd mit Makromolekülen, beispielsweise Proteinen, zurückzuführen, die eine Quantifizierung der Substanz erschwert.

2.4.5 Metabolisierung und Ausscheidung

Flavonoide unterliegen im menschlichen Körper einer intensiven Metabolisierung. So konnten Walle *et al.* [2001] für isopenmarkiertes Quercetin zeigen, dass, abhängig vom Probanden, 23–81 % der aufgenommenen Substanz als CO₂ abgeatmet werden. Die respiratorische Ausscheidung wäre für Anthocyane ebenfalls denkbar, wurde bislang jedoch nicht untersucht [Kay, 2006, He und Giusti, 2010].

Obwohl Anthocyane reaktive Spezies darstellen, werden diese nach Aufnahme teilweise unverändert im Urin wiedergefunden [Tsuda *et al.*, 1999, McGhie *et al.*, 2003]. Dennoch wird ein großer Teil der Anthocyane im menschlichen Körper durch Phase II-Reaktionen konjugiert. Die wichtigsten Konjugationsreaktionen für Flavonoide stellen die Glucuronidierung mittels UGT [Oliveira *et al.*, 2002], die Methylierung durch Catechol-*O*-methyltransferasen (COMT) [Kuhnle *et al.*, 2000] und die Sulfatierung über Sulfotransferasen [Coughtrie *et al.*, 1998] dar. Biotransformationsreaktionen finden hauptsächlich im Dünndarmepithel und in der Leber statt [Kay, 2006] (Abbildung 20).

Wu *et al.* [2002] wiesen nach Verzehr von Holunderbeerextrakt in humanem Plasma Glucuronidierungsprodukte von Cy-3-glc nach, konnten die exakten Konjugationspositionen aber nicht bestimmen. Neben der Möglichkeit der Konjugation mittels UGT schlugen die Autoren auch die Möglichkeit der UDP-Glucose-Dehydrogenase-katalysierten Oxidation des Glucoserests in Glucuronsäure vor. In einer späteren Publikation [Wu *et al.*, 2005] nahmen die Autoren jedoch wieder Abstand von dieser Hypothese und präferierten die Umsetzung mittels UGT, die eine vorherige Hydrolyse des Anthocyans voraussetzt. Weiter zeigten sie in einem Model mit jungen Schweinen, dass neben Cyanidin- auch Pelargonidinglycoside glucuronidiert werden, Delphinidinglycoside jedoch nicht.

Die Methylierung von Anthocyanen wurde bislang hauptsächlich in der Position 3' und 4' des B-Rings beobachtet [Miyazawa *et al.*, 1999, Felgines *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2005]. Prior und Wu [2006] gingen davon aus, dass Anthocyane im Wesentlichen über COMT methyliert werden. Da COMT catecholische Strukturen voraussetzen, wurden bislang keine Methylierungsprodukte für die Glycoside von Pelargonidin, Malvidin und Petunidin gefunden.

Die Sulfatierung von Anthocyanen konnte von Felgines *et al.* [2003] nachgewiesen werden. Sie zeigten die Umsetzung von Pel-3-glc zu Pelargonidinmonosulfat. Da keine Sulfate für Pel-3-glc nachgewiesen werden konnten, gingen die Autoren davon aus, dass die Sulfatierung

in Position 3 erfolgte.

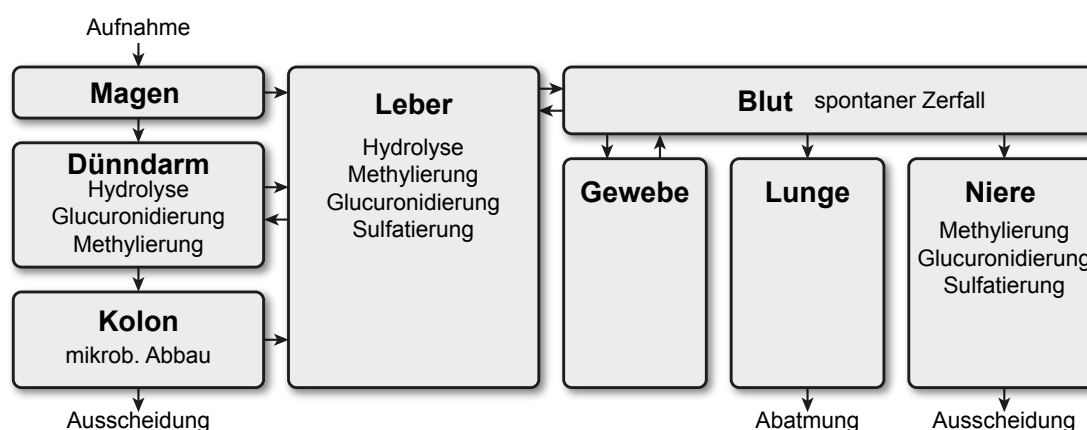


Abbildung 20: Aufnahme, Metabolismus und Ausscheidung von Anthocyanen. Modifiziert nach Kay [2006].

2.4.6 Wasserstoffperoxidbildung in Zellkultursystemen

In *in vitro*-Zellkultursystemen sind Polyphenole in der Lage, H_2O_2 zu generieren. Dieses kann eine Akkumulation von ROS im Zellkulturmedium verursachen [Halliwell *et al.*, 2000, Lapidot *et al.*, 2002] und folglich zu experimentellen Artefakten der untersuchten biologischen Endpunkte führen. Das Ausmaß der H_2O_2 -Generierung ist insbesondere vom gewählten Zellkulturmedium abhängig [Long *et al.*, 2000]. So stellte sich von drei untersuchten Kulturmedien „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM) hinsichtlich der H_2O_2 -Generierung als das potenteste heraus. Weiterhin scheinen die Polyphenolkonzentration sowie die Inkubationsdauer einen Einfluss auf das Ausmaß der H_2O_2 -Entwicklung zu besitzen. Die H_2O_2 -Bildung von Delphinidin in DMEM konnte von Kern *et al.* [2007] sowohl nach 15 als auch 45 min Inkubation nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der polyphenolvermittelten H_2O_2 -Produktion ist noch nicht abschließend geklärt. Am wahrscheinlichsten scheint dafür ein autoxidativer Prozess, der über die Catecholstruktur des Polyphenol-B-Rings vermittelt wird, verantwortlich zu sein [Hou *et al.*, 2005]. Dieser könnte durch Cu^{2+} -Ionen aus dem Zellkulturmedium katalysiert werden [Lapidot *et al.*, 2002].

Die Generierung von H_2O_2 in *in vitro*-Versuchen führte in Untersuchung zur RTK-Aktivität und Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs zu experimentellen Artefakten. DeYulia Jr. *et al.* [2005] konnten zeigen, dass der Phosphorylierungsstatus des EGFR und die anschließende Signaltransduktion in Anwesenheit von H_2O_2 erhöht war. In Untersuchungen bezüglich der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs spielt H_2O_2 eine besondere Rolle, da sowohl H_2O_2 als auch daraus resultierende ROS klassische Induktoren für diese Signalkaskade darstellen (Abschnitt 2.2.6) [Ding *et al.*, 2008].

Die H_2O_2 -Bildung während der Inkubation mit Polyphenolen kann somit einen Einfluss auf *in vitro*-Untersuchungen besitzen und erschwert den Rückschluss auf substanzvermittelte Effekte. Um Artefakte auszuschließen, kann die Akkumulation von H_2O_2 bzw. ROS im

Zellkulturmedium durch die Zugabe des Enzyms Katalase unterbunden werden [Nakagawa *et al.*, 2004, Veeriah *et al.*, 2006]. Das Enzym katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Der Zusatz von 100 U/ml Katalase ist ausreichend, um die anthocyanvermittelte H₂O₂-Akkumulation in DMEM zu unterdrücken [Kern *et al.*, 2007].

2.5 Biologische Wirkung von Anthocyanen

In vitro und *in vivo* konnte ein breites Spektrum protektiver Eigenschaften von Anthocyanen nachgewiesen werden. Die Wichtigsten sind antioxidative, chemoprotektive, antiinflammatorische, antidiabetische, neuroprotektive und antiangiogenetische Wirkungen [Zafra-Stone *et al.*, 2007]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll auf die antioxidative und chemoprotektive Wirkung von Anthocyanen im Kontext von Tumorerkrankungen detailliert eingegangen werden.

2.5.1 Antioxidative Eigenschaften

Antioxidativ wirksame Lebensmittelinhaltsstoffe sind in der Lage, oxidativem Stress entgegenzuwirken. Dieser stellt eine Stoffwechsellage dar, bei dem ROS über das physiologische Ausmaß hinaus gebildet werden. Die wichtigsten ROS sind Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$), Superoxid-anionradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [Gille und Sigler, 1995]. Oxidativer Stress steht unter Verdacht, an der Pathogenese neurodegenerative Krankheiten (z. B. Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer) und Herzkreislauferkrankungen (z. B. koronare Herzkrankheit oder Arteriosklerose) beteiligt zu sein [Nunomura *et al.*, 2007, Harrison *et al.*, 2003]. Außerdem können ROS zu DNA-Schäden führen, die letztendlich für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind [Aruoma, 1994]. Nach ihrer Wirkweise werden Antioxidantien in Radikalfänger oder Reduktionsmittel unterteilt.

In vitro-Untersuchungen

Für die Erfassung der antioxidativen Wirkung von Testsubstanzen stehen verschiedene, zellfreie *in vitro*-Assays zur Verfügung. Die Wichtigsten sind der *Trolox-equivalent antioxidant capacity* (TEAC), der *Oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) und der *Ferric reducing antioxidant potential assay* (FRAP). Weitere Tests basieren auf der Oxidation von Lipoproteinen (*Low density lipoprotein*, LDL) oder Liposomen.

Wang *et al.* [1997] zeigten für isolierte Anthocyane und Anthocyanidine ein durchweg hohes antioxidatives Potential im ORAC-Assay auf. Der höchste ORAC-Wert wurde dem Aglycon Cyanidin mit 2,2 Troloxäquivalenten zugeordnet. Die anderen Aglyca folgten in der Reihenfolge Malvidin > Delphinidin > Peonidin $\approx$ Pelargonidin mit Troloxäquivalenten zwischen 1 und 2. Die antioxidative Kapazität von Cyanidin wurde durch die Konjugation mit Glucose erhöht, im Falle von Malvidin wurde diese durch Glucosylierung jedoch vermindert. Ein eindeutiger Trend für das antioxidative Potential durch Glycosylierung konnte somit nicht abgeleitet werden. Heinonen *et al.* [1998] untersuchten die hemmende Wirkung verschiedener Beerenextrakte auf die Oxidation von LDL und Liposomen. Dabei konnten sie das antioxidative Potential der Extrakte direkt mit deren Anthocyangehalt korrelieren. Kähkönen und Heinonen [2003] bestimmten das antioxidative Potential von Anthocyanen und deren Aglyca ebenfalls als Maß, die Oxidation von LDL zu unterdrücken. Sie ermittelten eine ähnliche Reihenfolge der antioxidativen Kapazitäten wie Wang *et al.* [1997]:

Delphinidin = Cyanidin > Malvidin > Peonidin > Pelargonidin > Petunidin. Während sich die Monoglycosylierung bei Delphinidin und Cyanidin kaum auf die antioxidative Kapazität auswirkte, wurde diese bei Malvidin und Petunidin deutlich erniedrigt. In einer weiteren Studie konnte der Trend, dass vor allem Anthocyane mit vicinalen Hydroxygruppen in zellfreien Assays die höchste antioxidative Wirksamkeit besitzen, bestätigt werden [Kähkönen *et al.*, 2003]. Für andere Flavonoide mit vicinalen Hydroxygruppen am B-Ring, wie Quercetin oder (+)-Catechin, wurde dies ebenfalls gezeigt [Chen *et al.*, 1996, Rice-Evans *et al.*, 1996].

Die antioxidative Wirkung von Flavonoiden und Anthocyanen kann somit auf ihre Struktur als Radikalfänger zurückgeführt werden. Sie können Wasserstoffatome an Superoxid-, Hydroxy- oder Peroxyradikale abgeben und werden selber über mehrere mesomere Grenzstrukturen stabilisiert (Abbildung 21) [Castañeda Ovando *et al.*, 2009].

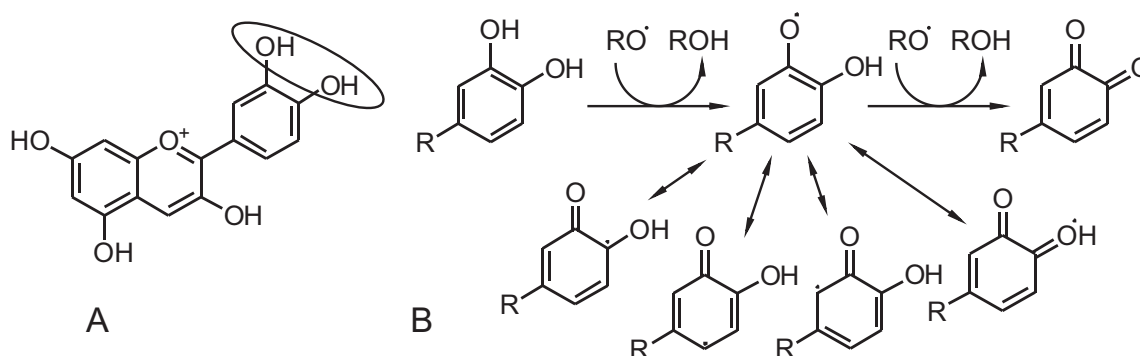


Abbildung 21: Antioxidative Eigenschaften von Cyanidin. A) Vicinalale Hydroxygruppen; B) Resonanzstabilisierung des Cyanidinradikals. R = Benzopyryliumkation. Modifiziert nach Castañeda Ovando *et al.* [2009].

Darüber hinaus wird die antioxidative Wirkung von Anthocyanen durch die Fähigkeit, Metallionen zu komplexieren, erhöht [Sarma *et al.*, 1997]. So können beispielsweise Cu^{2+} -Ionen abgefangen werden und stehen nicht mehr für ROS-bildende Fentonreaktion zur Verfügung. Anthocyane sind zur Komplexbildung mit Metallionen insbesondere in der Flavyliumform bei niedrigem pH (< 3) in der Lage. Somit ist fraglich, inwiefern dieser Effekt eine physiologische Relevanz besitzt.

Die antioxidative Wirkung von Anthocyanen wurde weiterhin in einer Reihe von Zellkulturmodellen untersucht. Aus diesen Untersuchungen konnte eine Vielzahl an möglichen Mechanismen abgeleitet werden, mit denen Anthocyane auf die Zellen wirken. So konnte im sogenannten DCF-Assay (2',7'-Dichlordihydrofluorescein) in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 gezeigt werden, dass die Bildung von ROS durch Cyanidin unterdrückt wird [Renis *et al.*, 2008]. Das Anthocyan Cy-3-glc zeigte in diesem Assay eine deutlich schwächere Wirkung. In derselben Studie konnte für Cy-3-glc eine strangbruchvermindernde Wirkung im Comet-Assay aufgezeigt werden, jedoch nicht für das Aglycon Cyanidin. Afaq *et al.* [2006] wiesen darüber hinaus in Modellen mit Hautzellen nach, dass die Vorinkubation mit Delphinidin die zelluläre Abwehr gegenüber UVB-vermittelten oxidativem Stress erhöht.

Shih *et al.* [2007] zeigten in der Rattenhepatozytenlinie Clone-9, dass das zytotoxische Potential von H_2O_2 durch Koinkubation mit verschiedenen Anthocyanidinen und Anthocyanen vermindert wird. Ebenso wurde die H_2O_2 -induzierte Apoptose in diesen Zellen durch Inkubation mit Anthocyanen und Anthocyanidinen unterdrückt. Weiterhin wiesen die Autoren nach, dass sowohl die Expression als auch die Aktivität verschiedener Phase II-Enzyme (Abschnitt 2.2) nach Inkubation mit Anthocyanen und deren Aglyca induziert wurde. Die Induktion dieser Nrf2/ARE-regulierten Gene stellt, neben der ROS-abfangenden Wirkung, somit eine weitere mechanistische Wirkweise von Anthocyanen dar, die antioxidative Abwehr von Zellen zu erhöhen. Diese These wird unterstützt durch weitere Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die anthocyaninduzierte Expression von Phase II-Enzymen die antioxidative Kapazität von Zellen in unterschiedlichen Assays erhöht [Singletary *et al.*, 2007, Hwang *et al.*, 2011a,b].

***In vivo*-Untersuchungen**

In vivo wurde die antioxidative Wirkung von Anthocyanen in zahlreichen humanen Interventionsstudien, vor allem im Kontext der Entstehung von Herz-Kreislauf-erkrankungen, untersucht (Tabelle 8). Der überwiegende Teil dieser Studien basiert auf Biomarkern, die im Blut bzw. Plasma bestimmt werden können. Der am häufigsten untersuchte Parameter ist die antioxidative Kapazität im Plasma, bestimmt mit dem ORAC-, TEAC- oder FRAP-Assay. Ein weiterer Parameter ist der Plasmagehalt von Malondialdehyd, einem Biomarker für die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren [Yagi, 1984]. Außerdem können im Comet-Assay DNA-Strangbrüche und oxidative DNA-Schäden in mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) erfasst werden [Singh *et al.*, 1988]. Daneben gibt es weitere Biomarker im Plasma und Urin, die zur Erfassung antioxidativer Effekte von Naturstoffen *in vivo* im Menschen herangezogen werden können (Tabelle 8).

In vielen dieser Studien wurde die antioxidative Kapazität des Plasmas nach Intervention mit den Präparationen erhöht [Mazza *et al.*, 2002, Matsumoto *et al.*, 2002, Kay und Holub, 2002, Jensen *et al.*, 2008]. In einigen Studien dagegen wurden diese Parameter nach Verabreichung nicht oder nur geringfügig beeinflusst [Bub *et al.*, 2003, Riso *et al.*, 2005]. Die Erfassung von DNA-Schäden in PBMC nach Intervention führte nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen. So konnten Weisel *et al.* [2006] nach Intervention mit einem anthocyanreichen Multifruchtsaft eine deutliche Verringerung der oxidativen DNA-Schäden in PBMC der Probanden aufzeigen. In einer anderen Interventionsstudie von Møller *et al.* [2004] hatte ein Saft aus schwarzen Johannisbeeren jedoch weder auf die DNA-Grundsäden noch die oxidativen DNA-Schäden in PBMC eine Wirkung. In der selben Studie erhöhte eine Anthocyanpräparation aus schwarzen Johannisbeeren in derselben Dosis sogar die oxidativen DNA-Schäden (Tabelle 8).

In diesen Humanstudien wurden anthocyanreiche Lebensmittel oder aber Präparationen, angereichert mit Anthocyanen, verabreicht, nicht jedoch isolierte Anthocyane. Die Beobachtungen können daher nicht eindeutig auf den Anthocyananteil zurückzuführen werden, da

Tabelle 8: Auswahl humaner Interventionstudien zur antioxidativen Wirkung anthocyanreicher Präparate und Lebensmittel. Abkürzungen: PBMC: mononukleäre peripheren Blutzellen; ↑: Erhöhung; ↓: Verringerung, ⇔ keine Änderung. Referenzen: a) Mazza *et al.* [2002]; b) Matsumoto *et al.* [2002]; c) Kay und Holub [2002]; d) Bub *et al.* [2003]; e) Møller *et al.* [2004]; f) Riso *et al.* [2005]; g) Weisel *et al.* [2006]; h) Duthie *et al.* [2006]; i) Jensen *et al.* [2008].

Präparat	Dosis	Dauer	Ergebnis
Blaubeeren (gefrier- getrocknet) ^a	1 200 mg	Einzeldosis	↑ antioxidative Kapazität des Plasmas
Anthocyanpräparat aus schwarzen Johannis- beeren ^b	3,6 mg/kg KG	Einzeldosis	↑ antioxidative Kapazität des Plasmas
Blaubeeren (gefrier- getrocknet) ^c	1 200 mg	Einzeldosis	↑ antioxidative Kapazität des Plasmas
Anthocyanreicher Fruchtsaft ^d	69 mg/Tag	2 Wochen	⇔ antioxidative Kapazität des Plasmas ↓ Malondialdehyd im Plasma
Saft aus schwarzen Johannisbeeren ^e	285–600 mg/Tag	3 Wochen	⇔ DNA-Grundsäden in PBMC ⇔ ox. DNA-Schäden in PBMC
Anthocyanpräparat aus schwarzen Johannis- beeren ^e	285–600 mg/Tag	3 Wochen	↑ DNA-Grundsäden in PBMC ⇔ ox. DNA-Schäden in PBMC
Blutorangensaft ^f	28 mg/Tag	3 Wochen	⇔ antioxidative Kapazität des Plasmas ⇔ Malondialdehyd im Plasma
Multifruchtsaft ^g	139 mg/Tag	3 Wochen	⇔ DNA-Grundsäden in PBMC ↓ ox. DNA-Schäden in PBMC ↑ Glutathionstatus ⇔ Malondialdehyd im Plasma
Cranberrysaft ^h	2,1 mg/Tag	2 Wochen	⇔ antioxidative Kapazität des Plasmas ⇔ DNA-Schäden in PBMC
Multifruchtsaft ⁱ	177 mg	Einzeldosis	↑ antioxidative Kapazität des Plasmas ↓ Malondialdehyd im Plasma

Anthocyane meist von anderen Substanzen, unter anderem Vitamin C, begleitet werden.

2.5.2 Chemopräventive Eigenschaften

Die Entstehung von Tumoren ist meist ein langjähriger Prozess und kann verschiedene Ursachen haben. So spielen unter anderem die genetische Disposition, das Ernährungsverhalten, Strahlungsexposition, chronische Entzündungen, Alkohol- oder Nikotinkonsum und Infektionen mit Viren oder Bakterien eine Rolle bei der Kanzerogenese [Robert-Koch-Institut, 2012]. In der aktuellen Forschung wird von ein mehrstufigen Prozess ausgegangen, der mit einer Akkumulation genetischer Veränderungen (Mutationen) einhergeht. Diese können sich als Verlust bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder Reparaturprozessen

sowie als Aktivierung von Onkogenen manifestieren [Kelloff *et al.*, 2006]. Chemoprävention als wissenschaftliches Fachgebiet beschäftigt sich mit Prozessen, die der Krebsentstehung entgegenwirken, das heißt diese zu verlangsamen, zu hemmen oder rückgängig zu machen. Wichtige Ziele sind die Identifizierung von Substanzen mit chemopräventivem Potential, die Aufklärung molekularer Wirkmechanismen und der Nachweis der Wirksamkeit im Tiermodell bzw. in humanen Interventionsstudien.

Epidemiologische Studien

Ergebnisse aus epidemiologischen Studien legen nahe, dass ein erhöhter Konsum von Obst und Gemüse mit einem verringerten Risiko von Tumorerkrankungen verbunden ist. In einer Reihe prospektiver Studien im Rahmen der „*European Investigation into Cancer and Nutrition*“ (EPIC) konnte der erhöhte Verzehr von Obst und Gemüse mit dem reduzierten Risiko an Neoplasien des Kehlkopfs und des Rachens [Boeing *et al.*, 2006] sowie des Ösophagus und des Magens [González *et al.*, 2006] verknüpft werden. In geringerem Ausmaß wurde diese Wirkung auch in der Lunge aufgezeigt [Büchner *et al.*, 2010]. Der Einfluss von Obst- und Gemüsekonsum auf die Bildung kolorektaler Tumoren schien dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen [van Duijnhoven *et al.*, 2009]. Während Huxley *et al.* [2009] keinen Zusammenhang feststellen konnten, zeigten Koushik *et al.* [2007] lediglich eine schwache Verbindung zwischen einem erhöhten Obst- und Gemüsekonsum und dem verringerten Risiko für kolorektale Tumore.

In epidemiologischen Studien in denen das Ausmaß der Anthocyanaufnahme in die Untersuchungen miteinflusst, konnte jedoch eine Verringerung des Darmkrebsrisikos aufgezeigt werden. So konnte in einer italienischen Fall/Kontroll-Studie der Anthocyankonsum mit der verringerten Inzidenz an Kolorektaltumoren korreliert werden [Rossi *et al.*, 2006]. In einer retrospektiven, US-amerikanischen Studie wurde der Verzehr von Anthocyanen darüber hinaus mit einem erniedrigten Risiko für die Ausbildung von Ösophagustumoren unter den weißen männlichen Probanden assoziiert [Bobe *et al.*, 2009].

In vivo-Untersuchungen

In zahlreichen Tierstudien konnte die chemopräventive Wirkung von Anthocyanen anhand der Wachstumshemmung von Tumoren gezeigt werden. Eine repräsentative Übersicht verschiedener Studien ist in Tabelle 9 aufgelistet. Die Wirksamkeit im Menschen konnte ebenfalls in einigen humanen Interventionsstudien nachgewiesen werden. So konnte in einer Reihe von Studien um Gary D. Stoner an der Ohio State University durch topische Applikation¹ gefriergetrockneter, schwarzer Himbeeren auf prä-maligne orale Läsionen und Präkanzerosen des Ösophagus (Barrettösophagus) einen positiven Effekt auf verschiedene Tumormarker (beispielsweise die urinale Ausscheidung von 8-Epiprostaglandin F_{2α} oder 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin) nachgewiesen werden [Kresty *et al.*, 2006, Mallery *et al.*, 2008, Shumway *et al.*, 2008]. Thomasset *et al.* [2009a] zeigten, dass die wiederholte Gabe eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts die Proliferation im Tumorgewebe von

¹Topische Applikation: Lokale Auftragung eines Wirkstoffs (im Gegensatz zur systemischen Gabe).

Kolorektaltumorpationen signifikant verringert. Darüber hinaus konnten Wang *et al.* [2011] nachweisen, dass der Konsum eines Anthocyanpräparats aus schwarzen Himbeeren die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg als chemopräventiv angesehen werden, in Kolorektalkarzinomen vorteilhaft moduliert.

Tabelle 9: Tierstudien zur chemoprotektiven Wirkung von Anthocyanen und anthocyanreicher Präparate. Abkürzungen: APC^{Min}: Verlust des Adenomatösen Polyposis Coli Protein/Gen, DMBA: 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen; M₁dG: Malondialdehyd-DNA-Addukt; NMBA: *N*-Nitrosomethylbenzylamin; TPA: 12-*O*-Tetradecanolyphorbol-13-acetat; ↓: Verringerung; ⇔: Keine Beeinflussung. Referenzen: a) Singletary *et al.* [2003]; b) Cooke *et al.* [2006]; c) Chen *et al.* [2006]; d) Ding *et al.* [2006]. Modifiziert nach Thomasset *et al.* [2009b].

Model	Präparat	Anthocyandosis	Dauer	Ergebnis
Brustkrebs, DMBA-behandelte Ratten ^a	Traubenextrakt (rot)	781 mg/l Trinkwasser	20 Wochen	↓ Tumorinzidenz ↓ Tumormasse
Kolorektum, APC ^{Min} -Mäuse ^b	Cy-3-glc	≤ 0,3 % der Nahrung	12 Wochen	↓ Tumoranzahl ↓ M ₁ dG (Adenome)
	Heidelbeerextrakt	≤ 0,1 % der Nahrung	12 Wochen	↓ Tumoranzahl ↓ M ₁ dG (Adenome)
Ösophagus, NMBA-behandelte Ratten ^c	Lyophilisierte schwarze Himbeeren	0,3 % der Nahrung	25 Wochen	↓ Tumorinzidenz ↓ Tumormultiplizität ⇔ Tumolvolumen
Haut, TPA- und DMBA-behandelte Mäuse ^d	Cy-3-glc	3,5 µM topisch, 2 × wöchentlich	21 Wochen	↓ Tumoranzahl ↓ Tumorgroße
Xenograft, A549 (humane Lungenkarzinomzellen) in Mäusen ^d	Cy-3-glc	9,5 mg/kg intra-peritoneal, 3 × wöchentlich	5 Wochen	↓ Xenograftwachst. ↓ Metastasen

In vitro-Untersuchungen

In den zuvor erwähnten *in vivo*-Studien konnte zwar den Effekt von Anthocyanpräparaten auf das Tumorwachstum bzw. die Modulation bestimmter Tumormarker gezeigt werden, für die Aufklärung der wirkmechanistischen Ursachen wurden dagegen verschiedene *in vitro*-Versuche durchgeführt. Bislang konnten unterschiedliche Mechanismen, über die Anthocyane ihr chemoprotektives Potential vermitteln, identifiziert werden. So unterdrücken Anthocyane die Neoangiogenese über die Hemmung von VEGF- und PDGF-Rezeptoren [Lamy *et al.*, 2006, 2008, Teller *et al.*, 2009a] und induzieren Apoptose unter anderem über die Aktivierung des JNK-Signalwegs [Yeh und Yen, 2005, Chen *et al.*, 2005]. Weiterhin erhöhen sie die Effizienz von antineoplastischen Chemotherapeutika durch die verringerte Expression von Xenobiotikaeffluxpumpen [Dreiseitel *et al.*, 2009, Ernst *et al.*, 2010]. Nicht zuletzt wird die Neubildung ROS-vermittelter Mutationen durch die antioxidative Wirkung von Anthocyanen unterdrückt (Abschnitt 2.5.1). Für die vorliegende Arbeit spielt die wachstumshemmende Wirkung von Anthocyanen auf Tumorzellen durch Modifikation RTK-vermittelter Signalkas-

kaden eine wichtige Rolle und soll im Anschluss betrachtet werden.

Wachstumshemmung von Tumorzellen durch RTK-Inhibierung

Das wachstumshemmende Potenzial von Anthocyanen und Anthocyanidinen wurde in einer Vielzahl an Tumorzelllinien untersucht [Cooke *et al.*, 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 gelegt. Ergebnisse aus Studien zur Wachstumshemmung im Zusammenhang mit diesen Zellen sind in Tabelle 10 aufgeführt. In allen Zelllinien zeigte sich, dass Anthocyanidine eine deutlich höhere Hemmwirkung aufweisen als die entsprechenden Anthocyane. In der Regel wurde das Zellwachstum durch Anthocyanidine im Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-4} M gehemmt, während dies für Anthocyane unterhalb von 10^{-4} M nicht beobachtet wurde. Unter den Anthocyanidinen zeigten sich vor allem Delphinidin, gefolgt von Cyanidin und Malvidin als Vertreter mit der stärksten Wachstumshemmwirkung gegenüber HT29-Zellen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Studien zur Beeinflussung der Zellproliferation von HT29-Zellen durch Anthocyanidine und Anthocyane nach 72 h Inkubation. Abkürzungen: IC_{50} : Konzentration durch die 50 % Hemmwirkung erzielt wird. Referenzen: a) Marko *et al.* [2004]; b) Kang *et al.* [2003]; c) Olsson *et al.* [2004]. Modifiziert nach Cooke *et al.* [2005]

Testsubstanz	Wachstumshemmung
Delphinidin	IC_{50} 35 μ M ^a
Cyanidin	IC_{50} 57 μ M ^a IC_{50} 63 μ M ^b
Malvidin	IC_{50} 35 μ M ^a
Peonidin	IC_{50} 90 μ M ^a
Pelargonidin	IC_{50} > 100 μ M ^a
Del-3-glc	87 % 431 μ M ^c
Cy-3-glc	88 % 446 μ M ^c
Mv-3-glc	90 % 407 μ M ^c

In der klinischen Onkologie konnten TKI, zumindest unter bestimmten Umständen, als hochpotente, antineoplastische Chemotherapeutika identifiziert werden (Abschnitt 2.1.5). Die Beeinflussung von RTK sowie deren nachgeschaltete Signalwege durch Anthocyane bzw. Anthocyanidine konnte mehrfach gezeigt werden und mit der Wachstumshemmung von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden.

Delphinidin moduliert zahlreiche Signalwege in Tumorzellen durch die Inhibierung des EGFR. So wurde die Aktivität des EGFR und nachgeschalteter Signalelemente wie PI3K, Akt sowie verschiedener MAPK in Brustkrebszellen (AU-565) durch Inkubation mit Delphinidin herunterreguliert. Der Effekt in gesunden Epithelzellen (184A1) war hingegen minimal [Afaq *et al.*, 2008]. Darüber hinaus konnte durch Delphinidininkubation von murinen Epidermalzellen (JB6 P⁺) gezeigt werden, dass Elemente des ERK1/2-MAPK-Signalwegs deaktiviert werden. Infolge wurde die EGF/H-Ras-induzierte Transformation dieser Zellen

unterbunden [Kang *et al.*, 2008]. Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass verschiedene Vertreter der ErbB- sowie der VEGF-Rezeptorfamilie sowohl im zellfreien System als auch in humanen Vulvakarzinom- (A431) und porzinen¹ Aortaendothelzellen durch Inkubation mit Delphinidin gehemmt werden [Teller *et al.*, 2009a,b]. In HT29- und A431-Zellen wurde die ErbB2-Rezeptorphosphorylierung durch Delphinidin stärker unterdrückt, als durch Quercetin in analogen Konzentrationen [Fridrich *et al.*, 2008b]. Im Gegensatz dazu wurde der EGFR durch Delphinidin im Vergleich zu Quercetin schwächer gehemmt. Dies könnte auf eine gewisse Spezifität der Anthocyane für bestimmte Rezeptoren schließen lassen.

In weiteren Struktur-/Aktivitätsuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass vicinale Hydroxygruppen des B-Rings ein wesentliches Strukturmerkmal für die Aktivität von Anthocyanen darstellen. So zeigten Hou *et al.* [2004], dass in JB6 P⁺-Zellen lediglich die Anthocyanidine Delphinidin, Cyanidin und Petunidin in der Lage waren, 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat-induzierte Zelltransformation und AP-1-Aktivierung zu unterdrücken, nicht jedoch Pelargonidin, Peonidin und Malvidin. Darüber hinaus zeigten die Autoren in diesen Zellen, dass die TPA-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK durch Delphinidin, jedoch nicht durch Peonidin gehemmt wird. Diese Struktur-/Aktivitätsbeziehung konnte von Marko *et al.* [2004] für die EGFR-Hemmwirkung im zellfreien System bestätigt werden. Wenngleich das methoxylierte Malvidin die Phosphorylierung des EGFR nicht verringert, so scheint es dennoch den MAPK-Signalweg über einen *Crosstalk* via Phosphodiesterasen zu unterdrücken [Meiers *et al.*, 2001, Marko *et al.*, 2004].

¹porzin: vom Schwein

2.6 Verkapselungsmethoden von Lebensmittelinhaltsstoffen

Unter Verkapselung wird die Immobilisierung von Wirkstoffen in Kapseln oder Matrices, mit der Absicht diese unter bestimmten Umgebungsbedingungen wieder freigegeben, verstanden [Champagne und Fustier, 2007]. Verkapselungstechniken finden derzeit vor allem bei der Herstellung pharmakologischer Produkte Anwendung. Auch im lebensmitteltechnologischen Sektor finden Formulierungstechniken zunehmend Verwendung. Vor allem die Mikroverkapselung kann genutzt werden um Nahrungsergänzungsmittel oder andere, wertgebende Additive in Lebensmittel einzubringen. Diese Technik bietet gegenüber dem konventionellen Einsatz von Additiven mehrere Vorteile [Gouin, 2004, Champagne und Fustier, 2007]:

- Instabile Verbindungen werden während Lebensmittelprozessierung und -lagerung geschützt. Einflussfaktoren, die die Stabilität der entsprechenden Zusatzstoffe beeinträchtigen, wie pH-Wert, Ionen- oder Sauerstoffkonzentration können durch die Kompartimentierung vermindert werden. Weiterhin lässt sich durch Verkapselung eine räumliche Trennung der Additiven gegenüber reaktiver Matrixbestandteile erreichen.
- Bioaktive Verbindungen können im GIT kontrolliert freigesetzt werden. Dabei lassen sich Größen wie Freisetzungszeitpunkt, -ort oder -geschwindigkeit beeinflussen. Auslöser für die Freisetzung stellen unter anderem enzymatische Aktivität und Änderungen von pH-Wert, Temperatur bzw. osmotischem Druck dar.
- Unerwünschte sensorische Eigenschaften der Zusatzstoffe wie Geschmack, Geruch oder Farbe können durch die Mikroverkapselung maskiert werden. Da Mikrokapseln selbst jedoch die Textur des Lebensmittels beeinflussen, werden im Allgemeinen kleinstmögliche Kapselmaße angestrebt.

Ein breites Spektrum an bioaktiven Substanzen wurde bereits in Kapseln eingearbeitet. So konnte in Studien die Stabilisierung von Lipiden, Vitaminen, Peptiden, Fettsäuren, Antioxidantien, Mineralstoffen und darüber hinaus Mikroorganismen wie Probiotika durch Kapselsysteme gezeigt werden [Champagne und Fustier, 2007, Burey *et al.*, 2008, McClements *et al.*, 2007]. Die Stabilisierung von anthocyanreichen Extrakten durch Verkapselung wurde ebenfalls mehrfach aufgezeigt [Gradinaru *et al.*, 2003, Xiong *et al.*, 2006, Robert *et al.*, 2010]. Jede Substanz hat aufgrund ihrer Struktur unterschiedliche Ansprüche an die Verkapselungsart, sodass für jede Anwendung eine individuelle Formulierung erarbeitet werden muss. Daher liegen gegenwärtig verschiedene Konzepte zur Formulierung von Lebensmitteladditiven vor. Wichtige Systeme, die für die orale Aufnahme bestimmt sind, stellen Emulsionen [McClements *et al.*, 2007], Liposomen [Sharma und Sharma, 1997], Hohlkapseln [Semo *et al.*, 2007], Cyclodextrine [Szejtli, 1998, Goubet *et al.*, 1998] und Matrixkapseln [Madziva *et al.*, 2006, Sutter *et al.*, 2007] dar. Zur Formulierung stehen der Lebensmitteltechnologie verschiedene Verfahren, wie Sprüh- und Wirbelschichttrocknung, Extrusion und Emulgierung, zur Verfügung [De Vos *et al.*, 2010]. Verkapselungsmaterialien sind in der Regel Polysaccharide, wie Chitosane, Alginate oder Pektinate, Proteine oder Lipide [Champagne und Fustier, 2007,

McClements *et al.*, 2007, De Vos *et al.*, 2010]. Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kapselsysteme erläutert (Abbildung 22).

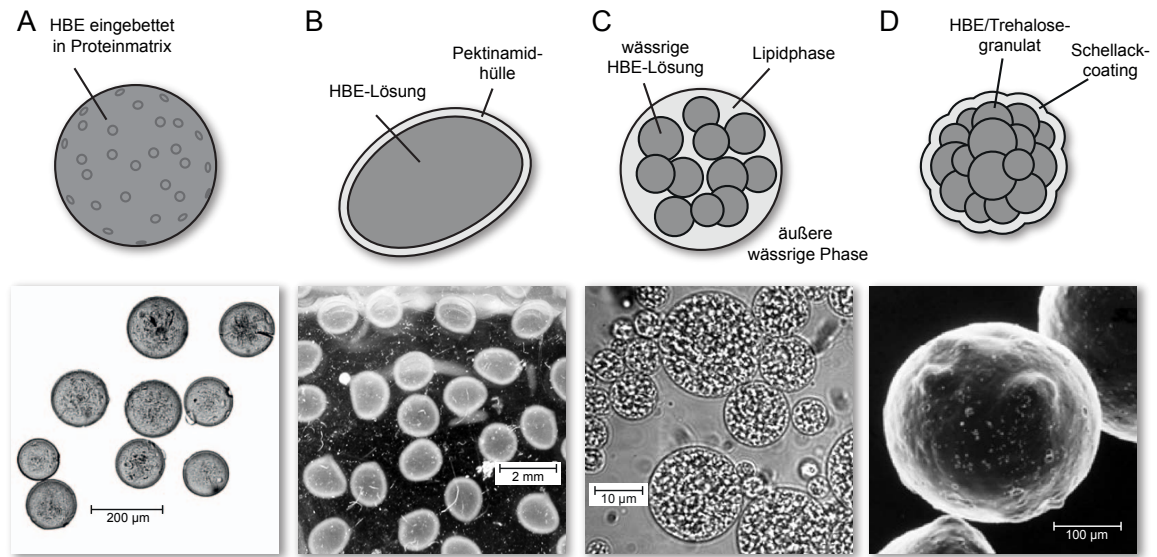


Abbildung 22: Schematische und mikroskopische Darstellung der untersuchten Kapselsysteme. A) molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln (MPK); B) pektinamidbasierte Hohlkapseln (PHK); C) doppel-emulsionsbasierte multidisperse Hüllkapseln (DMH); D) Trehalosebasierte Matrixkapseln mit Citruspektinzusatz (CPK). HBE: Heidelbeerextrakt. Mikroskopieaufnahmen erhalten von den beteiligten Arbeitsgruppen.

2.6.1 Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln (MPK)

Die Gelbildung von Molkenprotein wurde bereits von Liu *et al.* [1994] untersucht und ist auf den hohen Anteil von β -Lactoglobulin zurückzuführen. Diverse Methoden wie die chemisch, ionotropisch oder enzymatisch induzierte Gelbildung sind beschrieben [Lee und Rosenberg, 2000, Chen und Subirade, 2006, Heidebach *et al.*, 2009]. Kapseln, die mit diesen Methoden gewonnen werden, sind jedoch entweder aufgrund der eingesetzten Gelbildner nicht lebensmittelecht oder ungeeignet für die Beladung saurer Medien. Mittels thermisch induzierter Gelbildung lassen sich dagegen Kapseln herstellen, die sowohl verzehrsfähig als auch stabil in saurem Milieu sind [Gunasekaran *et al.*, 2007].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten HBE-beladenen molkenproteinbasierten Hydrogelkapseln (MPK, Abbildung 22A) wurden von der Arbeitsgruppe Kulozik (Technische Universität München (TUM), Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Abteilung für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie) erhalten. Die Herstellung der Kapseln erfolgte nach einer von Betz und Kulozik [2011] optimierten Methode. Dafür wurde HBE- (pH 1,5) mit Molkenproteinlösung vermischt und durch Zentrifugation ($5\,000 \times g$, 2 min) von Feststoffen befreit. Die Kapselbildung erfolgte nach Emulgierung der HBE/Proteinlösung in Pflanzenöl durch thermische Induktion (80 °C, 10 min). Die Abtrennung der Gelpartikel vom überschüssigen Öl erfolgte im Anschluss durch Zentrifugation. Für die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden MPK eingesetzt, die sich in ihrer Zusammensetzung

unterschieden. In Tabelle 11 sind die verwendeten MPK-Systeme aufgelistet. Zusätzlich zu extraktbeladenen Kapselsystemen wurden Referenzkapseln zur Verfügung gestellt, deren Herstellung ohne Zusatz von HBE erfolgte.

Tabelle 11: Eigenschaften und HBE-Beladung der molkenproteinbasierten Hydrogelkapseln, erhalten von der Arbeitsgruppe Kulozik. $x_{50,3}$: mittlerer Durchmesser; PCDL: Phosphatidylcholinabgereichertes Lecitin.

System	$x_{50,3}$	Emulgator	Proteingeh. der Kapseln	HBE-Gehalt Kapseln	Sediment	Verwendung in Abschnitt
MPK1	52 μm	PCDL	20,0 %	5,0 %	3,2 %	EGFR (4.2.1)
MPK2	198 μm	—	20,0 %	10,0 %	6,7 %	EGFR (4.2.1)
MPK3	412 μm	—	13,4 %	9,4 %	3,8 %	EGFR (4.2.1)
MPK4	412 μm	—	14,3 %	10,0 %	6,8 %	Freisetz. (4.1.2) Topois. (4.2.3)

2.6.2 Pektinamidbasierte Hohlkapseln (PHK)

Flüssigkeitsgefüllte Mikrokapseln werden in der pharmazeutischen Industrie unter anderem zur Stabilisierung sensibler Wirkstoffe oder zum Transport von Mikroorganismen verwendet [Chu *et al.*, 2002, Orive *et al.*, 2006, Hu *et al.*, 2008]. Als Hüllmaterial werden häufig Alginat oder Pektinate eingesetzt. Die Polymerisierung der Hüllschicht basiert auf Coulombschen Wechselwirkungen zwischen Pektinmolekülen und Ca^{2+} -Ionen.

Die in dieser Arbeit untersuchten HBE-beladenen pektinamidbasierten Hohlkapseln (PHK, Abbildung 22B) wurden von der Arbeitsgruppe Rehage (Technische Universität Dortmund, Fakultät für Chemie, Lehrstuhl für physikalische Chemie II) zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung erfolgte in einem One-Step-Extrusionsverfahren nach Chai *et al.* [2004]. Dazu wurde wässrige HBE-Lösung (pH 1,5) mit CaCl_2 (3 % (w/v)) versetzt und nach 10 min Rühren abzentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Um mechanische Eigenschaften der Kapseln zu verbessern und die Dichte der Lösung zu erhöhen, wurde die Lösung mit Glycerol (50 % (w/v)) verdünnt. Das Eintropfen der HBE- in Pektinamidlösung (0,5 % (w/v)) erfolgte mit einer Präzisionsdosiernadel. An der Grenzfläche bildet sich durch die Reaktion des Pektinamids mit Ca^{2+} spontan eine Hüllschicht um den flüssigen Kern. Durch Rühren der Pektinamidlösung konnte ein Aggregieren der Kapseln unterbunden werden. Die Kapseldurchmesser betrugen zwischen 1 und 3 mm. Zusätzlich zu den HBE-beladenen PHK wurden extraktfreie Referenzkapseln zur Verfügung gestellt.

2.6.3 Doppelemulsionsbasierte multidisperse Hüllkapseln (DMH)

Unter Emulsionen werden um fein verteilte Gemische von zwei oder mehr Flüssigkeiten, die sich unter normalen Bedingungen nicht vermischen lassen, verstanden. Die disperse Phase ist in der Regel in Form kleiner Tropfen gleichmäßig in der kontinuierlichen Phase verteilt. Typische Emulsionen sind Öl-in-Wasser- (O/W) oder Wasser-in-Öl-Emulsionen

(W/O). Eine Entmischung dieser thermodynamisch instabilen Systeme wird durch Zugabe von Emulgatoren, in der Regel grenzflächenaktive Substanzen, verhindert. Multiple Emulsionen (z. B. W/O/W) werden im Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikbereich eingesetzt, um beispielsweise die kontrollierte Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen zu erreichen. Diese multidispersen Systeme eignen sich darüber hinaus, um instabile Substanzen in Lebensmitteln nach Verzehr über die Magenpassage hinweg zu schützen [Ribeiro *et al.*, 2010, Ax, 2004].

Die in dieser Arbeit untersuchten, doppel-emulsionsbasierten multidispersen Hüllkapseln (DMH, Abbildung 22C) wurden von der Arbeitsgruppe Schuchmann (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik Bereich I: Lebensmittelverfahrenstechnik (LVT)) erhalten. Zur Herstellung der HBE-beladenen Emulsion wurde der Extrakt in angesäuertem Wasser für 30 min gerührt und anschließend abfiltriert. Die Erstellung der inneren Emulsion (W_1/O) erfolgte im Zahnkranzdispersionsverfahren bei 15 000 U/min und 40 °C aus der HBE-Lösung und Pflanzenöl. Diese Emulsion wurde in eine äußere Wasserphase (W_2) mittels Kolloidmühle dispergiert. Die verwendeten Emulgatoren sowie die Zusammensetzung der einzelnen Phasen ist in Tabelle 12 aufgeführt. Zusätzlich zu extraktbeladenen DMH wurde eine Referenzemulsion mit gleichen Eigenschaften, jedoch ohne HBE-Beladung hergestellt [Frank, 2012].

Tabelle 12: Zusammensetzung der doppel-emulsionsbasierten multidispersen Hüllkapseln, erhalten von der Arbeitsgruppe Schuchmann. Abkürzungen: Miglyol 812: gehärtetes, fraktioniertes Palmöl; PGPR: Polyglycerinpolyricinoleat; PPS-Konjugat: Protein/Polysaccharid-Konjugat (Lacprodan 87 + Dextran 500, 1 : 2).

	W₁-Phase	O-Phase	W₂-Phase
Phasenmaterial	5%ige Pektinamid-lösung	Miglyol 812	2,1%ige PPS-Konjugatlösung
Anteil an System	12 %	28 %	60 %
pH-Wert	3,5	neutral	neutral
Zusätze	HBE	PGPR 90+	Pektin
Anteil an Phase	2%	2,30 %	0,80 %
Anteil an System	0,24 %	0,64 %	0,60 %

2.6.4 Citruspektinkapseln (CPK)

Sprühtrocknung stellt ein weiteres Verfahren dar, um bioaktive Substanzen wie Anthocyane in Granulatkapseln zu stabilisieren. Als Trägermaterial für solche Kapseln werden häufig Kohlenhydrate, wie Maltodextrin oder Trehalose, eingesetzt [Cai und Corke, 2000, Ersus und Yurdagel, 2007]. Durch Zusatz von Pektinen kann das Freisetzungsverhalten der Inhaltsstoffe gesteuert werden. Darüber hinaus stabilisieren die zugesetzten Pektine als Kopigmente verkapselte Anthocyane [Hubbermann *et al.*, 2006]. Die Zugabe von hochverestertem Citruspektin retadierte unter verschiedenen Pektinen die Anthocyanfreisetzung aus Maltodextrinkapseln am stärksten [Berg *et al.*, 2012]. Kohlenhydratbasierte Granulatkapseln bieten darüber hinaus

den Vorteil, dass mittels Schellack ein magensaftresistentes *Coating* aufgebracht werden kann.

Trehalosebasierte Matrixkapseln mit Citruspektinzusatz (im Folgenden bezeichnet als Citruspektinkapseln CPK, Abbildung 22D) wurden von der Arbeitsgruppe Schwarz (Christian-Albrechts-Universität Kiel, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abteilung Lebensmitteltechnologie) zur Verfügung gestellt. Die Kapseln waren mit hochverestertem Citruspektin versetzt sowie mit einem Schellackcoating versehen. Die Herstellung der Kapseln erfolgte im Sprühtrocknungsverfahren mit anschließendem Wirbelschichtcoating. Dazu wurde eine wässrige Lösung von 42 % (w/v) Trehalose, 40 % (w/v) HBE, 13 % (w/v) Citronensäure und 5 % (w/v) Citruspektin sprühgetrocknet. Im Wirbelschichtverfahren erfolgte ein Coating der erhaltenen Granulatkapseln mit 10%iger ethanolischer Schellacklösung (25 g Schellack pro 100 g Granulat). Die erhaltenen Kapseln wurden nach einem Trocknungsschritt auf eine Partikelgröße von 250 – 500 µm klassiert [persönliche Mitteilung der Arbeitsgruppe Schwarz].

3 Problemstellung

Tumorerkrankungen stellen in Deutschland nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste, natürliche Todesursache dar [Statistisches Bundesamt, 2011]. Da ein großer Anteil dieser Tumoren durch eine gesunde Lebensweise und Ernährung vermeidbar wären, hat das Interesse an chemopräventiven Nahrungsmittelinhaltsstoffen in den letzten Jahren stark zugenommen [Boghossian und Hawash, 2012]. Die Mikroverkapselung solcher Wirkstoffe bietet eine Möglichkeit, diese im Lebensmittel zu stabilisieren, unerwünschte Eigenschaften zu maskieren und eine gezielte Freisetzung im Gastrointestinaltrakt zu ermöglichen [Gouin, 2004, Champagne und Fustier, 2007]. Der Schwerpunkt dieser Arbeit gilt dem Einfluss von Verkapselungsmethoden auf die Bioaktivität eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts. Mithilfe von verschiedenen, proliferationsassoziierten *in vitro*-Bioassays soll geklärt werden, inwiefern sich die Verkapselung positiv modulierend auf die biologische Aktivität des Extrakts auswirkt, oder ob diese, möglicherweise durch Matrixeffekte des Kapselmaterials, erniedrigt wird. Die Untersuchungen finden im Rahmen von zwei Clusterprojekten^{1,2} in Kooperation mit Arbeitsgruppen der Universitäten Braunschweig, Dortmund, Kaiserslautern, Karlsruhe, Kiel, München und dem Universitätsklinikum Würzburg statt.

In vorausgegangen *in vitro*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte der EGFR-hemmende Effekt von Anthocyanidinen und anthocyanreichen Extrakten aufgezeigt werden [Meiers *et al.*, 2001, Marko *et al.*, 2004, Fridrich *et al.*, 2008b, Teller *et al.*, 2009a,b]. Diese Wirkung wurde darüber hinaus als Ursache für die wachstumshemmenden Eigenschaften dieser Substanzen betrachtet [Marko *et al.*, 2004]. EGFR- und Tumorzellwachstumshemmung im Kolonkarzinommodell soll daher im ersten Teil der vorliegenden Arbeit als *in vitro*-Parameter herangezogen werden, um den Erfolg verschiedener Verkapselungsmethoden zur Formulierung des Heidelbeerextrakts abzuschätzen. Um ein vollständigeres Bild von Verdauungsprozessen auf die Freisetzung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus den jeweiligen Formulierungen zu erhalten, sollen mit Ileostomaausfluss fermentierte Kapselsysteme in die Untersuchungen einbezogen werden. Um die Daten korrekt interpretieren zu können, werden die Untersuchungen schließlich durch die analytische Bestimmung des Freisetungsverhaltens von Anthocyanen aus den Kapselsystemen in das Zellkulturmedium ergänzt.

Im Hinblick auf die Nutzung HBE-beladener Kapselsysteme könnte sich die Hemmung der Aktivität von Topoisomerasen aufgrund hoher lokaler Polyphenolkonzentrationen als

¹DFG-AIF-Clustervorhaben: „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf krebspräventive Signalparameter“

²DFG-AIF-Clustervorhaben: „Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeerextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen“

anwendungslimitierend erweisen. Die Stabilisierung von DNA/Topoisomerasekomplexen durch extraktbeladene Kapselsysteme soll daher im ICE-Bioassay im Zuge einer Risiko-/Nutzenanalyse ergänzend zu den zuvor genannten *in vitro*-Untersuchungen bestimmt werden.

Anthocyane zeigten im zellfreien System keine EGFR-Hemmwirkung [Marko *et al.*, 2004] und Anthocyanidine, die hinsichtlich dieser Eigenschaft ein hohes Potential aufweisen [Meiers *et al.*, 2001, Teller *et al.*, 2009a], liegen in biologisch aktiven Beerenextrakten nicht frei vor. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird daher durch Untersuchungen mit Subfraktionen und ausgewählten Inhaltsstoffen des Heidelbeerextrakts der Frage nachgegangen, welche Komponenten oder Substanzgruppen neben den Anthocyanen für die EGFR- und wachstumshemmende Wirkung des komplexen Extrakts verantwortlich sind.

Im dritten Teil dieser Arbeit soll der Einfluss ausgewählter, extraktbeladener Kapselsysteme auf ausgewählte biologische Endpunkte in einer humanen Interventionsstudie untersucht werden. Da das Studiendesign keine Untersuchung der Modulation der EGFR-Aktivität zulässt, soll der Einfluss der Verkapselung auf den HBE anhand der Transkriptionänderung Nrf2/ARE-regulierter Gene in Blutzellen untersucht werden. Diese Gene bilden einen Teil des zellulären Abwehrsystems gegen oxidativen Stress und sind folglich von chemopräventiver Relevanz. Zur Beantwortung der Frage, welche bioaktive Komponenten des Extrakts mit dem Nrf2/ARE-Signalweg interagieren, werden verschiedene Leitverbindungen und intestinale Anthocyanabbauprodukte parallel zur *in vivo*-Studie in Zellkulturmodellen untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Anthocyanfreisetzung aus Kapselsystemen

Die Kenntnis über das Freisetzungsverhalten von Anthocyanen aus Kapselsystemen im Zellkulturmedium während der Substanzinkubation ist Voraussetzung für die korrekte Interpretation von Daten nachfolgender Bioaktivitätsstudien. Als erster Parameter wurde daher die Freisetzung der Anthocyane aus HBE-beladenen Kapselsystemen in das Zellkulturmedium mittels HPLC-DAD-Analyse ermittelt. In diese Untersuchungen wurden die beiden Kapselsysteme MPK und PHK (Abschnitte 2.6.1 bzw. 2.6.2) miteinbezogen. Zum Vergleich wurde die Abnahme von Anthocyanen aus unverkapseltem HBE unter analogen Bedingungen ermittelt, da während der Inkubation der Kapselsysteme in pH-neutralem Zellkulturmedium parallel zur Freisetzung ein Abbau der Anthocyane zu erwarten war. Der unverkapselte Extrakt sowie die beiden Kapselsysteme wurden für diese Untersuchung in pH-neutralem DMEM in Anwesenheit von HT29-Zellen (Kolonadenokarzinomzellen) inkubiert. Die Kapselsysteme wurde darüber hinaus zellfrei in saurem Medium (pH 2) untersucht, um die Anthocyanfreisetzung ohne gleichzeitigen Abbau zu betrachten.

Die HPLC-Methode wurde von der Arbeitsgruppe Winterhalter (Technische Universität Braunschweig, Institut für Lebensmittelchemie) übernommen, die Zuordnung einzelner Anthocyane zu den entsprechenden Peaks im HPLC-Chromatogramm musste daher nicht evaluiert werden.

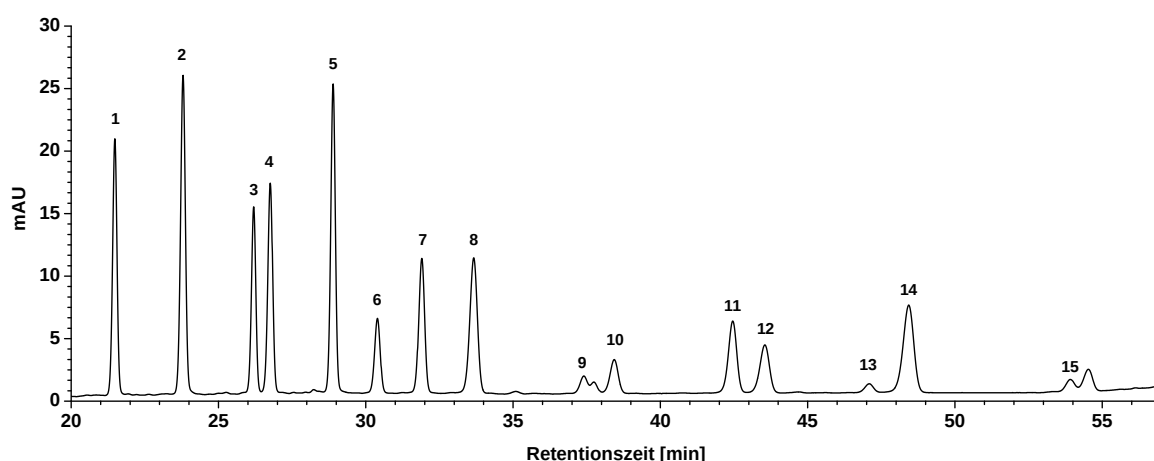


Abbildung 23: Repräsentatives HPLC-DAD-Chromatogramm von Anthocyanen aus HBE (200 µg/ml) gelöst in Zellkulturmedium (DMEM, pH 2) bei $\lambda = 520$ nm. Peaks: 1: Del-3-gal; 2: Del-3-glc; 3: Cy-3-gal; 4: Del-3-arab; 5: Cy-3-glc; 6: Pt-3-gal; 7: Cy-3-arab; 8: Pt-3-glc; 9: Peo-3-gal; 10: Pt-3-arab; 11: Peo-3-glc; 12: Mv-3-gal; 13: Peo-3-arab; 14: Mv-3-glc; 15: Mv-3-arab.

Abbildung 23 zeigt ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Anthocyane aus HBE in Zellkulturmedium, aufgenommen bei $\lambda = 520$ nm. 15 Anthocyane, gebildet aus den fünf Anthocyanidinen Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin sowie den drei Zuckerresten Glucose, Galactose und Arabinose konnten im Chromatogramm identifiziert werden. Die Reihenfolge korrelierte mit der Substitution des Anthocyan-B-Rings: Während Hydroxygruppen die Retentionszeit erniedrigen, wird diese durch Methoxygruppen erhöht (Tabellen 4 und 13). Weiterhin wiesen Anthocyanidingalactoside eine kürzere Retentionszeit auf, als Anthocyanidine, die mit Glucose bzw. Arabinose verestert waren. Die Anthocyane wurden als Cy-3-glc-Äquivalente quantifiziert. In Tabelle 13 ist die Anthocyanzusammensetzung des HBE in Bezug auf den Extrakt bzw. Gesamtanthocyangehalt angegeben.

Tabelle 13: Anthocyanzusammensetzung des HBE bestimmt mittels HPLC-DAD bei $\lambda = 520$ nm als Cy-3-glc-Äquivalente. Anteile angegeben in Bezug auf den HBE und die Anthocyanesamtmenge. MW $\pm$ SD aus drei unabhängigen Versuchen ($c = 200$ μ g/ml). Die Berechnung der analytischen Grenzwerte erfolgte nach DIN 32645 (Formeln 6.8–6.10). Abkürzungen: HBE: Heidelbeerextrakt; t_R : Retentionszeit n.q.: nicht quantifiziert da $< LOQ$.

Anthocyan	t_R [min]	Anteil [% (w/w)]	
		HBE	Ges.-Anth.
Cy-3-glc	28,9	$3,86 \pm 0,23$	$13,0 \pm 0,78$
Cy-3-gal	26,2	$2,19 \pm 0,14$	$7,38 \pm 0,46$
Cy-3-arab	31,9	$2,11 \pm 0,13$	$7,12 \pm 0,44$
Del-3-glc	23,8	$4,33 \pm 0,27$	$14,6 \pm 0,90$
Del-3-gal	21,5	$3,10 \pm 0,19$	$10,4 \pm 0,64$
Del-3-arab	26,8	$2,68 \pm 0,17$	$9,03 \pm 0,56$
Pt-3-glc	33,7	$2,90 \pm 0,18$	$9,77 \pm 0,62$
Pt-3-gal	30,4	$1,10 \pm 0,07$	$3,71 \pm 0,25$
Pt-3-arab	38,5	$0,68 \pm 0,04$	$2,29 \pm 0,14$
Mv-3-glc	48,4	$2,49 \pm 0,16$	$8,39 \pm 0,53$
Mv-3-gal	43,6	$1,16 \pm 0,08$	$3,90 \pm 0,26$
Mv-3-arab	54,0	$0,47 \pm 0,07$	$1,57 \pm 0,24$
Peo-3-glc	42,5	$1,64 \pm 0,10$	$5,51 \pm 0,32$
Peo-3-gal	37,4	$0,99 \pm 0,16$	$3,32 \pm 0,54$
Peo-3-arab	47,1	n. q.	n. q.

Die Peakfläche von Peo-3-arab lag unterhalb der Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LOQ) und wurde daher nicht zur Anthocyanquantifizierung herangezogen. Den mengenmäßig größten Anteil der Anthocyane bilden Delphinidinglycoside (34,1 % (w/w)), gefolgt von Cyanidin- (27,5 % (w/w)), Petunidin- (15,5 % (w/w)), Malvidin- (13,2 % (w/w)) und Peonidinglycosiden (9,8 % (w/w)). Die mit Abstand am stärksten vertretenen Anthocyane waren Del-3-glc (14,6 % (w/w)) und Cy-3-glc (13,0 % (w/w)). Der Anthocyananteil des Extrakts betrug 29,7 % (w/w). Dieser Wert wich leicht von dem der Arbeitsgruppe Winterhalter ermittelten Wert ab (27,6 % (w/w), Tabelle 16). Diese Abweichung ist eventuell auf Unterschiede in der Anthocyanquantifizierung zurückzuführen. Während die Anthocyane in der vorliegenden Arbeit als Cy-3-glc-Äquivalente bestimmt wurden, erfolgte die Quantifizierung der Arbeitsgruppe Winterhalter in Bezug auf unterschiedliche Anthocyanstandards.

4.1.1 Unverkapselter HBE

Die Konzentration und Stabilität der einzelnen Anthocyane aus unverkapseltem HBE (200 µg/ml) wurden zunächst in angesäuertem DMEM (pH 2) im zellfreien System ermittelt (Abbildung 24A). Dazu wurden nach definierten Inkubationszeiten Aliquote entnommen, mit dem internen Standard Delphinidin-3,5-di-*O*-β-D-glucopyranosid (Del-3,5-diglc) versetzt und die Anthocyane anschließend mittels HPLC-DAD bei $\lambda = 520$ nm als Cy-3-glc-Äquivalente quantifiziert.

Alle Anthocyane, mit Ausnahme von Peo-3-gal, verhielten sich über den Inkubationszeitraum (120 min) hinweg stabil. Die Konzentration der Anthocyane erhöhte sich innerhalb der ersten 15 min geringfügig, was auf einen nicht vollständig abgeschlossenen Lösevorgang zu Beginn der Inkubation hindeuten könnte. Die Konzentration von Peo-3-gal wurde innerhalb von 60 min auf ~50 % des ursprünglichen Werts verringert. Während der folgenden Stunde blieb die Konzentration dieses Anthocyan jedoch stabil.

Das Abbauverhalten von Anthocyanen aus unverkapseltem HBE wurde in neutralem Medium (pH 7,8) in Anwesenheit von HT29-Zellen (~80 % Konfluenz) untersucht. Der Versuch wurde in Petrischalen bei 37 °C in Anwesenheit von Katalase ohne Bewegung durchgeführt, um die Bedingungen der anschließenden Bioaktivitätsuntersuchungen widerspiegeln. In bestimmten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen, angesäuert und wie zuvor nach Zugabe des internen Standards mittels HPLC-DAD analysiert.

Die Anthocyane erwiesen sich unter diesen Bedingungen deutlich instabiler als im angesäuerten Medium. Bereits nach 5 min begann die Konzentration der Anthocyane abzunehmen und verringerte sich, in Abhängigkeit des entsprechenden Anthocyan, im Laufe der Inkubationszeit deutlich (Abbildung 24B). Nach 2 h Inkubation wurde beispielsweise Cy-3-glc auf ~62 % der Anfangskonzentration erniedrigt. Anthocyane auf Basis von Cyanidin und Malvidin zeigten sich unter den gewählten Bedingungen insgesamt am stabilsten, gefolgt von Petunidin und Peonidin. Am instabilsten erwiesen sich Delphinidinglycoside, die bereits nach 45 min nicht mehr erfasst werden konnten. Weiterhin zeigte sich Peo-3-gal wie schon unter sauren Bedingungen als besonders instabil. Bereits nach 5 min wurde dieses Anthocyan auf ~60 % der Ausgangskonzentration verringert. Die Stabilität der Anthocyane lässt sich somit in folgender Reihenfolge angeben: Cy-3-glyc $\approx$ Mv-3-glyc > Pt-3-glyc > Peo-3-glyc $\gg$ Del-3-glyc.

Ein ähnliches Abbauverhalten wurde von Kern *et al.* [2007] für Anthocyanidine in Zellkulturmedium (DMEM) beschrieben. Sie zeigten, dass Delphinidin das mit Abstand instabilste Anthocyanidin darstellt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit war Cyanidin in den Ergebnissen der Autoren geringfügig instabiler als Peonidin und Malvidin. In einer Untersuchung zum Abbau von Anthocyanen in sterilisiertem Darminhalt aus Schweinecaeca¹ von Keppler und Humpf [2005] zeigten die Autoren eine deutlich höhere Stabilität für Anthocyane. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Konzentrationen der untersuchten Anthocyane Cy-3-glc und Mv-3-glc auf lediglich 75 bzw. 85 % verringert. Das Inkubationsmedium dieser Studie war mit pH 6,4 jedoch saurer als das Zellkulturmedium in den Untersuchungen

¹Caecum: Blinddarm

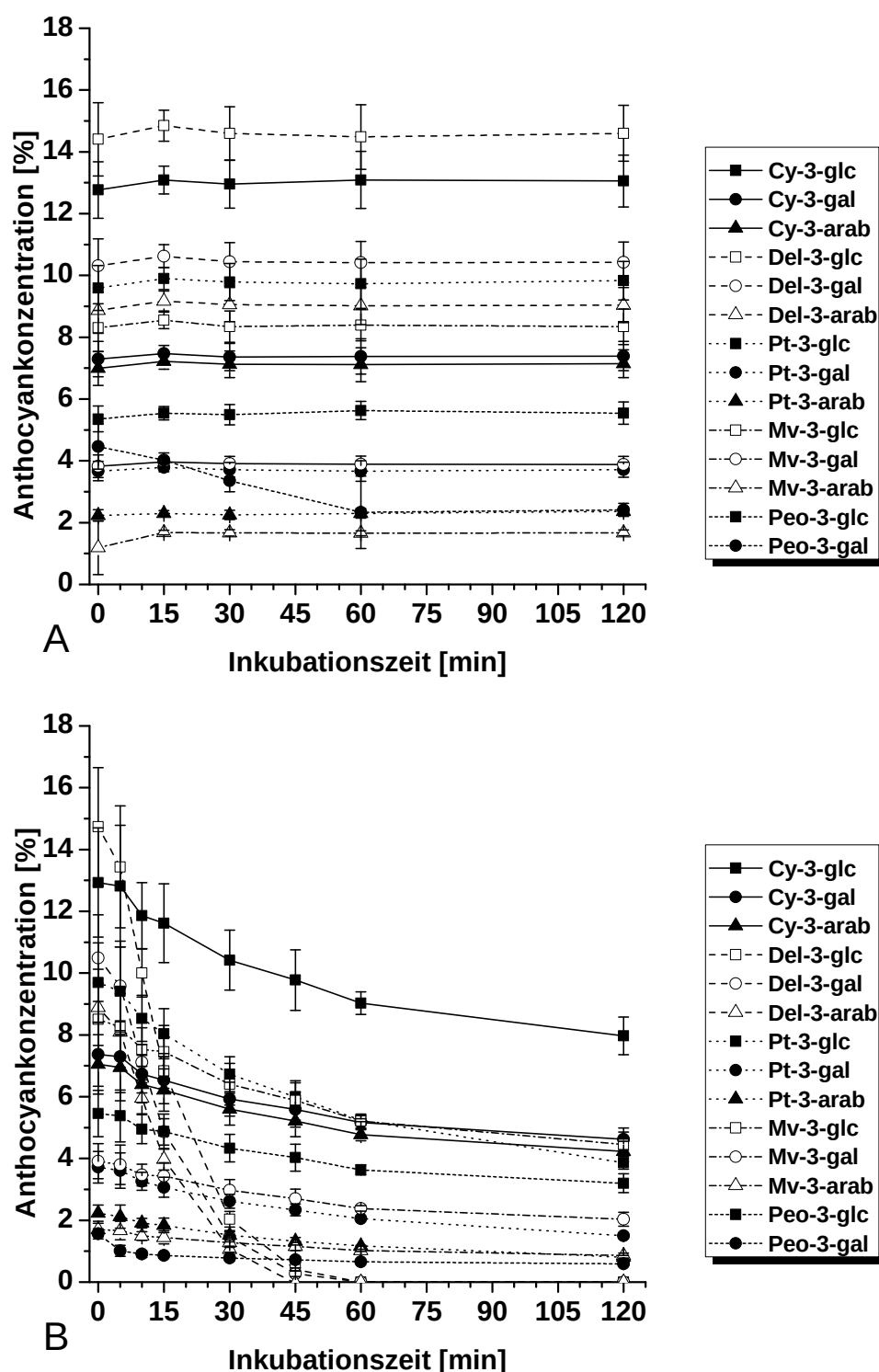


Abbildung 24: Stabilität von Anthocyanen aus HBE in A) angesäuertem (pH 2) und B) neutralem (pH 7,8) Zellkulturmedium. HBE wurde in DMSO gelöst und in Zellkulturmedium verdünnt (1 % DMSO). Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote des Mediums entnommen und im Fall von B) angesäuert. Die Konzentrationen der einzelnen Anthocyane wurden mittels HPLC-DAD als Cy-3-glc-Äquivalente mit Del-3,5-diglc als internen Standard quantifiziert ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $n = 3$). Dargestellt sind die Ergebnisse prozentual zur Anthocyangesamtmenge in saurem Medium (pH 2). Die Berechnung der analytischen Grenzwerte erfolgte nach DIN 32645 (Formeln 6.8–6.10).

der vorliegenden Arbeit (pH 7,8). Da sich Anthocyane mit steigendem pH-Wert instabiler verhalten [Keppler und Humpf, 2005], könnte der niedrigere pH-Wert die höhere Stabilität der Anthocyane in der genannten Studie erklären. Anthocyanabbauprodukte wurden in dieser Untersuchung nicht betrachtet. Daher kann nicht gesagt werden, ob die beobachtete Verringerung der Anthocyankonzentration lediglich auf den Abbau zu Phenolcarbonsäuren und Phloroglucinolaldehyd [Fleschhut *et al.*, 2006] zurückzuführen ist. Andere Mechanismen, wie die Anthocyanpolymerisierung bzw. Reaktion mit weiteren Bestandteilen des Zellkulturmediums könnten ebenfalls zu einer Verringerung der Anthocyanmonomere beitragen [Brownmiller *et al.*, 2008]. Analoge Untersuchungen im zellfreien System ergaben die selbe Abbaukinetik wie in Anwesenheit der Zellen (Eigene Untersuchungen, Daten nicht gezeigt). Der Abbau war somit nicht auf zellulären Metabolismus zurückzuführen.

4.1.2 Extraktbeladene MPK

Der HBE-Anteil extraktbeladener MPK4 (Tabelle 11) wurde zunächst über den Anthocyangehalt nach 2 h Freisetzung in angesäuertem PBS (pH 2) mittels HPLC-DAD-Analyse bestimmt. Der Anthocyananteil der Kapseln betrug 2,0 % (w/w), woraus sich rechnerisch ein HBE-Gehalt von 6,8 % (w/w) ermitteln ließ (Anthocyananteil des HBE: 29,7 % (w/w)).

Für die Freisetzungsversuche wurden 2,9 mg/ml Kapseln ($\cong$ 200 μ g/ml HBE) in angesäuertem DMEM suspendiert. Wie zuvor wurden nach bestimmten Zeitpunkten Aliquote entnommen und analysiert. Aufgrund der Stabilisierung im sauren Milieu wurde in diesem Versuch die Freisetzung ohne gleichzeitigen Abbau der Anthocyane betrachtet. Bereits nach 5 min waren alle Anthocyane freigesetzt (Abbildung 25A). Während der anschließenden Inkubationszeit blieb die Anthocyankonzentration wie erwartet stabil. Die schnelle Freisetzung ist vermutlich auf die vergleichsweise kleine Partikelgröße und die damit verbundene vergrößerte Oberfläche zurückzuführen. Da die Partikel nicht beschichtet waren, erfolgte die Anthocyanfreisetzung ausschließlich aufgrund diffusiver Prozesse.

Durch die Suspension derselben Menge an Kapseln in neutralem Zellkulturmedium resultierte eine Überlagerung aus Anthocyanfreisetzung und -abbau (Abbildung 25B). Im Kurvenverlauf zeigt sich diese Überlagerung in einer anfänglichen Erhöhung der Anthocyankonzentrationen gefolgt von einer Konzentrationserniedrigung. Wie bereits beim unverkapselten HBE beobachtet, wurden auch in diesem Ansatz die Delphinidinglycoside mit Abstand am schnellsten abgebaut. Diese waren nach 60 min nicht mehr detektierbar. Ebenfalls schnellere Abbauraten als die restlichen Anthocyane zeigten Petunidinglycoside.

4.1.3 Extraktbeladene PHK

Wie bei den MPK wurde zunächst der Extraktanteil der PHK über den Anthocyangehalt mittels HPLC-DAD-Analyse bestimmt. Dieser betrug für die PHK 0,96 % (w/w). Kapseln entsprechend 200 μ g/ml HBE wurden in angesäuertes DMEM eingebracht und die Freisetzungsrate der Anthocyane wie zuvor für die MPK bestimmt. Es zeigte sich bei diesen Kapseln ein deutlich langsames Freisetzungsverhalten der Anthocyane (Abbildung 26A), was auf den

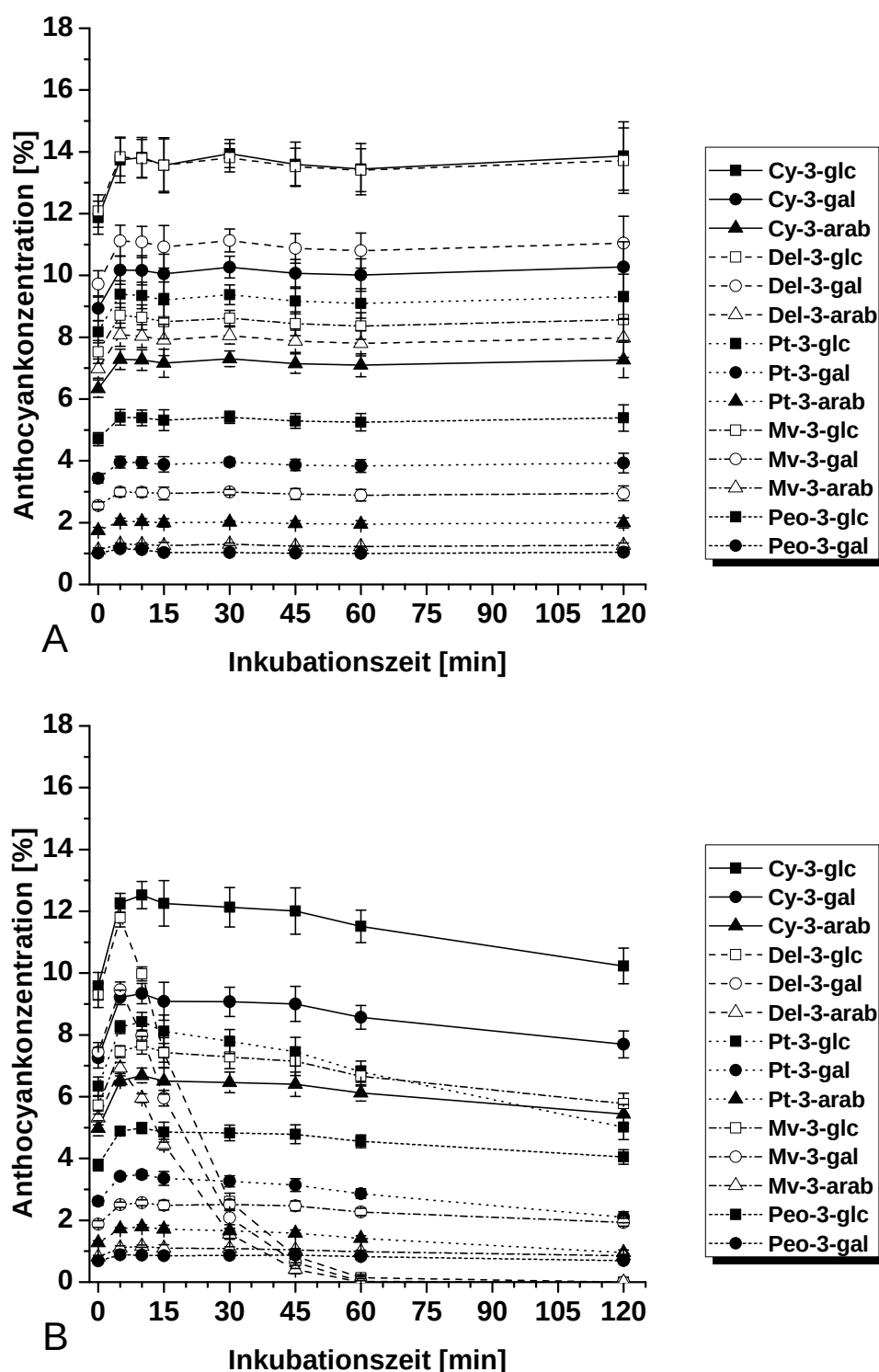


Abbildung 25: Freisetzung von Anthocyanen aus HBE-beladenen MPK4 in A) angesäuertem (pH 2) und B) neutralem (pH 7,8) Zellkulturmedium. 2,9 mg/ml Kapseln wurden Zellkulturmedium suspendiert ($\cong 200 \mu\text{g/ml}$ HBE). Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote des Mediums entnommen und im Fall von B) angesäuert. Die Konzentrationen der einzelnen Anthocyane wurden mittels HPLC-DAD als Cy-3-glc-Äquivalente mit Del-3,5-diglc als internen Standard quantifiziert ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $n = 3$). Dargestellt sind die Ergebnisse prozentual zur Anthocyanesamtmenge in saurem Medium (pH 2). Die Berechnung der analytischen Grenzwerte erfolgte nach DIN 32645 (Formeln 6.8–6.10).

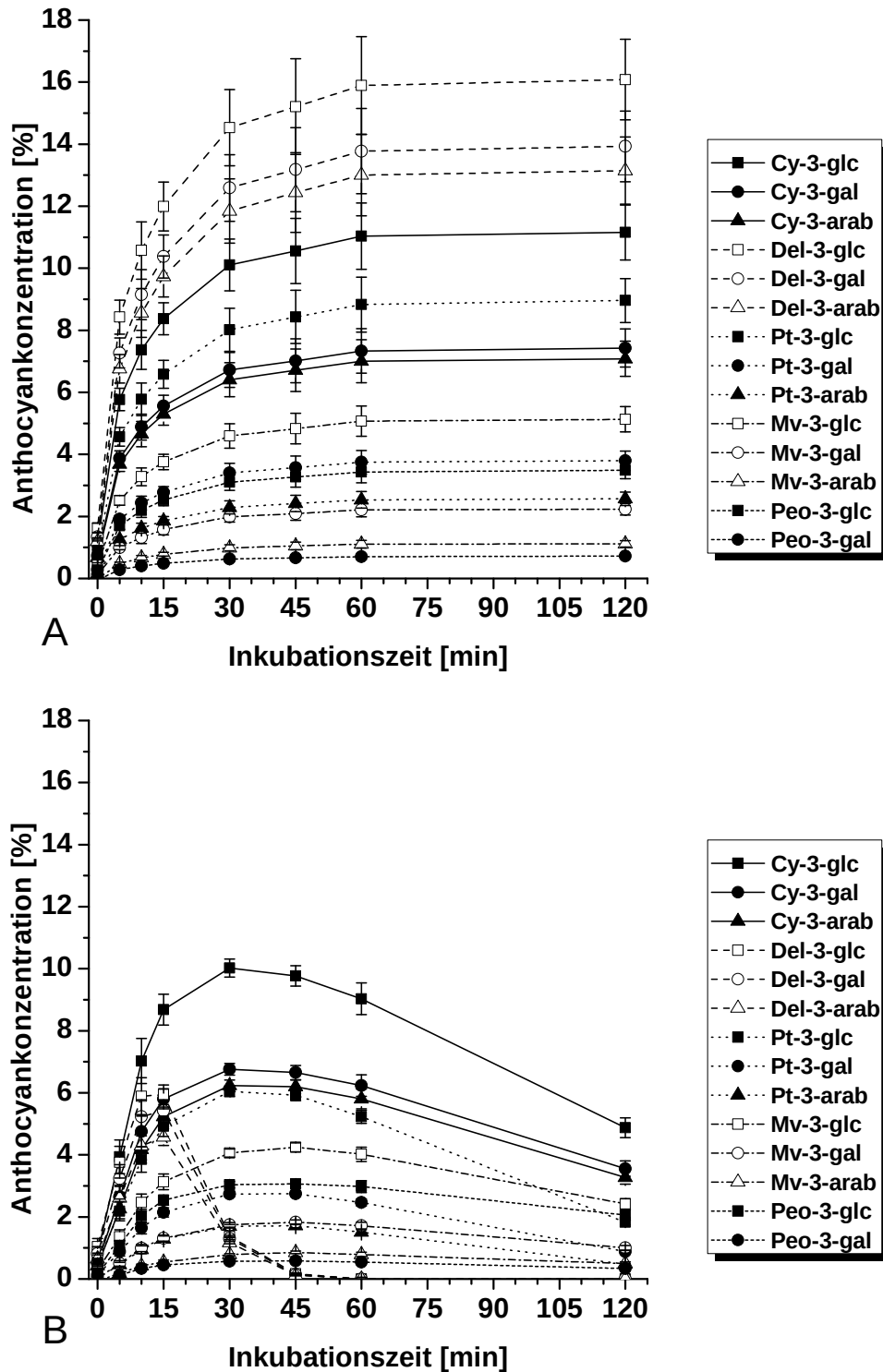


Abbildung 26: Freisetzung von Anthocyanen aus HBE-beladenen PHK in A) angesäuertem (pH 2) und B) neutralem (pH 7,8) Zellkulturmedium. 20 mg/ml Kapseln wurden Zellkulturmedium suspendiert ($\cong 200 \mu\text{g/ml}$ HBE). Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote des Mediums entnommen und im Fall von B) angesäuert. Die Konzentrationen der einzelnen Anthocyane wurden mittels HPLC-DAD als Cy-3-glc-Äquivalente mit Del-3,5-diglc als internen Standard quantifiziert ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $n = 3$). Dargestellt sind die Ergebnisse prozentual zur Anthocyangesamtmenge in saurem Medium (pH 2). Die Berechnung der analytischen Grenzwerte erfolgte nach DIN 32645 (Formeln 6.8–6.10).

größeren Partikeldurchmesser zurückgeführt werden konnte. Die vollständige Freisetzung der Anthocyane aus diesen Partikeln benötigte ~ 1 h. Im Gegensatz zur Freisetzung aus MPK war die Anthocyankonzentration zu Beginn der Messung sehr niedrig. Aufgrund einer fehlenden Diffusionsbarriere und des ruhenden Inkubationsmediums ist auch hier die Freisetzung der Anthocyane auf rein diffusive Prozesse zurückzuführen.

Die Suspension der extraktbeladenen PHK in neutralem Zellkulturmedium führte zu einer deutlich stärkeren Überlagerung von Anthocyanfreisetzung und -abbau (Abbildung 26B). Wie zuvor zeigten sich auch hier die Delphinidin- und Petuninglycoside instabiler gegenüber den restlichen Anthocyanen.

4.1.4 Vergleich der Kapselsysteme

Die Anthocyankonzentrationen innerhalb der Versuche wurden aufsummiert, um die Freisetzungs- und Abbauraten aus den verschiedenen Kapselsystemen miteinander vergleichen zu können (Abbildungen 27A und B). Die Summe der Anthocyane aus HBE war im Säuren stabil. Der Abbau des im Säuren instabilen Anthocyans Peo-3-gal beeinflusste aufgrund seiner niedrigen Konzentration den Anthocyanesamtgehalt nicht (Abbildung 27A). Die erwähnte schnelle initiale Freisetzung der Anthocyane aus MPK spiegelte sich ebenfalls in deren Summe wieder. Bereits nach 5 min war die Anthocyanfreisetzung abgeschlossen. Zu beachten ist, dass bereits zu Beginn der Messung (Inkubationszeit = 0 min) erhebliche Mengen der Anthocyane ($\sim 86\%$) frei im Zellkulturmedium vorlagen. Dies bedeutet, dass entweder in der kurzen Zeit bis zum Entnehmen des ersten Medialiquots ($t < 1$ min) ein großer Anteil der Anthocyane freigesetzt wurde oder dass dieser Teil auf der Oberfläche der Kapseln vorlag. Die Freisetzung der Anthocyane aus PHK war dagegen deutlich langsamer. Im Gegensatz zur Anthocyanfreisetzung aus MPK begann die Messung mit einer Anfangskonzentration von lediglich $\sim 9\%$.

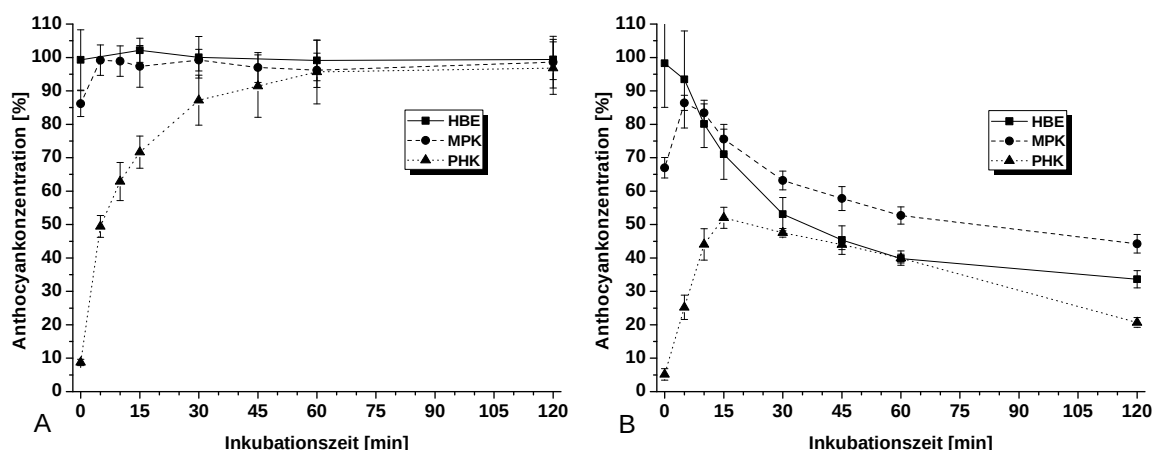


Abbildung 27: Freisetzungs- und Abbauverhalten der Gesamtanthocyane in HBE und HBE-beladenen Kapselsystemen in A) angesäuertem (pH 2) und B) neutralem (pH 7,8) Zellkulturmedium. Vgl. Abbildungen 24 – 26.

Unter neutralen Bedingungen konnte eine rasche Abnahme der Anthocyangehalte beobachtet

werden (Abbildung 27B). Die Anthocyane aus unverkapseltem HBE wurden innerhalb von 2 h auf $\sim 34\%$ verringert. Der initiale starke Abfall der Anthocyankonzentration ist auf den hohen Anteil der instabilen Delphinidinglycoside zurückzuführen.

Schantz [2011] untersuchte die Stabilität des HBE in serumfreiem DMEM (pH 7,4). Unter diesen Bedingungen stellten sich die Anthocyane stabiler im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit genutzten Bedingungen (pH 7,8) heraus: Während in der vorliegenden Untersuchung der Anthocyananteil um $\sim 60\%$ verringert wurde, konnte Schantz im selben Zeitraum lediglich eine Abnahme um $\sim 15\%$ feststellen. Da die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien identisch war, kann der beobachtete Unterschied nur auf die von einander abweichenden pH-Werte der Medien (pH 7,4 $\Leftrightarrow$ pH 7,8) zurückgeführt werden.

Die aus MPK freigesetzte Anthocyanmenge war zu Beginn der Messung ($c_{\max} = 106 \mu\text{M}$) niedriger als die Menge aus unverkapseltem HBE ($c_{\max} = 120 \mu\text{M}$). Im Verlauf der Inkubation wurden die Anthocyane des freien Extrakts jedoch schneller abgebaut. Im Gegensatz dazu war die Anthocyankonzentration resultierend aus der Inkubation mit PHK im Vergleich zur Referenz durchgehend niedriger ($c_{\max} = 64 \mu\text{M}$).

Weiterhin wurden die Freisetzungskurven der Versuche in neutralem Medium (Abbildung 27B) integriert, um die Funktionen quantitativ miteinander vergleichen zu können (Tabelle 14). Die resultierenden Flächen (*Area Under the Curve*, AUC) spiegeln die tatsächlichen Konzentrationen wider, der die Zellen über die Inkubationszeit hinweg ausgesetzt waren. Ausgehend von einer AUC von 100 % für die Anthocyane aus unverkapseltem HBE war die entsprechende Fläche für die Matrixkapseln auf $119 \pm 10\%$ signifikant ($p = 0,018$) erhöht. Die Proteinkapseln scheinen somit eine stabilisierende Wirkung auf die Anthocyane auszuüben. Die AUC resultierend aus der Inkubation mit PHK war dagegen mit $75 \pm 3\%$ signifikant ($p = 0,007$) niedriger. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre die Überlagerung des raschen Anthocyanabbaus mit der langsamen Freisetzung der Anthocyane aus diesem Kapselsystem, sodass zu keinem Zeitpunkt bedeutende Anthocyankonzentrationen auftreten können.

Tabelle 14: Freisetzungskurvenparameter der Anthocyane aus unverkapseltem HBE und Extrakt in MPK bzw. PHK berechnet als Cy-3-glc-Äquivalente. a) $c_{\max}$ wurden normiert in Bezug auf unverkapselten Extrakt in angesäuertem Zellkulturmedium. b) AUC wurden normiert auf die Fläche von unverkapseltem HBE in neutralem Medium. Abkürzungen: HBE: Heidelbeerextrakt; MPK: Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln; PHK: Pektinamidbasierte Hohlkapseln; $c_{\max}$: Maximalkonzentration; AUC: Fläche unter der Kurve.

System	$c_{\max}$		AUC	
	$[\mu\text{M}]$	$[\%]^{\text{a)}}$	$[\text{mM} \times \text{min}]$	$[\%]^{\text{b)}}$
HBE	$120,3 \pm 16,0$	$98,2 \pm 13,1$	$7,10 \pm 0,53$	100 ± 0
MPK	$105,8 \pm 2,8$	$86,4 \pm 2,3$	$8,43 \pm 0,27$	$119,2 \pm 10,2$
PHK	$63,6 \pm 3,9$	$52,0 \pm 3,2$	$5,35 \pm 0,29$	$75,4 \pm 3,1$

Schantz [2011] untersuchte die Anthocyanfreisetzung aus analogen Kapselsystemen in simuliertem Magensaft (pH 1,2). Dabei wurden prinzipiell dieselben Tendenzen beobachtet:

Während die Freisetzung aus MPK am schnellsten erfolgte, und bereits zu Beginn der Messung große Anteile der Anthocyane freigesetzt wurden, war die Freisetzung aus PHK langsamer und begann bei einem vergleichsweise niedrigen Wert. Die zeitlichen Verläufe dieser beiden Studien weichen dennoch voneinander ab. Dies kann auf folgende Ursachen zurückgeführt werden:

- Schantz wählte zu Beginn der Freisetzung aus den Kapseln eine niedrigere zeitliche Auflösung. So wurde der schnelle, initiale Verlauf der Anthocyanfreisetzung aus MPK eventuell nicht vollständig abgebildet.
- In den Untersuchungen von Schantz sollte die gastrische Freisetzung der Anthocyane nachgestellt werden. Dazu wurden peristaltische Bewegungen des Magens in einer End-Over-End-Apparatur¹ nachgestellt. Um die *in vitro*-Situation der Kapselinkubation zu simulieren, fanden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit jedoch ohne Bewegung der Kapseln statt.
- Die Freisetzung wurde im sauren Milieu gemessen, sodass Überlagerungen mit dem Anthocyanabbau ausgeschlossen werden konnten.

Zusammenfassend unterliegt die Anthocyankonzentration im pH-neutralen Zellkulturmedium während der Inkubation mit HBE oder extraktbeladenen Kapselsystemen einer substanziellen Verringerung. Ob die Verringerung auf Abbau oder andere Mechanismen zurückzuführen ist, wurde nicht geklärt. Eine Metabolisierung der Anthocyane durch die HT29-Zellen trug im untersuchten Zeitraum nicht wesentlich zu deren Abbau bei (Daten wurden nicht gezeigt). Abhängig vom Verkapselungssystem wird die Anthocyanosis (AUC), der Zellen über den Inkubationszeitraum von 2 h ausgesetzt sind, gegenüber dem freien HBE erhöht (MPK) bzw. verringert (PHK).

¹End-Over-End-Apparaturen ermöglichen in der pharmazeutischen Entwicklung die Simulation der Magen- und Dünndarmpassage. Die Freisetzungsmedien werden dabei durch permanente Rotation um eine horizontale Achse (10 rpm) bei konstanter Temperatur (37 °C) bewegt.

4.2 Modulation der HBE-Bioaktivität durch Verkapselung *in vitro*

Die Modulation der Bioaktivität des HBE nach Formulierung in unterschiedliche Kapselsysteme wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Richling anhand verschiedener biologischer Endpunkte verfolgt. Während [Schantz, 2011] (Arbeitsgruppe Richling) die Modulation antioxidativer Parameter nach Verkapselung überprüfte, wurde in der vorliegenden Arbeit die Veränderung chemoprotektiver Merkmale des HBE *in vivo* untersucht. Dabei sollte abgewägt werden, ob sich die Formulierung verstärkend auf die Bioaktivität des HBE auswirkt oder möglicherweise vermindernd, infolge prozessbedingter Faktoren oder durch den Einfluss des Kapselmaterials.

In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der Formulierung auf die Bioaktivität des HBE anhand verschiedener biologischer Endpunkte im Kolonkarzinommodell (HT29) untersucht. Die Beeinflussung 1.) der Autophosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), als Maß für dessen Aktivität, 2.) der Wachstumshemmung von Tumorzellen und 3.) der Aktivität von Topoisomerasen, sollten als Messgrößen herangezogen werden um die Modulation der Bioaktivität des HBE *in vitro* zu beurteilen. Der Einfluss von anthocyanreichen Extrakten auf diese Parameter konnte bereits in vorausgegangenen Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden. Da der humane GIT einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität einzelner HBE-Bestandteile und den Aufschluss unterschiedlicher Hüllmaterialien besitzen kann, wurden ferner die verschiedenen Kapseltypen nach *ex vivo*-Fermentation mit Ileostomaausfluss in die Untersuchungen miteinbezogen.

4.2.1 Beeinflussung der EGFR-Aktivität

Die Beeinflussung der Aktivität des EGFR in HT29-Zellen wurde als Parameter für die Beurteilung der Modulation des chemoprotektiven Potentials des HBE nach dessen Verkapselung herangezogen. Als Maß für die Rezeptoraktivität wurde für diese Untersuchung die Phosphorylierung des EGFR an Tyr₁₁₇₃ betrachtet. Der Phosphorylierungsstatus wurde durch Western Blot Analyse mit anschließender, spezifischer Immunodetektion ermittelt.

Um den Einfluss der Verkapselung des HBE einordnen zu können, wurde zunächst die biologische Aktivität des unverkapselten Extrakts hinsichtlich seiner hemmenden Wirkung auf die EGFR-Aktivität untersucht. Die Untersuchungen in HT29-Zellen über 45 min, nach einer modifizierten Methode von Kern *et al.* [2005], sollten einen Kurzzeiteffekt des HBE widerspiegeln. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde die Bioaktivität des HBE aus den extraktbeladenen Kapselsysteme MPK, PHK und DMH in vergleichbarer Weise bestimmt. Darüber hinaus wurde ermittelt, inwiefern der mechanische Aufschluss der Kapseln bzw. ob das Kapselmateriale selber einen Einfluss auf die biologische Aktivität des HBE ausübt. Schließlich wurde die Möglichkeit eines *ex vivo*-Verdaus mit Ileostomaausfluss zum enzymatischen Aufschluss der Kapseln evaluiert.

Unverkapselter HBE

In einer ersten Versuchsreihe sollte der Einfluss des unverkapselten HBE auf die Aktivität des EGFR in HT29-Zellen untersucht werden. Aufgrund der bekannten H₂O₂-Entwicklung von Polyphenolen mit Bestandteilen des Zellkulturmediums wurden die Untersuchungen in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase durchgeführt [Halliwell *et al.*, 2000, Lapidot *et al.*, 2002]. Die Substanzinkubation erfolgte serumfrei für 45 min.

Die Phosphorylierung des EGFR wurde bereits ab einer Konzentration von 10 µg/ml HBE signifikant unterdrückt (Abbildung 28A). Durch Erhöhung der Extraktkonzentration erfolgte eine Verringerung der Rezeptoraktivität, die bei 200 µg/ml HBE ihr Maximum erreichte (Unterdrückung auf 45 ± 14 % (T/C)). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die HBE-Behandlung nicht beeinflusst. HBE mit einer Konzentration von 200 µg/ml wurde in vielen der folgenden Untersuchungen neben Tyrphostin AG 1478 als Positivkontrolle mitgeführt. Die gemessene Rezeptoraktivität für diese Konzentration wurde daher aus 64 Werten gemittelt und bei allen Versuchen dargestellt, bei denen HBE als Referenz mitgeführt wurde.

Die Inkubationszeit von 45 min wurde in Analogie zu vorausgegangenen Untersuchungen hinsichtlich der EGFR-Aktivität gewählt [Meiers *et al.*, 2001, Marko *et al.*, 2004, Teller *et al.*, 2009b]. Da die Freisetzung der HBE-Bestandteile aus den Kapseln zeitverzögert erfolgte (Abschnitt 4.1.3), wurde die EGFR-hemmende Wirkung des HBE als Referenz für weitere Inkubationszeiten (1, 2 und 3 h) gemessen. In diesen Versuchen wurde die Rezeptoraktivität, wie zuvor, lediglich in den terminalen 15 min mit EGF induziert. Die weiteren Parameter wurden aus dem vorausgegangenen Versuch übernommen.

Nach 1 h Inkubation wurde die Rezeptoraktivität signifikant auf 60 ± 12 % (T/C) unterdrückt (Abbildung 28B). Im weiteren Verlauf konnte eine zeitabhängige Verringerung der Rezeptoraktivität als Folge der HBE-Inkubation beobachtet werden. So wurde die Rezeptor-phosphorylierung durch die jeweils höchste HBE-Konzentration nach 2 und 3 h Inkubation signifikant auf 51 ± 22 bzw. 36 ± 13 % (T/C) verringert. Die endogene Rezeptormenge des EGFR unterlag keiner signifikanten Modulation. Lediglich nach 2 und 3 h wurde die Rezeptormenge durch die jeweils höchste Konzentration vermindert (Abbildung 28B). Diese Beobachtung könnte auf eine zytotoxische Wirkung des HBE zurückzuführen sein. Die Zytotoxizität des HBE auf HT29-Zellen wurde parallel im WST-1-Assay (*Water soluble tetrazolium*) ermittelt.

Im WST-1-Assay wird das mitochondriale Dehydrogenasesystem viabler Zellen zur Ermittlung der Toxizität einer Testsubstanz herangezogen. Dieses ist in der Lage, das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 (4-(3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzoldisulfonat) in das dunkelrot gefärbte Formazan umzusetzen. Die Aktivitätsverringerung des Dehydrogenase-Systems durch zytotoxische Substanzen kann photometrisch ($\lambda = 450$ nm) erfasst werden.

Der HBE wurde in diesem Assay über ein breites Konzentrationsspektrum untersucht. Die höchste Konzentration von 10 mg/ml HBE wäre beispielsweise im intestinalen Lumen nach

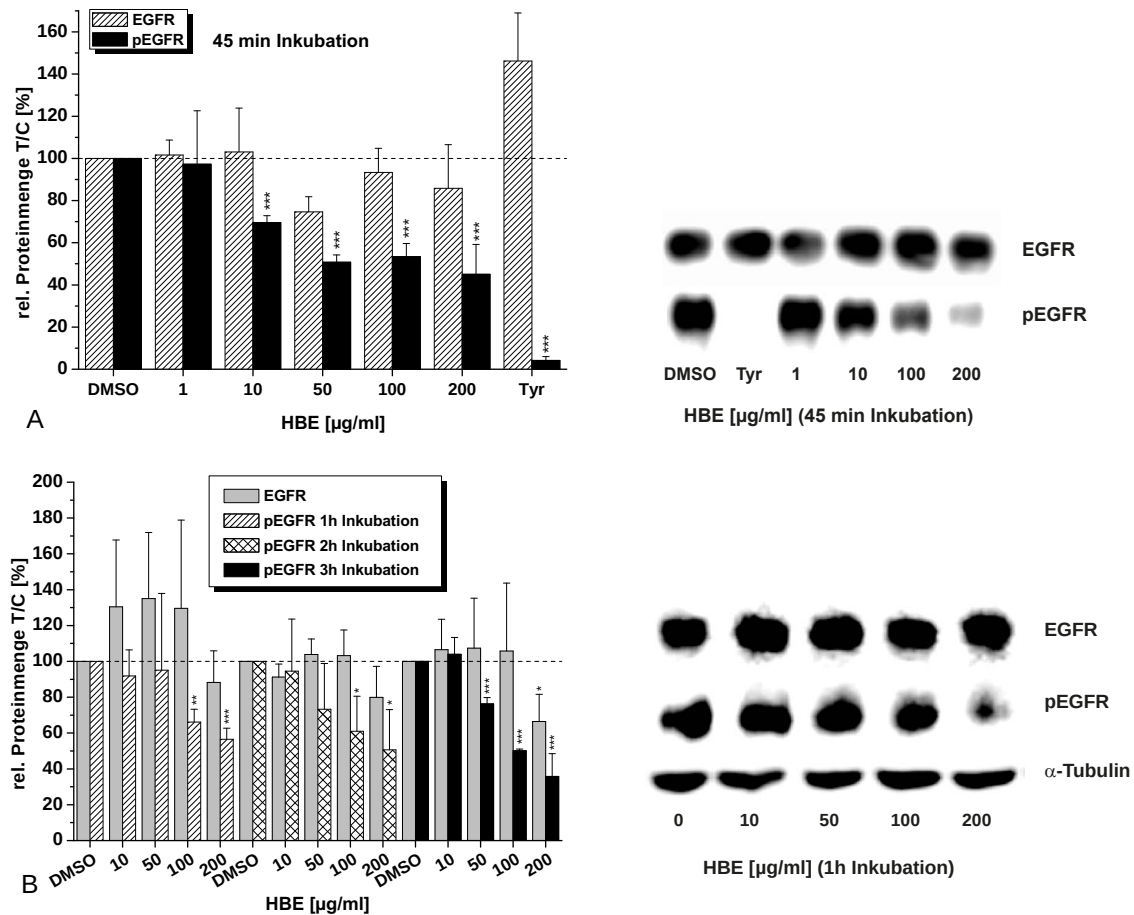


Abbildung 28: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch unverkapselten HBE nach A) 45 min und B) 1–3 h Inkubation ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 1 µM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet sind repräsentative Blotbilder nach 45 min bzw. 1 h Inkubation. Weitere Blotbilder siehe Anhang, Abbildung 72. Die Daten (Abbildung 28A) wurden in Kooperation mit Nicole Teller erhoben (Daten nicht veröffentlicht).

einer Mahlzeit von ~ 300 g frischer Heidelbeeren zur erwarten. Die Inkubation erfolgte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Katalase (100 U/ml) über eine Dauer von 1 h. Als Positivkontrolle wurde das Detergenz Triton-X eingesetzt.

Die Inkubation mit 2,5 mg/ml HBE ohne Zugabe von Katalase verringerte die mitochondriale Aktivität der HT29-Zellen signifikant auf 59 ± 3 % (T/C). Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe nahm die mitochondriale Aktivität scheinbar wieder zu. Unter Zugabe von Katalase wurde die mitochondriale Aktivität durch 5 mg HBE auf maximal 89 ± 6 % (T/C) unterdrückt und nahm nach Inkubation mit der höheren Konzentration von 10 mg Extrakt wieder zu. Die Positivkontrolle Triton-X (1 %) führte zu einer vollständigen Unterdrückung der mitochondrialen Aktivität.

Ohne Zugabe von Katalase konnte für HBE eine zytotoxische Wirkung aufgezeigt werden. Nach Zugabe von Katalase wurde diese Wirkung nicht mehr beobachtet. Die zytotoxische

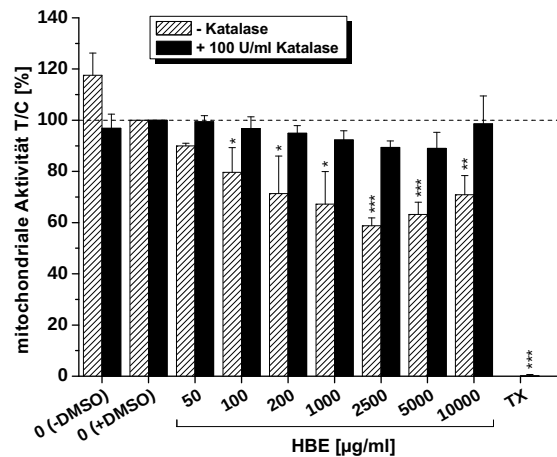


Abbildung 29: Zytotoxizität des unverkapselten HBE auf HT29-Zellen, gemessen im WST-1-Assay nach 1 h Substanzinkubation. Positivkontrolle: 1 % Triton-X. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wirkung des Extrakts scheint deshalb über die bereits erwähnte H_2O_2 -Bildung von Anthocyanen oder weiteren Polyphenolen des Extrakts vermittelt zu werden [Halliwell *et al.*, 2000, Lapidot *et al.*, 2002, Kern *et al.*, 2007]. Der U-förmige Kurvenverlauf ist möglicherweise auf ein Artefakt im Assay zurückzuführen, da bei den sehr hohen Extraktkonzentrationen wesentliche Anthocyanmengen in bzw. auf den Zellen verbleiben und die photometrische Bestimmung beeinflussen. Die Verringerung der EGF-Rezeptormenge nach Inkubation mit hohen Konzentrationen von HBE konnte somit nicht auf eine zytotoxische Wirkung zurückgeführt werden, da diese in der Western Blot Analyse durch Zugabe von Katalase verhindert wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der HBE zwischen 45 min und 3 h Inkubationsdauer in der Lage ist, die EGFR-Aktivität potent zu unterdrücken. Die Wirkung des untersuchten Extrakts ist vergleichbar mit Ergebnissen einer Studie von Teller *et al.* [2009b]. Die Autoren zeigten für den anthocyanreichen Heidelbeerextrakt Mirtocyan[®] (Indena) in EGFR-überexprimierenden Vulvakarzinomzellen (A431) mit einem IC_{50} -Wert von $146 \pm 9 \mu\text{g/ml}$ eine ähnliche Hemmwirkung wie die des HBE in der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus konnten sie die hemmende Wirkung des Extrakts auf weitere ErbB-Rezeptoren sowohl im zellulären als auch im zellfreien System an isolierten Rezeptoren zeigen (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Die Wirkung des untersuchten Extrakts ist somit vergleichbar mit anderen Studien und kann daher als biologischer Parameter zur Beurteilung von Einflüssen auf die Bioaktivität durch die Verkapselung herangezogen werden.

Heidelbeeren enthalten neben Anthocyanen weitere, bioaktive Substanzen, darunter Procyanidine, Catechine und Flavonole. Extrakte aus Äpfeln weisen ebenfalls ein Profil auf, dass besonders reich an diesen Inhaltsstoffen ist. Fridrich *et al.* [2007b] untersuchten die EGFR-Hemmwirkung polyphenolreicher Apfel- und Apfeltresterextrakte in HT29-Zellen. Beide Extrakte zeigten in Anwesenheit von Katalase mit IC_{50} -Werten von 90 ± 12 bzw. $48 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ eine deutlich höhere Wirkqualität hinsichtlich der EGFR-Aktivitätsunterdrückung als der

HBE in der vorliegenden Arbeit. Es wäre daher möglich, dass die EGFR-Hemmwirkung des HBE nicht durch den Anthocyananteil vermittelt wird, sondern möglicherweise auf weitere Inhaltsstoffe zurückgeführt werden kann. Diese Fragestellung wurde in Abschnitt 4.3 bearbeitet.

Extraktbeladene MPK

Die bioaktive Wirkung des HBE aus extraktbeladenen MPK (Abschnitt 2.6.1), suspendiert in Zellkulturmedium, wurde analog zur Wirkung des unverkapselten HBE auf dessen EGFR-Hemmwirkung in HT29-Zellen untersucht. Der HBE-Konzentrationsbereich wurde dabei an den Bereich der Versuchsreihe mit unverkapseltem HBE angelehnt. Die Menge an extraktbeladenen Kapseln wurden mit unbeladenen Referenzkapseln ausgeglichen, sodass jeder Versuch, unabhängig von der Extraktkonzentration, mit derselben Hüllmaterialkonzentration durchgeführt wurde. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit unbeladenen Referenzkapseln inkubiert. Wie in der vorausgegangenen Untersuchung des unverkapselten HBE wurde serumfrei, in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml), inkubiert.

Der erste Versuchsansatz wurde mit mechanisch aufgeschlossenen MPK durchgeführt, um einen Einfluss einer langsamen Extraktfreisetzung auf die Bioaktivität auszuschließen. Somit sollte ermittelt werden, ob die Bioaktivität des HBE bereits durch den Verkapselungsprozess, den Transport, die Lagerung oder eventuell die Interaktion mit dem Kapselmaterial beeinflusst wurde. Die untersuchten Kapseln (MPK1, Tabelle 11) waren mit 5,0 % (w/w) HBE beladen und wurden unter Verwendung von 2 % PCDL (*Phosphatidylcholine-depleted lecithin*) hergestellt. Der mittlere Durchmesser ($x_{50,3}$) dieser Kapseln betrug 52 μm . Die im Zellkulturmedium dispergierte Kapselmaterialmenge wurde, wie oben beschrieben, durch unbeladene Referenzkapseln in allen Versuchen dieser Reihe konstant gehalten.

Die Aktivität des EGFR, ebenso wie die endogene Rezeptormenge, wurden durch die Inkubation mit aufgeschlossenen MPK1 über 45 min bis zu einer HBE-Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 30A). Die Verkapselung in MPK führt folglich zu einem vollständigen Verlust der EGFR-Hemmwirkung des HBE unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 28A).

Für die Verringerung der biologischen Aktivität des HBE durch Verkapselung in die MPK können verschiedene Ursachen postuliert werden:

- Bioaktive Inhaltsstoffe des HBE werden während der Kapselherstellung bzw. dem Transport oder der Lagerung abgebaut.
- Bioaktive Inhaltsstoffe des HBE reagieren mit Kapselbestandteilen und stehen somit anschließend nicht mehr zur Verfügung.
- Hilfsmittel, beispielsweise Emulgatoren, die während der Kapselproduktion zugesetzt werden, interagieren mit dem Assay.
- Das Zeitfenster der biologischen Wirkung des HBE wurde durch die Formulierung in MPK verschoben.

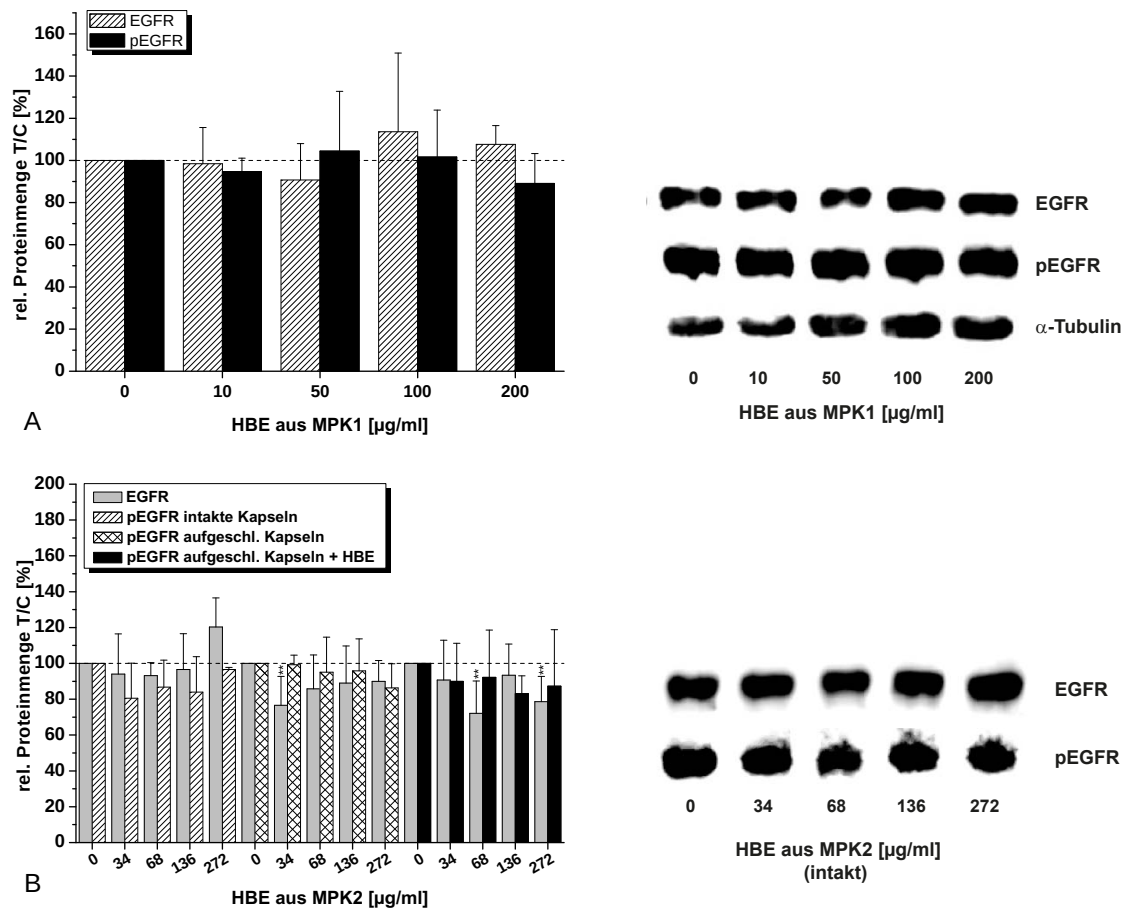


Abbildung 30: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch HBE aus A) aufgeschlossenen MPK1 und B) MPK2 nach jeweils 45 min, ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (unbeladene Referenzkapseln). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: ** $p < 0,01$. Abgebildet sind zwei repräsentative Blotbilder. Weitere Blotbilder siehe Anhang, Abbildung 73.

PCDL ist ein Emulgator und könnte somit einen destabilisierenden Einfluss auf die Membran der HT29-Zellen ausüben. Experimentelle Artefakte im Assay können folglich nicht ausgeschlossen werden. Für einen weiteren Versuchsansatz wurden daher größere MPK ($x_{50,3} = 198 \mu\text{m}$) mit einer höheren Extraktbeladung (10,0 %) ohne Zusatz von PCDL erstellt (MPK2, Tabelle 11) und auf deren Hemmwirkung gegenüber des EGFR in HT29-Zellen untersucht. Die Kapseln wurden in diesem Versuchsansatz parallel in intakter Form und in mechanisch aufgeschlossenem Zustand inkubiert. Wie zuvor wurde die Konzentration des Kapselmaterials durch Ausgleich mit unbeladenen Referenzkapseln in allen Versuchen dieser Reihe konstant gehalten. Darüber hinaus wurde eine Koinkubation von aufgeschlossenen Referenzkapseln (unbeladen) mit unverkapseltem HBE durchgeführt. Die weiteren Parameter des Assays wurden wie zuvor beibehalten.

Die Inkubation sowohl mit intakten als auch mit aufgeschlossenen MPK2 über 45 min beeinflusste die EGFR-Aktivität bis zur höchsten untersuchten HBE-Konzentration (272 $\mu\text{g/ml}$) nicht signifikant (Abbildung 30B). Die Koinkubation von unbeladenen Referenzkapseln

mit unverkapseltem HBE resultierte in einem vollständigen Verlust der Bioaktivität des nativen Extrakts, sodass die Rezeptoraktivität durch die Inkubation nicht beeinflusst wurde (Abbildung 30B).

Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde in den Versuchen nicht beeinflusst. Bei einigen wenigen Konzentrationen wurde dennoch eine Verringerung der EGFR-Proteinmenge festgestellt. Diese erfolgte jedoch nicht konzentrationsabhängig und kann daher als Artefakt bewertet werden.

Die EGFR-Hemmwirkung des HBE war sowohl in intakten als auch aufgeschlossenen Kapseln verringert. Ein durch die verzögerte Anthocyanfreisetzung verursachter Effekt konnte ausgeschlossen werden, da die ohnehin schon schnellen diffusiven Prozesse der HBE-Freisetzung durch den mechanischen Aufschluss vollständig umgangen wurden. Vielmehr stellte sich durch den Koinkubationsversuch heraus, dass das Kapselmateriale die Bioaktivität des HBE zu beeinträchtigen scheint.

Um zu überprüfen, inwiefern Proteine das Testsystem beeinflussen, wurden Koinkubationen mit verschiedenen Proteinen und HBE durchgeführt. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde als ein standardisiertes Protein eingesetzt. Weiterhin wurden Koinkubationsversuche mit Molkenprotein (MP), das zur Kapselherstellung verwendet wurde, sowie intakten unbeladenen MPK3 (Tabelle 11) durchgeführt. In den Ansätzen wurde in Kombination mit 200 µg/ml unverkapseltem HBE (in 1 % DMSO) inkubiert. Die Daten wurden auf die Negativkontrolle (1 % DMSO) normiert. Als Positivkontrolle wurde mit 200 µg/ml unverkapseltem HBE inkubiert. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede der Koinkubationsansätze erfolgte sowohl auf die Negativ- als auch auf die Positivkontrolle.

Die EGFR-Aktivität wurde durch die Inkubation mit HBE signifikant auf $34 \pm 5 \%$ (T/C) verringert (Abbildung 31). Die Koinkubation des HBE mit Proteinen führte zu einer Verringerung der EGFR-Hemmwirkung, die sich in einer signifikanten Erhöhung der EGFR-Aktivität gegenüber der Positivkontrolle widerspiegelte. Die Verminderung der Bioaktivität des HBE erfolgte jedoch nicht vollständig, sondern nur teilweise. BSA hatte in dieser Versuchsreihe den stärksten Einfluss auf die biologische Aktivität des unverkapselten HBE. Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde weder durch die HBE- noch durch die Proteininkubation signifikant beeinflusst.

Die hier gezeigten Resultate belegen, dass die untersuchten Proteine zumindest teilweise eine vermindernde Wirkung auf die Aktivität des unverkapselten HBE vermitteln. Gelöste Proteine sowie intakte Kapseln scheinen einen geringeren Einfluss auf die Bioaktivität des HBE zu besitzen als mechanisch aufgeschlossene Kapseln (Vgl. Abbildung 30B), bei deren Inkubation ein vollständiger Verlust der HBE-Bioaktivität zu verzeichnen war. Diese beiden Untersuchungen weisen allerdings Unterschiede im Ablauf der Inkubation auf. Während die Kapseln in der vorangegangenen Untersuchung mechanisch aufgeschlossen wurden, erfolgte in diesem Versuch die Suspension unbeladener Referenzkapseln mit unverkapseltem HBE direkt vor der Zellinkubation ohne Eintrag mechanischer Energie.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die EGFR-Hemmwirkung extraktbeladener MPK, deren Herstellungsprozess hinsichtlich der Partikelgröße und HBE-Beladung optimiert wurde

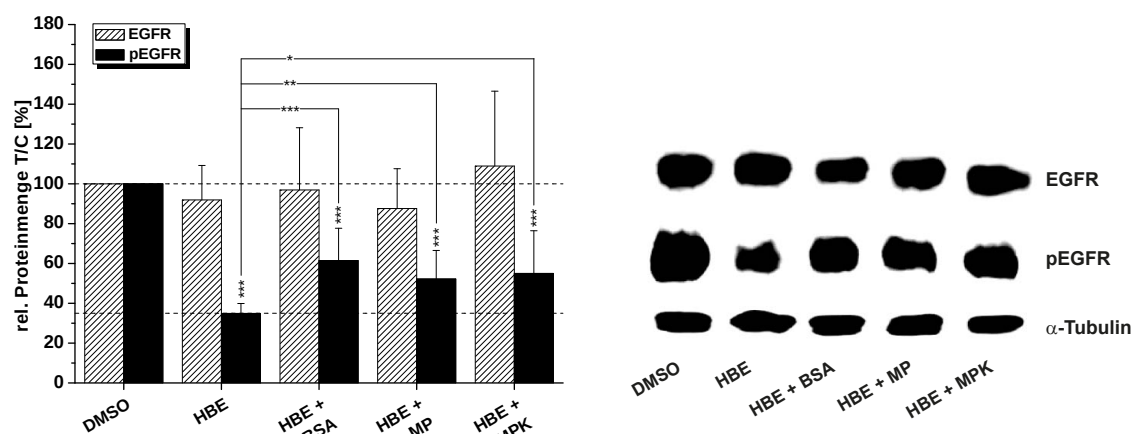


Abbildung 31: Einfluss ausgewählter Proteine auf die Bioaktivität des HBE hinsichtlich der Hemmung der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen nach 45 min Inkubationszeit ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation von bovinem Serumalbumin (BSA), Molkenprotein (MP) bzw. unbeladenen MPK3 (jeweils 1 mg/ml) in Kombination mit Heidelbeerextrakt (HBE, 200 μ g/ml) in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von sechs unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 μ g/ml): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet ist ein repräsentatives Blotbild.

(MPK3, Tabelle 11), untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob die Wirkung des HBE aufgrund retardierter Inhaltsstofffreisetzung möglicherweise zeitverzögert einsetzt. Obwohl die Freisetzung der Anthocyane bereits nach 5 min abgeschlossen war (Abbildung 25A), könnten andere bioaktive Verbindungen länger mit den Hüllmaterial assoziiert bleiben. Aufgrund dieser Vermutung wurde die Inkubationszeit von 45 min auf 1–3 h erweitert. Die Induktion der EGFR-Aktivität wurde, wie in den vorausgegangenen Untersuchungen, in den terminalen 15 min durch Zugabe von EGF (100 ng/ml) erreicht.

Die Inkubation der HT29-Zellen über 1 und 3 h hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Rezeptoraktivität des EGFR (Abbildung 32). Nach 2 h wurde die Rezeptoraktivität jedoch signifikant und konzentrationsabhängig auf 64 ± 19 % (T/C) verringert. Die endogene Rezeptormenge des EGFR war nach keiner der untersuchten Inkubationszeiten signifikant verändert.

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die biologische Wirksamkeit des Extrakts hinsichtlich der EGFR-Aktivität durch die Verkapselung in MPK3 auf einen engen Zeitraum von ~ 2 h beschränkt wurde. Gleichzeitig wurde die Hemmwirkung des HBE durch die Verkapselung deutlich vermindert (Vgl. Abbildung 28B).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass bioaktive Substanzen des HBE mit Kapselbestandteilen assoziiert sind und sich erst nach einer bestimmten Zeit durch die Inkubation im Zellkulturmedium lösen. Der beobachtete Verlust der Bioaktivität nach 3 h (Abbildung 32) lässt sich mit dieser Hypothese jedoch nicht erklären, da die Aktivitätsunterdrückung des EGFR durch den nativen Extrakt über einen Zeitraum von 3 h stabil war (Abbildung 28B).

Zusammenfassend wird die EGFR-Hemmwirkung des HBE durch die Verkapselung in

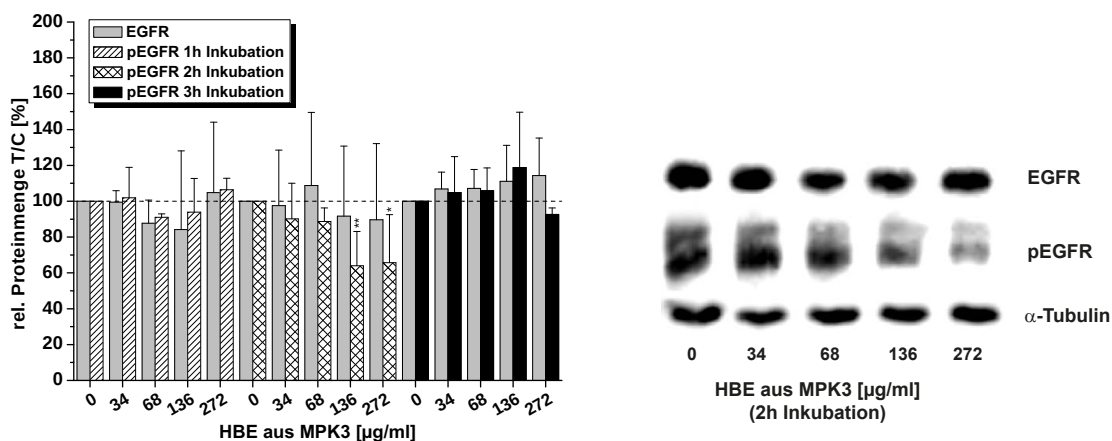


Abbildung 32: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch HBE aus intakten MPK3 nach 1–3 h Inkubation ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (unbeladene Referenzkapseln). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Abgebildet ist ein repräsentatives Blotbild nach 2 h Inkubation. Weitere Blotbilder siehe Anhang, Abbildung 74.

MPK deutlich (2 h), teilweise sogar vollständig (1 und 3 h), verringert. Die Wirksamkeit des HBE konnte durch einen mechanischen Aufschluss nicht wiederhergestellt werden. Weiterhin scheint sich die Bioaktivität des HBE nach der Verkapselung auf ein bestimmtes Zeitfenster von ~ 2 h zu beschränken. Die Anthocyanfreisetzung aus diesem Kapselsystem läuft jedoch vollständig und schnell ab (Abbildung 25A). Darüber hinaus scheint die Proteinverkapselung die Anthocyane im Verlauf der Inkubation zu stabilisieren (Abbildung 27B). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die EGFR-Hemmwirkung über die enthaltenen Anthocyane vermittelt wurde oder ob eventuell andere bioaktive Inhaltsstoffe des Extrakts für die beobachtete Wirkung des unverkapselten HBE verantwortlich waren. Dieser Fragestellung wurde in Abschnitt 4.3 nachgegangen.

Extraktbeladene PHK

Extraktbeladene PHK (Abschnitt 2.6.2) wurden unter analogen Bedingungen wie HBE und MPK auf eine mögliche EGFR-Hemmwirkung in HT29-Zellen untersucht. Wie zuvor wurden auch diese Kapseln für die Inkubationsversuche zunächst aufgeschossen, um die biologische Aktivität des verkapselten HBE ohne Einfluss der zeitverzögerten Freisetzung zu erfassen. Somit sollte der Einfluss der Kapselherstellung, des Transports, der Lagerung und des Kapselmaterials auf die Aktivität des Extrakts bestimmt werden. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde serumfrei in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) inkubiert. In Analogie zu den Versuchen mit unverkapseltem HBE und den extraktbeladenen MPK wurden HT29-Zellen mit den aufgeschlossenen PHK für 1–3 h inkubiert und die Phosphorylierung des EGFR als Maß für dessen Aktivität bestimmt. Die im Zellkulturmedium dispergierte Hüllmaterialmenge wurde, wie bereits in den Versuchen mit MPK, durch unbeladene Referenzkapseln in allen Versuchen dieser Reihe konstant gehalten. Als Negativkontrolle wurde mit einer

entsprechenden Menge an aufgeschlossenen Referenzkapseln inkubiert.

Die Inkubation der HT29-Zellen mit den aufgeschlossenen, HBE-beladenen PHK hatte eine konzentrationsabhängige und signifikante Verringerung der EGF-Rezeptoraktivität zur Folge (Abbildung 33A). Die Rezeptoraktivität wurde durch die höchste untersuchte HBE-Konzentration (200 µg/ml) in Abhängigkeit der Inkubationszeit auf 46 ± 23 , 30 ± 8 und 40 ± 6 % (T/C, für 1, 2 bzw. 3 h) unterdrückt. Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Kapselinkubation nicht signifikant beeinflusst.

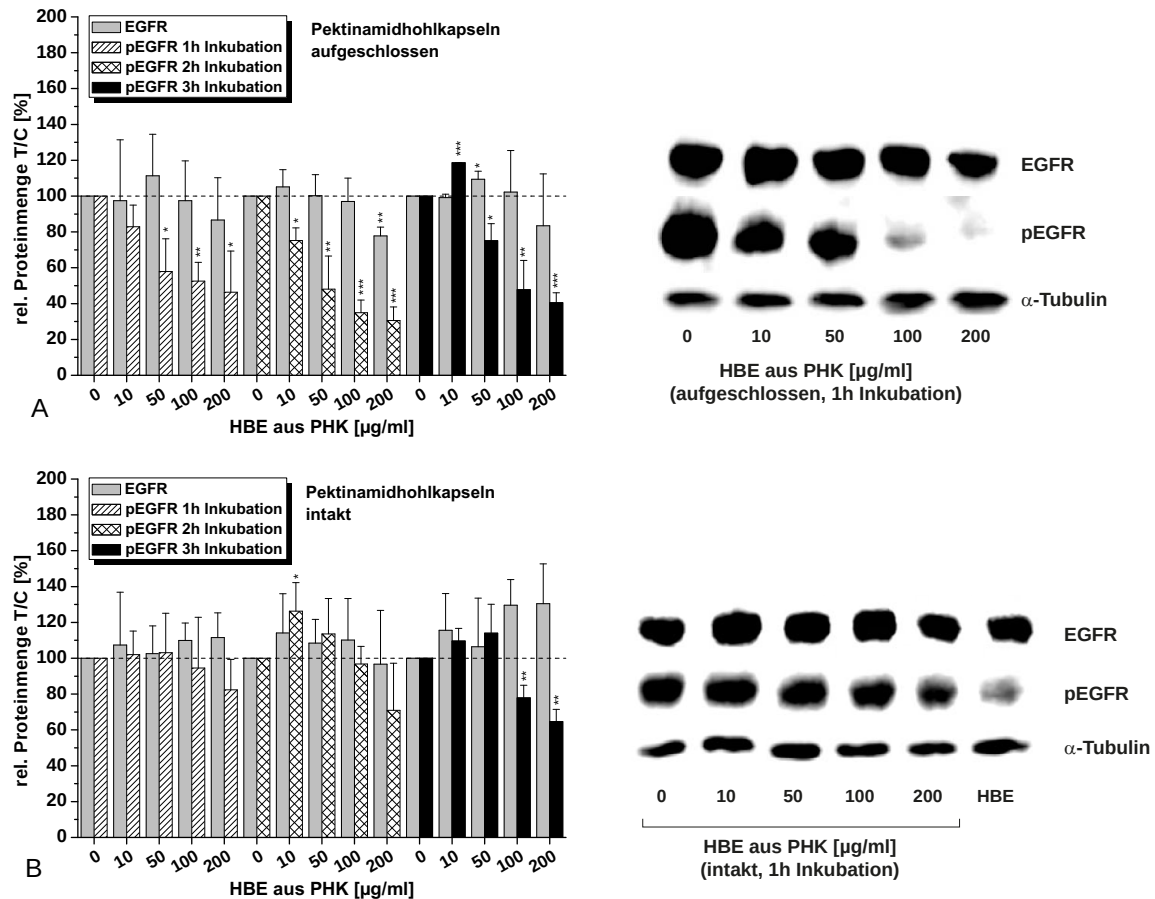


Abbildung 33: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch HBE aus A) aufgeschlossenen und B) intakten PHK nach 1–3 h Inkubation ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (unbeladene Referenzkapseln). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet sind repräsentative Blotbilder nach jeweils 1 h Inkubation. Weitere Blotbilder siehe Anhang, Abbildung 76.

Die beobachtete Unterdrückung der Rezeptoraktivität durch HBE aus aufgeschlossenen PHK ist vergleichbar mit der Verringerung, die durch den unverkapselten HBE erzielt wurde (Abbildung 28B). Die biologische Aktivität des HBE wurde folglich durch diesen Verkapselung in PHK, im Gegensatz zur Verkapselung in MPK (Abbildung 30A), nicht beeinträchtigt.

In der darauffolgenden Untersuchung wurde der Frage nachgegangen, ob die Inkubation mit HBE aus intakten PHK die Rezeptoraktivität im selben Maß unterdrückt, wie der un-

verkapselte HBE. Dazu wurden HT29-Zellen mit intakten PHK unter analogen Bedingungen wie im vorausgegangenen Experiment inkubiert. Die Konzentration des Kapselmaterials wurde ebenfalls durch unbeladene PHK ausgeglichen.

Nach 1 und 2 h Inkubation mit extraktbeladenen intakten PHK wurde die EGFR-Phosphorylierung in der jeweils höchsten untersuchten HBE-Konzentration (200 µg/ml) nicht signifikant auf 82 ± 17 bzw. 71 ± 26 % (T/C) verringert (Abbildung 33B). Die Rezeptoraktivität wurde nach 2 h durch Inkubation mit der niedrigsten HBE-Konzentration von 10 µg/ml signifikant auf 126 ± 16 % (T/C) erhöht. Der Aktivitätsverlauf könnte somit eine Glockenkurve widerspiegeln, wobei die höchste Substanzkonzentration ohne signifikante Wirkung (*No observed effect concentration*, NOEC) nicht bestimmt wurde. Im Kontext der Untersuchungen des HBE und den anderen extraktbeladenen Kapselsystemen ist jedoch nicht von einer Steigerung der EGFR-Aktivität nach Inkubation mit niedrigen Konzentrationen auszugehen. Möglicherweise stellt diese Induktion daher ein experimentelles Artefakt dar.

Eine signifikante Verringerung der Rezeptoraktivität durch intakte Kapseln wurde lediglich nach 3 h Inkubation beobachtet (65 ± 7 % (T/C)). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Inkubation (1 + 2 h) mit den extraktbeladenen Kapseln nicht signifikant beeinflusst. Nach dreistündiger Inkubation wurde jedoch eine Zunahme des Rezeptorproteins, insbesondere in hohen Konzentrationen beobachtet. Diese war jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Die Ergebnisse zeigen, dass die allmähliche Freisetzung des HBE in das Zellkulturmedium zu einer deutlichen Verringerung der EGFR-Hemmwirkung des HBE beiträgt. Die Resultate korrelieren mit den Ergebnissen aus den Freisetzungsuntersuchungen (Abschnitt 4.1.3): Obwohl die Anthocyane im Sauren innerhalb einer Stunde vollständig aus den PHK freigesetzt wurden (Abbildung 26A), war die resultierende AUC im neutralen Zellkulturmedium gegenüber der Kontrolle (unverkapselter HBE) signifikant verringert. Diese Beobachtung könnte auf einen Zusammenhang zwischen der freigesetzten Anthocyanmenge und der Verringerung der Rezeptoraktivität schließen lassen. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass neben den Anthocyanen auch weitere, nicht untersuchte, bioaktive Inhaltsstoffe im HBE enthalten sein können, die unter neutralen Bedingungen unterschiedliche chemische Stabilitäten aufweisen können. Die dabei auftretenden Kinetiken dürften zwischen einer reinen Freisetzung der Substanzen und einer Überlagerung von Freisetzung und Abbau, wie im Falle der Anthocyane, einzuordnen sein. Die Wirkung eines Gemischs von Substanzen unterschiedlicher Stabilität bei gleichzeitiger Freisetzung aus einem Kapselsystem konnte hierbei nicht ausreichend erfasst werden.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eine potente Hemmung der EGFR-Aktivität erst nach 3 h auftrat, obwohl die Anthocyanfreisetzung bereits nach 1 h vollständig abgeschlossen war (Abbildung 26A). Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, dass die Hemmwirkung durch andere bioaktive Inhaltsstoffe mit niedrigeren Diffusionskoeffizienten, beispielsweise polymere Proanthocyanidine (Abschnitt 4.3), vermittelt werden könnte.

Extraktbeladene DMH

Im Rahmen der Untersuchungen zur EGFR-Hemmwirkung wurde schließlich in DMH formulierter HBE (Abschnitt 2.6.3) untersucht. Dieses System stellt eine Emulsion mit hoher Viskosität dar. Aufgrund der niedrigen HBE-Beladung des Systems von 0,24 % (w/w) (Tabelle 12) wurden dem Zellkulturmedium bis zu 10 % (w/v) beladene DMH zugegeben. Die Konzentration an Hüllmaterial wurde wie zuvor durch unbeladene Emulsion ausgeglichen. Die Modulation der EGFR-Aktivität wurde in HT29-Zellen, nach 45 min Inkubation in serumfreien Medium in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) untersucht.

Die Inkubation mit Emulsion beeinflusste die Aktivität des EGFR in HT29-Zellen nach 45 min bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 240 µg/ml HBE nicht signifikant (Abbildung 34). Die endogene Rezeptormenge wurde ebenfalls nicht signifikant beeinflusst.

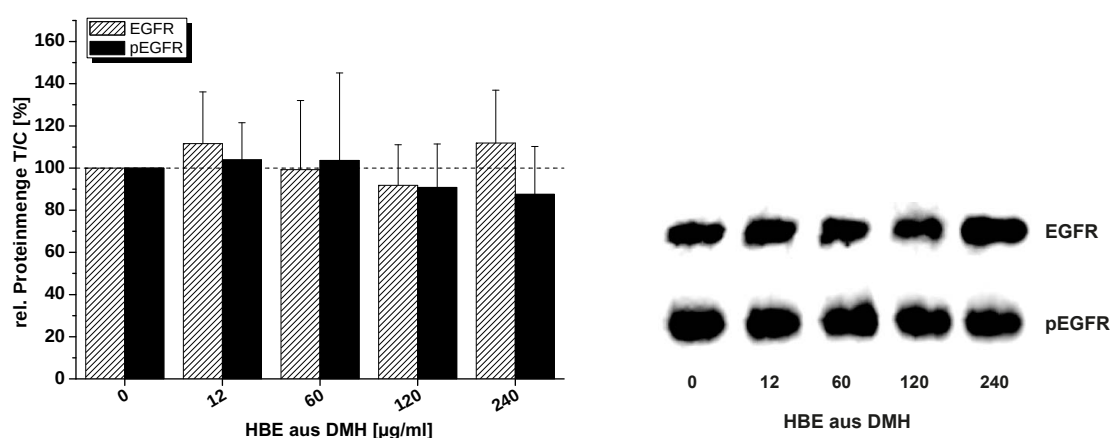


Abbildung 34: Hemmung der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch den HBE aus DMH nach 45 min Inkubation, ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (unbeladene Emulsion). Abgebildet ist ein repräsentatives Blotbild.

Die Freisetzung von Anthocyanen aus der Emulsion wurde von Frank [2012] mittels HPLC-Analyse nach Vorreinigung durch Festphasenextraktion untersucht. Sie zeigte, dass die im Beobachtungszeitraum freigesetzte Menge, je nach Art der Tropfengröße und dem gewählten Emulgator, im Vergleich zu den anderen Kapselsystemen niedrig war. So wurden innerhalb der ersten 30 min lediglich 35 % der eingeschlossenen Anthocyane freigesetzt. Die Anthocyanfreisetzung ist damit deutlich langsamer als aus MPK und PHK (Vgl. Abbildung 27A). Darüber hinaus konnte Frank [2012] einen Übergang von Anthocyanen in die Lipidphase nachweisen, der vermutlich auf mechanischen Energieeintrag bei der Emulsionsherstellung in Verbindung mit der großen Grenzfläche zurückzuführen ist. Ein Übergang weiterer bioaktiver Substanzen mit geringer Polarität in die Lipidphase wäre somit denkbar.

Die langsame Freisetzung und der Stoffübergang potentiell bioaktiver Substanzen in die Lipidphase könnten somit eine Erklärung für den Verlust der Bioaktivität des HBE

nach Verkapselung in DMH hinsichtlich der EGFR-Aktivität darstellen. Die Freisetzung im Zellkulturmedium kann in diesem Fall jedoch nicht mit der *in vivo*-Situation verglichen werden. Im Darmlumen werden Fettphasen einerseits durch Gallensäuren emulgiert und durch Lipasen innerhalb kurzer Zeit aufgeschlossen, sodass in Lipidsysteme formulierte Substanzen freigesetzt werden und der Aufnahme zur Verfügung stehen.

Ex vivo-Verdau ausgewählter Kapselsysteme

Das Einbringen intakter Kapseln in das *in vitro*-Zellkultursystem erfolgt unter vereinfachten Bedingungen. Insbesondere die Abwesenheit von Verdauungsenzymen führt zu einer Abweichung gegenüber der *in vivo*-Situation. Im Zellkulturmodell wird der physiologische Aufschluss von Proteinpartikeln durch die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Pankreaselastase nicht berücksichtigt. Um die *in vivo*-Situation besser nachzustellen, wurde daher mit ausgewählten, extraktbeladenen Kapselsystemen ein *ex vivo*-Verdau in Ileostomaausfluss durchgeführt, bevor diese zur Inkubation von Zellen verwendet wurden. Wie in den Versuchen zuvor wurde die EGFR-Hemmwirkung als Maß der Bioaktivität des HBE untersucht.

Ileostomiepatienten besitzen einen künstlich angelegten, temporären oder dauerhaften Darmausgang nach dem terminalen Dünndarm (*Ileum*), den sog. Ileostoma. Bei diesen Patienten ist die Funktionsfähigkeit des Dickdarms (*Kolon*) eingeschränkt oder dieser wurde komplett entnommen. Indikationen für ein Ileostoma sind schwere Verläufe endzündlicher Darmerkrankungen (beispielsweise Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn), tiefsitzende Tumore des Enddarms oder familiäre adenomatöse Polyposis [Kelm und Urbanek, 2004]. Ileostomaausfluss stellt den Darminhalt dar, der bei Ileostomiepatienten am Ende des Dünndarms abgenommen werden kann. Dieser Ausfluss enthält alle relevanten Verdauungsenzyme des Dünndarms, wie Lipasen, Glycosidasen und Proteasen. Er eignet sich somit insbesondere für anaerobe *ex vivo*-Fermentationsuntersuchungen, um den physiologischen Zustand im Dünndarm zu simulieren [Knaup *et al.*, 2007].

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, inwiefern sich 1.) die Fermentation mit Ileostomaausfluss auf die Bioaktivität des unverkapselten HBE auswirkt und 2.) welchen Einfluss die Fermentation auf verkapselten HBE in MPK und PHK besitzt. Untersucht wurde der Einfluss der Fermentation auf die EGFR-Hemmwirkung von HBE und extraktbeladener MPK bzw. PHK in HT29-Zellen.

Im Gegensatz zu vorausgegangenen Untersuchungen nach der Methode von Kern *et al.* [2005], wurden in diesem Versuchsansatz die Zellen in Gegenwart von 10 % (v/v) FKS inkubiert, um aktive Proteasen des Ileostomaausflusses zu inaktivieren. Da der Zusatz von Serum einen wesentlichen Eingriff in die Versuchsdurchführung darstellte, wurde diese zunächst mit unverkapseltem HBE erneut etabliert. Die Konzentration an HBE wurde im Vergleich zu vorausgegangenen Untersuchungen der vorliegenden Studie auf 400 µg/ml erhöht, da der Zusatz von FKS die EGFR-Hemmwirkung des Extrakts deutlich erniedrigte. Als Negativkontrolle diente DMSO (1 %) und als Positivkontrolle Tyrphostin AG 1478 (1 µM). Darüber hinaus wurde eine weitere Negativkontrolle mitgeführt, bei der keine Induktion der

Rezeptoraktivität mit EGF stattfand. Anhand dieser Kontrolle sollte überprüft werden, ob die Inkubation mit 10 % FKS einen stimulierenden Einfluss auf die Rezeptoraktivität besitzt. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden HT29-Zellen in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) über 45 min mit den Testsubstanzen inkubiert.

Die Stimulierung mit EGF erhöhte die Rezeptoraktivität um das ca. zwölffache (Abbildung 35). Inkubation mit 400 µg/ml HBE oder 1 µM Tyrphostin AG 1478 bei gleichzeitiger EGF-Stimulation verringerte die Rezeptoraktivität signifikant auf 69 ± 16 bzw. 9 ± 3 % (T/C). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde, mit Ausnahme der Positivkontrolle, durch die Substanzinkubation nicht signifikant beeinflusst.

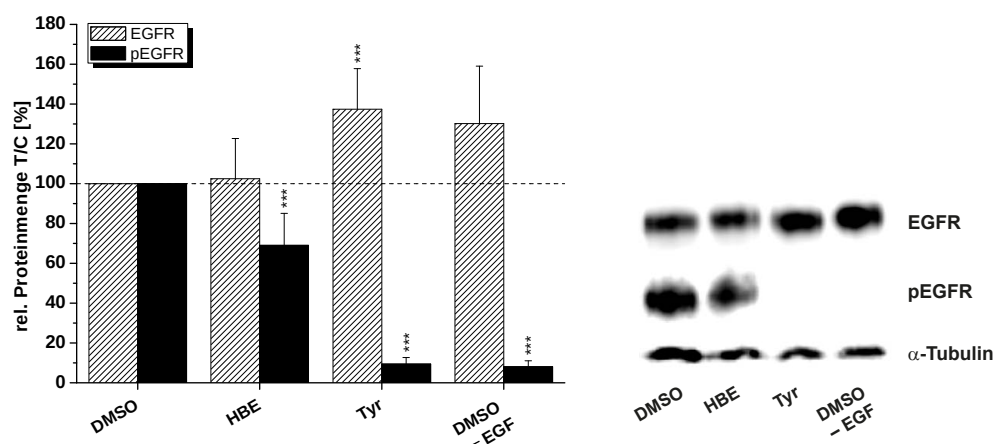


Abbildung 35: Etablierung der Western Blot Analyse unter Zugabe von 10 % (v/v) FKS während der Substanzinkubation. Inkubation von HT29-Zellen mit Testsubstanzen (400 µg/ml HBE; 1 µM Tyrphostin AG 1478 (Tyr)) in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase über 45 min. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von 13 unabhängigen Experimenten, normiert auf die Lösemittelkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: *** $p < 0,001$. Dargestellt ist ein repräsentatives Blotbild.

FKS stellt ein nicht genau definiertes Konglomerat plasmatischer Proteine dar und enthält eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren [Dubey *et al.*, 1997]. Die Anwesenheit von FKS während der Substanzinkubation könnte unter Umständen den untersuchten Rezeptor in unkontrollierter Weise induzieren. Die Hemmung des Rezeptors durch zu untersuchende Substanzen wäre daher möglicherweise nicht mehr erfassbar. Die niedrige Rezeptoraktivität in Abwesenheit von EGF zeigte jedoch, dass der Einfluss von FKS unter diesen Bedingungen vernachlässigbar war.

Die potente Hemmung des Rezeptors durch den spezifischen Inhibitor Tyrphostin AG 1478 zeigte, dass der Versuch in Anwesenheit von 10 % (v/v) FKS grundsätzlich durchführbar war. Die Hemmung des Rezeptors durch 400 µg/ml HBE war in Anwesenheit von FKS jedoch deutlich schwächer als unter serumfreien Bedingungen (Abbildung 28A). Die Unterdrückung der Rezeptoraktivität war dennoch ausgeprägt genug um die signifikante Hemmwirkung des HBE unter diesen Bedingungen aufzuzeigen.

Die *ex vivo*-Fermentation wurde von der Arbeitsgruppe Richling (Technische Universität Kaiserslautern, Institut für Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie) nach einer modifi-

zierten Methode von Keppler und Humpf [2005] durchgeführt. Ileostomaausfluss wurde von zwei Patienten (männlich, 65 Jahre und weiblich, 58 Jahre) erhalten. Keiner der Probanden unterlag im Zeitraum von drei Wochen vor der Probenahme einer Antibiotikamedikation. Die Probanden verzichteten im Zeitraum von zwei Tagen vor der Probennahme auf eine polyphenolhaltige Kost. Die Untersuchungen wurden durch das Ethikvotum der Landesärztekammer Mainz Nr. 837.242.07 (5777) genehmigt. Die Ileostomaausflüsse beider Probanden wurden gepoolt und 1:1 mit einem Carbonat/Phosphat-Puffer (pH 6,3) nach Lebet *et al.* [1998] vermischt. Dieser Ansatz wurde mit 60 mg/ml unverkapseltem HBE oder der entsprechenden Menge HBE-beladener Kapseln (MPK bzw. PHK) in separaten Reaktionsgefäßen über 0, 1, 2, 4 und 8 h unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße abzentrifugiert und der Überstand bei – 80 °C lyophilisiert. Zur Kontrolle wurden Blindansätze ausschließlich mit Ileostomainhalt und Carbonat/Phosphat-Puffer inkubiert.

Für die Inkubation der HT29-Zellen wurden Lyophilisate der Fermentationsansätze in Wasser gelöst und mit Zellkulturmedium auf eine HBE-Konzentration von 400 µg/ml (0 h) verdünnt. Die Inkubation wurde wie zuvor in Anwesenheit von 10 % (v/v) FKS und 100 U/ml Katalase über 45 min durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein Blindansatz (Ileostomaausfluss) ohne HBE-Zugabe eingesetzt. Als Positivkontrollen wurden HBE (400 µg/ml) und Tyrphostin AG 1478 (1 µM) mit entsprechender Lösemittelkontrolle (1 % DMSO) mitgeführt. Die Rezeptoraktivität wurde als Maß der Phosphorylierung in der Western Blot Analyse ermittelt.

Der fermentierte HBE beeinflusste die Aktivität des EGFR nach 45 min Inkubation nicht signifikant (Abbildung 36A). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde ebenfalls nicht signifikant moduliert.

Die Fermentation mit Ileostomaausfluss führte zu einem kompletten Verlust der EGFR-Hemmwirkung des unverkapselten HBE (Abbildung 36A). Durch die Verkapselung in MPK oder PHK könnten bioaktive Verbindungen vor dem mikrobiellen Abbau während des *ex vivo*-Verdau geschützt werden, sodass diese die Zellen unter Umständen intakt erreichen. Gleichzeitig könnten bioaktive Verbindungen, die in der Matrix der Kapseln gebunden vorliegen (Abschnitt 4.2.1), freigesetzt und somit deren bioaktive Wirkung wieder hergestellt werden. Um dies zu überprüfen wurde mit *ex vivo*-verdauten Kapseln unter analogen Bedingungen der vorangegangenen Untersuchung inkubiert.

Der *ex vivo*-Verdau der MPK und PHK mit Ileostomaausfluss führte ebenfalls zu einem kompletten Verlust der EGFR-Hemmwirkung des verkapselten Extrakts. Die Rezeptoraktivität wurde durch Inkubation mit den fermentierten MPK und PHK nicht signifikant modifiziert (Abbildung 36B und C). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Inkubation ebenfalls nicht beeinflusst. Die Positivkontrollen HBE (400 µg/ml) und Tyrphostin AG 1478 verringerten die EGFR-Aktivität signifikant (Verringerung auf 69 ± 16 bzw. 9 ± 3 % (T/C)). Die Positivkontrollen aller Versuchsreihen im Kontext der fermentierten Kapselproben wurden gemittelt und sind in Abbildung 35 dargestellt.

In einer Studie von Veeriah *et al.* [2007] wurde der Einfluss einer *ex vivo*-Fermentation

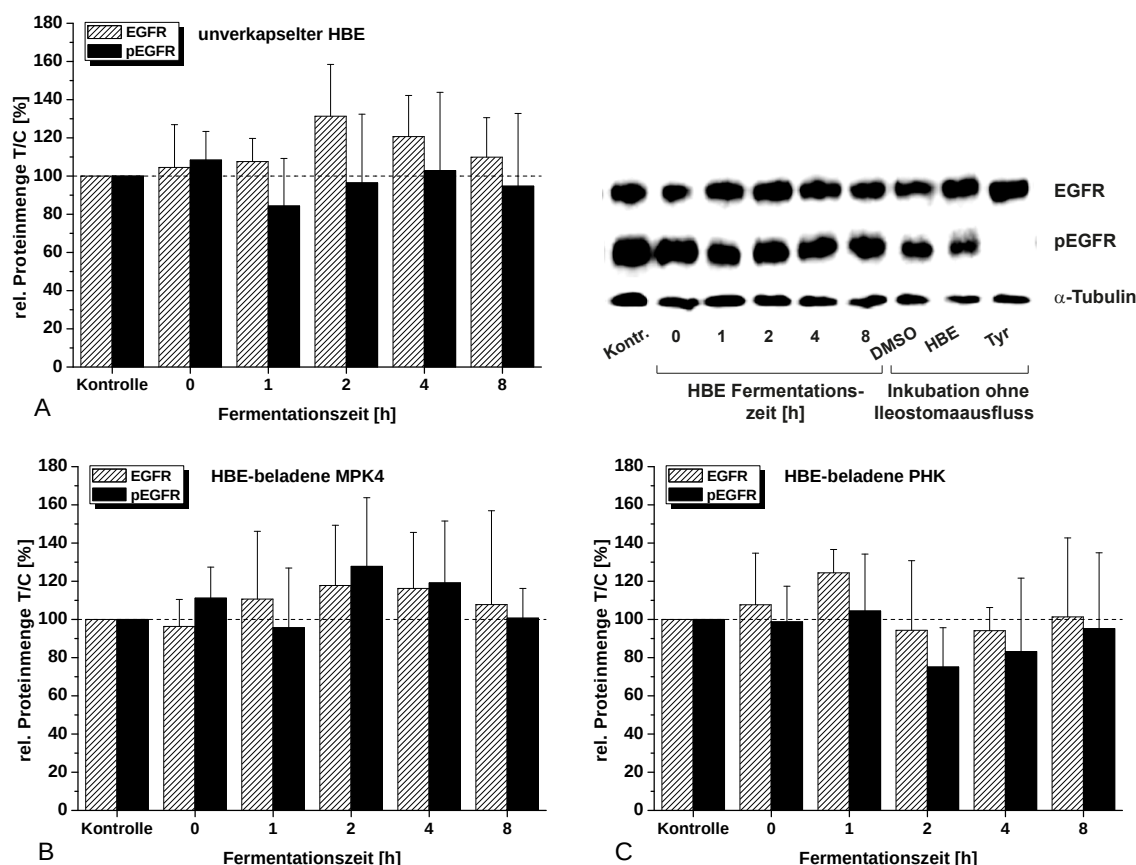


Abbildung 36: Modulation der EGFR-Aktivität durch HBE und HBE-beladene Kapselsysteme nach deren *ex vivo*-Verdau mit Ileostomaausfluss über verschiedene Fermentationszeiten: A) unverkapselter HBE, B) HBE-beladene MPK4 und C) HBE-beladene PHK. Inkubation von HT29-Zellen mit Fermentationsansätzen in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase über 45 min. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. MW $\pm$ SD von vier unabhängigen Experimenten, normiert auf den Blindansatz (Ileostomaausfluss). Gezeigt ist ein repräsentatives Blotbild nach Inkubation mit fermentiertem HBE. Weitere Blotbilder siehe Anhang, Abbildung 75.

mit humanen Fäzes (24 h) auf die wachstumshemmenden Potentiale polyphenolreicher Apfelsaftextrakte untersucht. In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls ein signifikanter Verlust (Faktor 10) der wachstumshemmenden Wirkung der fermentierten gegenüber der unbehandelten Extrakte auf HT29- und LT97-Zellen (Kolonadenomzellen) nach 24, 48 und 72 h Inkubation festgestellt. Die Autoren führten den Verlust auf wesentliche Verluste an Polyphenolen, die durch die Fermentation verursacht wurden, zurück.

Zusammenfassend führt die Anwesenheit von Ileostomaausfluss zu einem essentiellen Verlust der EGFR-Hemmwirkung des HBE und der extraktbeladenen Kapselsysteme. Dieser Verlust ist entweder auf den Abbau aktiver Inhaltsstoffe (spontan, enzymvermittelt oder mikrobiell) oder auf deren Assoziation mit Makromolekülen des Ileostomaausfluss (beispielsweise Proteine) zurückzuführen. Die aufgestellte Hypothese, dass ein Verdau die biologische Wirksamkeit von HBE und den Kapselsystemen erhöht, indem wirksame Abbauprodukte oder hüllmaterialgebundene aktive Substanzen freigesetzt werden, konnte für diesen biologischen Endpunkt nicht bestätigt werden.

4.2.2 Beeinflussung des Tumorzellwachstums

Im Gegensatz zu den Untersuchung hinsichtlich der EGFR-Aktivität, die einen vergleichsweise kurzen Zeitrahmen abdecken, sollte die Modulation einer längerfristigen Wirkweise des HBE durch Verkapselung überprüft werden. Als Parameter wurde die wachstumshemmende Wirkung des HBE auf Tumorzellen gewählt. Diese wurde zuvor in zahlreichen Untersuchungen für Heidelbeer- und andere, anthocyanreiche Extrakte gezeigt. IC_{50} -Werte für diese Extrakte lagen in Abhängigkeit von Extraktzusammensetzung, der verwendeten Zelllinie und der Inkubationszeit zwischen 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ [Singletary *et al.*, 2003, Katsube *et al.*, 2003, Seeram *et al.*, 2004, Teller *et al.*, 2009b]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Wachstum von HT29-Zellen und der EGFR-Aktivität wurde vermutet [Marko *et al.*, 2004]. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt der Wachstumshemmung ebenfalls in diesem Zellmodell durchgeführt werden. Eine Standardmethode für die Erfassung der Wachstumshemmung stellt der Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) dar. In diesem Assay wird die Zellmenge mit dem Lebendprotein, das sich durch Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff SRB quantifizieren lässt, korreliert.

Unverkapselter HBE

Die wachstumshemmende Wirkung von Heidelbeerextrakt wurde bereits mehrfach bestimmt [Katsube *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2004, Teller *et al.*, 2009b], jedoch sollte die Wirkung des unverkapselten HBE als Referenz für nachfolgende Untersuchung der beladenen Kapselsysteme ermittelt werden. Dafür wurden HT29-Zellen mit HBE in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) und FKS (10 % (v/v)) in 24 Well-Platten für 72 h inkubiert.

Die Wachstumsunterdrückung der HT29-Zellen durch den unverkapselten HBE zeichnete sich bereits ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ ab (Abbildung 37). In Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ war die Unterdrückung statistisch signifikant und nahm konzentrationsabhängig bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ HBE zu (IC_{50} -Wert: $323 \pm 29 \mu\text{g/ml}$). Als Referenz für spätere Untersuchungen wurde die Unterdrückung durch 200 $\mu\text{g/ml}$ HBE auf $68 \pm 15 \%$ (T/C) herangezogen.

Dieses Ergebnis zeigte, dass der für die Studie verwendete, unverkapselte HBE in der Lage ist, das Wachstum von HT29-Zellen signifikant zu unterdrücken. Die beobachtete Wachstumshemmung lag in einem Bereich, der in anderen *in vitro*-Studien für vergleichbare Heidelbeerextrakte beobachtet wurde (Tabelle 15). Die Werte zwischen den verschiedenen Studien weichen jedoch deutlich von einander ab. So zeigten Zhao *et al.* [2004] für einen verhältnismäßig anthocyanarmen Extrakt der Firma Artemis eine Wachstumshemmung mit einem IC_{50} -Wert von $\sim 270 \mu\text{g/ml}$. Dabei konnte nach 72 h Inkubation kein Unterschied zwischen Tumor- und nichttransformierten Zellen festgestellt werden. Katsube *et al.* [2003] zeigten für einen selbst extrahierten, anthocyanreichen Extrakt mit einer hohen Konzentration (500 $\mu\text{g/ml}$) nach 48 h Inkubation dagegen nur marginale Verringerungen des Wachstums von HCT116 und HL60-Zellen (5 bzw. 38 % Verringerung). Kern *et al.* [2007] und Fridrich *et al.* [2007b] zeigten, dass das Wachstum von HT29-Zellen durch verschiedene Polyphenole in

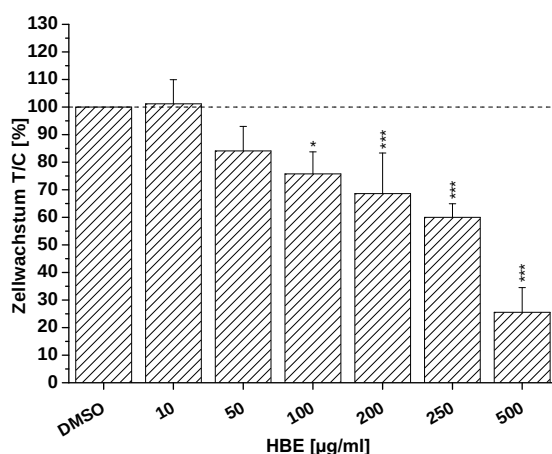


Abbildung 37: Modulation des Wachstums von HT29-Zellen durch unverkapselten HBE gemessen im SRB-Assay. Inkubation über 72 h in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase und 10 % (v/v) FKS. MW $\pm$ SD von vier unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Daten teilweise gezeigt in Eschbach [2009].

Gegenwart von Katalase deutlich schwächer gehemmt wird. Vor dem Hintergrund der H_2O_2 -Bildung durch den Polyphenolanteil der Extrakte, insbesondere in DMEM [Long *et al.*, 2000], ist daher fraglich, ob die Ergebnisse der zuvor genannten Studien direkt auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übertragen werden können.

Ein von Teller *et al.* [2009b] und Esselen *et al.* [2011b] untersuchter Heidelbeerextrakt (Indena, Tabelle 15) wies ein vergleichsweise gering wachstumshemmendes Potential auf. Diese Beobachtung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in diesen Studien Katalase verwendet wurde, um experimentelle Artefakte durch H_2O_2 -Bildung zu unterdrücken. Die in der vorliegenden Studie gewählten Bedingungen hinsichtlich Zelllinie, Inkubationszeit und Einsatz von Katalase stimmen mit den Bedingungen der Studie von Esselen *et al.* [2011b] überein. Der Heidelbeerextrakt von Symrise scheint somit hinsichtlich der wachstumshemmenden Wirkung im Vergleich zum Extrakt von Indena potenter zu sein (Tabelle 15).

Obwohl es sich bei den Heidelbeerextrakten aller zuvor genannten Studien um ethanolische Auszüge handelte, wichen die Anthocyangehalte deutlich voneinander ab. Der Extrakt, der in der Studie von Zhao *et al.* [2004] zu einer starken Unterdrückung des Wachstums von HT29-Zellen führte, bestand lediglich zu 9,2 % aus Anthocyanen. Im Gegensatz dazu besaßen die von Katsube *et al.* [2003], Teller *et al.* [2009b] und Esselen *et al.* [2011b] untersuchten Extrakte, die nur schwach wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzellen ausübten, Anthocyangehalte von 26–36 % und waren somit vergleichbar mit dem Extrakt der vorliegenden Untersuchung (28 %). Der Anthocyananteil der Extrakte scheint somit nur bedingt für die beobachtete Wachstumshemmung verantwortlich zu sein. Diese Feststellung soll in Abschnitt 4.3.5 näher beleuchtet werden.

Tabelle 15: Vergleich zellwachstumshemmender Potentiale von Heidelbeerextrakten (*Vaccinium myrtillus* L.) in unterschiedlichen Studien. Wachstumshemmung angegeben als IC_{50} oder Proliferationsverminderung nach Substanzbehandlung. Zelllinien: HT29, HCT116: Kolonkarzinomzellen; HL60: Promyelozytenleukämiezellen; A431: Vulvakarzinomzellen; NCM460: Nichttransformierte, immortalisierte Kolonzellen. Referenzen: a) Zhao *et al.* [2004]; b) Katsube *et al.* [2003]; c) Teller *et al.* [2009b]; d) Esselen *et al.* [2011b]; e) vorliegende Studie.

Extrakt	Anthocyan- gehalt	Zelllinie	Inkubations- zeit	Katalase	Wachstums- hemmung
Artemis	9,2 %	HT29	72 h	–	IC_{50} : $\sim 270 \mu\text{g/ml}$ ^a
Artemis	9,2 %	NCM460	72 h	–	IC_{50} : $\sim 270 \mu\text{g/ml}$ ^a
ethan. Extrakt	26,3 %	HL60	48 h	–	$500 \mu\text{g/ml}$: $\sim 38 \%$ ^b
ethan. Extrakt	26,3 %	HCT116	48 h	–	$500 \mu\text{g/ml}$: $\sim 5 \%$ ^b
Indena	36 %	A431	72 h	+	IC_{50} : $438 \pm 48 \mu\text{g/ml}$ ^c
Indena	36 %	HT29	72 h	+	$500 \mu\text{g/ml}$: $\sim 22 \%$ ^d
Symrise	28 %	HT29	72 h	+	IC_{50} : $323 \pm 29 \mu\text{g/ml}$ ^e

Extraktbeladene DMH

Die wachstumshemmende Wirkung von extraktbeladenen DMH (Abschnitt 2.6.3) wurde analog zur Wirkung des freien HBE im SRB-Assay untersucht. Die Inkubation mit der Emulsion erfolgte in drei unterschiedlichen Ansätzen über 24 und 72 h:

- Um die Wirkung der unbeladenen Emulsion zu untersuchen wurde mit extraktfreien DMH in aufsteigender Konzentration (0,5–10 % (w/v) im Zellkulturmedium) inkubiert.
- Die Wirkung der extraktbeladenen DMH (0,24 % (w/v) HBE) wurde durch Inkubation aufsteigender Konzentrationen der entsprechenden Emulsion untersucht. Die beladene Emulsion wurde ebenfalls in einem Bereich von 0,5–10 % (w/v) in das Testsystem eingebracht, wodurch sich ein HBE-Konzentrationsbereich von 12–240 $\mu\text{g/ml}$ ergab.
- Im dritten Ansatz wurde durch Kombination unbeladener und HBE-beladener DMH der Emulsionsanteil von 10 % über alle Versuche konstant gehalten, die HBE-Konzentration durch Ändern der Menge an beladener Emulsion jedoch von 12–240 $\mu\text{g/ml}$ variiert.

Die Inkubation mit unbeladener Referenzemulsion beeinflusste das Zellwachstum weder nach 24 noch nach 72 h signifikant. Lediglich in der höchsten Konzentration von 10 % (w/v) wurde das Zellwachstum nach 72 h signifikant auf $79 \pm 15 \%$ (T/C) verringert (Abbildung 38A und B). Im Gegensatz dazu wurde das Zellwachstum durch Inkubation mit HBE-beladener Emulsion sowie dem Emulsionsgemisch in ungefähr gleichem Maße gehemmt. Sowohl nach 24 wie auch 72 h wurde das Zellwachstum durch das Emulsionsgemisch signifikant auf 67 ± 18 bzw. $36 \pm 14 \%$ (T/C) verringert (240 $\mu\text{g/ml}$). Der IC_{50} -Wert für das Emulsionsgemisch beträgt nach 72 h Inkubation 105 $\mu\text{g/ml}$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HBE aus DMH in der Lage ist, das Zellwachstum von HT29-Zellen zu unterdrücken. Allerdings scheint sich das Kapselmateriale, wenngleich nur schwach, ebenfalls wachstumshemmend auszuwirken. Im Verlauf der Inkubation wurde ein „Aufrahmen“

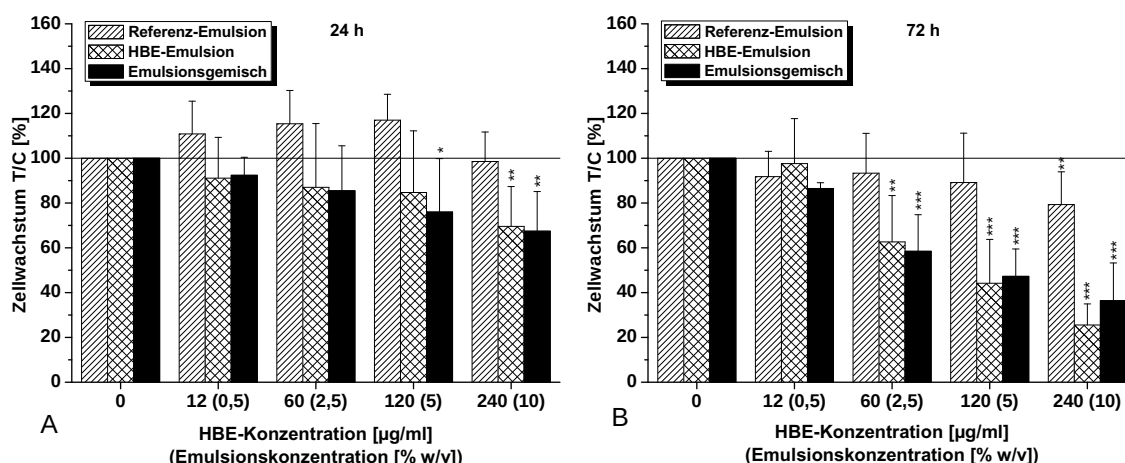


Abbildung 38: Wachstumshemmung durch HBE formuliert in DMH gemessen im SRB-Assay. HT29-Zellen wurden A) 24 h und B) 72 h mit verschiedenen Ansätzen inkubiert. Unbeladene (Referenzemulsion) und beladene (HBE-Emulsion) DMH wurden dem Zellkulturmedium in aufsteigenden Konzentrationen (0,5–10 % (w/v)) zugegeben, sodass HBE-Konzentrationen zwischen 12 und 240 µg/ml resultierten. Für das Emulsionsgemisch wurden unbeladene und HBE-beladene DMH so kombiniert, dass sich nach Einrühren in das Zellkulturmedium bei gleichbleibender Emulsionskonzentration (10 % (w/v)) HBE-Konzentrationen zwischen 12 und 240 µg/ml ergaben. MW ± SD von drei unabhängigen Experimenten. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Daten ebenfalls gezeigt in Krumböck [2010].

der Emulsion beobachtet. Möglicherweise führte diese Lipidschicht auf der Oberfläche des Zellkulturmediums zu einem verringerten Gasaustausch mit der Atmosphäre des Inkubators. Dieser Effekt könnte eine Verminderung der Zellproliferation als Folge haben. Ersichtlich wird dies bei der Inkubation mit unbeladenen DMH (Referenzemulsion) nach 72 h (Abbildung 38B).

In der Versuchsreihe mit „Emulsionsgemisch“ wurde, im Gegensatz zu den Versuchen mit ausschließlich beladenen DMH, die Negativkontrolle mit Referenzemulsion (unbeladen) behandelt. Der zytotoxische Effekt, der durch 10 % Referenzemulsion vermittelt wird (~20 % Verringerung des Wachstums), wirkt sich daher auf alle Proben aus und wird bei der Berechnung des relativen Wachstums ausgeglichen. Die wachstumshemmende Wirkung des HBE erscheint daher schwächer ausgeprägt (Abbildung 38B, rechte Säulen).

Die wachstumshemmende Wirkung des HBE aus DMH ist mit einem IC_{50} -Wert von 105 µg/ml stärker als die Wirkung des unverkapselten HBE ($IC_{50} = 323$ µg/ml). Für diese Beobachtung wären zwei verschiedene Ursachen denkbar:

- Wachstumshemmende Inhaltsstoffe des HBE werden im Kapselsystem stabilisiert, bevor sie mit einer langsamer Rate freigesetzt werden. Die Wirkstoffkonzentration ist somit über einen längeren Zeitraum im Inkubationsmedium stabil.
- Hilfsstoffe der Emulsion, beispielsweise Emulgatoren, beeinflussen die Wirkung wachstumshemmender HBE-Inhaltsstoffe, indem die Membranpermeabilität der Zellen gesenkt wird. So werden lipidbasierte Emulgatoren zur Transfektion in molekularbiologischen Untersuchung eingesetzt (Lipofektion) [Felgner *et al.*, 1987]. Die verstärkte Aufnahme bioaktiver HBE-Inhaltsstoffe könnte folglich in einer verstärkten Hemmung des Zellwachstums resultieren.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Langzeitwirkung des HBE auf das Zellwachstum durch Formulierung in DMH erhöht wird. Diese Daten stehen somit im Gegensatz zu den Ergebnissen hinsichtlich der EGFR-hemmenden Wirkung des HBE aus DMH, bei denen keine Unterdrückung der Rezeptoraktivität beobachtet wurde (Abschnitt 4.2.1). Diese Diskrepanz ist unter anderem auf die bereits erwähnte, langsame Freisetzung des HBE aus DMH, die zumindest für den Anthocyananteil von Frank [2012] gezeigt wurde, zurückzuführen.

Extraktbeladene MPK und PHK

Die wachstumshemmende Wirkung der HBE-beladenen MPK und PHK (Abschnitte 2.6.1 und 2.6.2) wurde nicht im SRB-Assay untersucht. Da im SRB-Assay die Zellmenge über die Proteinmenge quantifiziert wird, treten durch Inkubation mit Proteinpartikeln Artefakte auf. Über die Inkubationszeit von 72 h sanken diese Partikel auf den Zellrasen und wurden dort teilweise durch die Zellen mit dem Boden des Inkubationswells verankert. Ein vollständiges Abspülen der Partikel nach Beendigung der Inkubationszeit war somit nicht gewährleistet. Die Inkubation mit PHK war hingegen problematisch, da der Kapseldurchmesser von 1–3 mm keine Normalverteilung der Kapseln in 24 Wellplatten zuließ (pro Well konnten maximal ein bis drei Kapseln eingebracht werden, genaue Extraktkonzentrationen waren folglich nicht einstellbar).

Diese beiden Kapselsysteme wurden daher in Petrischalen ($d = 6\text{ cm}$) inkubiert und die Zellen nach Trypanblauanfärbung manuell ausgezählt. Als Kontrollen wurden der unverkapselte HBE und unbeladene Referenzkapseln (MPK und PHK) mitgeführt. Für die Berechnung des zellulären Wachstums wurden lebende Zellen normiert auf die Zellzahl der Lösemittel- (für unverkapselten HBE) bzw. Mediumkontrolle (für MPK und PHK). Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit DMH wurden unbeladene und HBE-beladene Kapseln nicht kombiniert, sondern ausschließlich getrennt, eingesetzt. Die Inkubation der HT29-Zellen erfolgte für 72 h in Gegenwart von FKS (10 % (v/v)) und Katalase (100 U/ml).

Die Inkubation der Zellen mit unverkapseltem HBE führte zu einer konzentrationsabhängigen Unterdrückung des Zellwachstums, die ab $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ signifikant wurde (Abbildung 39). In der höchsten untersuchten Konzentration von $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ wurde das Zellwachstum auf $31 \pm 9\%$ (T/C) verringert. Der IC_{50} -Wert wurde mit $305\text{ }\mu\text{g/ml}$ berechnet.

Die Inkubation mit HBE-beladenen MPK4 resultierte ebenfalls in einer konzentrationsabhängigen und signifikanten Unterdrückung des Zellwachstums. Während die Unterdrückung bei $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ MPK vergleichbar mit der Verringerung durch die entsprechende Konzentration an unverkapseltem HBE war, fiel die Wachstumshemmung bei $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ geringfügig schwächer aus. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Der IC_{50} -Wert für die HBE-beladenen MPK4 beträgt $376\text{ }\mu\text{g/ml}$. Die Inkubation mit unbeladenen Referenzkapseln in entsprechenden Konzentrationen hatte lediglich bei einer Hüllmaterialkonzentration, die $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ HBE-beladenen Kapseln entsprechen würde, einen schwach wachstumshemmenden Effekt. Dieser war jedoch ebenfalls nicht signifikant.

HBE-beladene PHK wurden bis zu einer Konzentration von $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ HBE untersucht.

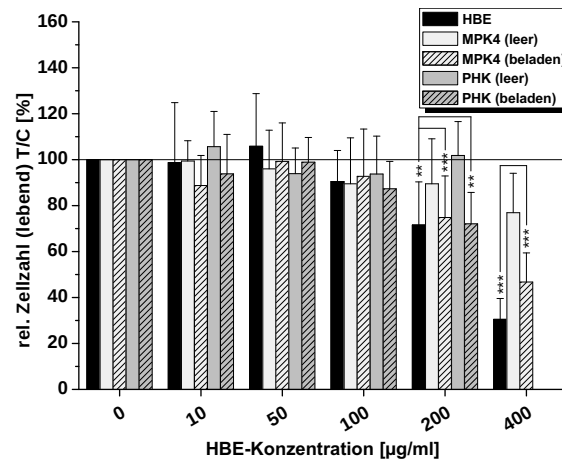


Abbildung 39: Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch den HBE in Molkenproteinkapseln (MPK) und Pektinamidhohlkapseln (PHK) ermittelt durch Trypanblauauszählung. Zellen wurden mit unverkapseltem HBE, HBE-beladenen und unbeladenen Kapseln für 72 h inkubiert. MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 bzw. 400 µg/ml): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

In dieser Konzentration erfolgte eine signifikante Wachstumshemmung auf $72 \pm 14\%$ (T/C). Die Hemmung unterschied sich bei dieser Konzentration nicht signifikant vom unverkapselten HBE ($72 \pm 19\%$ (T/C)). Die Inkubation mit unbeladenen PHK hatte keinen adversen Effekt zur Folge.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die biologische Wirksamkeit des HBE hinsichtlich der Wachstumshemmung durch Verkapselung in MPK und PHK nicht signifikant beeinflusst wird. Die Daten sind somit in Übereinstimmung mit der wachstumshemmenden Wirkung von HBE-beladenen DMH.

4.2.3 Potentiell adverse Effekte durch Topoisomerasegiftung

Die Hemmwirkung von Polyphenolen auf Topoisomerasen konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [Austin *et al.*, 1992, Constantinou *et al.*, 1995, López-Lázaro *et al.*, 2002, Bandele und Osheroﬀ, 2007]. Im Hinblick auf die Nutzung HBE-beladener Kapselsysteme könnte sich die Hemmung der Aktivität von Topoisomerasen aufgrund hoher lokaler Polyphenolkonzentrationen daher als anwendungslimitierend erweisen. Hinsichtlich einer Risiko/Nutzen-Analyse sollte daher untersucht werden, ob durch gesteigerte und zielgerichtete Verfügbarkeit der Extraktbestandteile intrazelluläre Konzentrationen auftreten, die zu Schäden der DNA führen. Am Modell der HT29-Zellen sollten dazu die unterschiedlich verkapselten Präparationen auf eine mögliche Interferenz mit humanen Topoisomerasen und die damit verbundene Beeinträchtigung der DNA-Integrität untersucht werden.

Die Wirkung des verkapselten HBE auf Topoisomerasen wurde in HT29-Zellen im ICE-Bioassay (*In vitro complex of enzyme*) untersucht. In diesem Assay wird die DNA/Topoisomeraseintermediat-stabilisierende Wirkung von Topoisomerasegiften im intakten Zellsystem erfasst. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurden freie Topoisomerasen und DNA/Topoisomeraseintermediate des Zelllysats mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen die Topoisomeraseformen I, II α bzw. II β detektiert. Der Anteil an DNA-gebundener Topoisomerase wurde im Vergleich zur Negativkontrolle betrachtet. Die Inkubation der Zellen erfolgte für eine Stunde in serumfreiem Medium in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml). Die spezifischen Topoisomerasegifte Camptothecin (CPT) und Etoposid (ETO) (Abschnitt 2.3.2) wurden als Positivkontrolle mitgeführt.

In Abbildung 40 sind repräsentative Membranen nach immunologischer Dektetion der verschiedenen Topoisomeraseisoformen in den Fraktionen des ICE-Bioassays nach Inkubation mit den verschiedenen Formulierungen gezeigt. Die Negativkontrolle (1% DMSO) wies ausschließlich freie Topoisomerasen auf (Topo I, II α und II β ; jeweils Fraktionen 15–20). Das Topoisomerase I-Gift CPT stabilisierte DNA/Topoisomerase I-Komplexe (Topo I; Fraktionen 5–14), ETO dagegen nur DNA/Topoisomerase II-Komplexe (Topo II α und II β ; jeweils Fraktionen 5–14). Der unverkapselte HBE sowie die HBE-beladenen Formulierungen (jeweils 200 μ g/ml) stabilisierten keine DNA/Topoisomerasekomplexe. Es wurden daher lediglich freie Topoisomerasen detektiert (Topo I, II α und II β ; jeweils Fraktionen 15–20).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der HBE im unverkapselten Zustand in einer Konzentration von 200 μ g/ml nicht als Topoisomerasegift im zellulären System wirkt. Die Daten sind daher in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus vorangegangenen Studien, in denen für ähnliche, anthocyanreiche Extrakte (Heidelbeeren und Trauben, jeweils bis 100 μ g/ml) keine topoisomerasegiftende Wirkung im ICE-Bioassay festgestellt wurde [Esselen *et al.*, 2011b]. Die lokale Konzentrationserhöhung durch Inkubation mit HBE in verschiedenen Kapselsystemen scheint den Einfluss der Extraktinhaltsstoffe nicht derart zu erhöhen, dass stabilisierende Wirkungen auf DNA/Topoisomeraseintermediate auftreten.

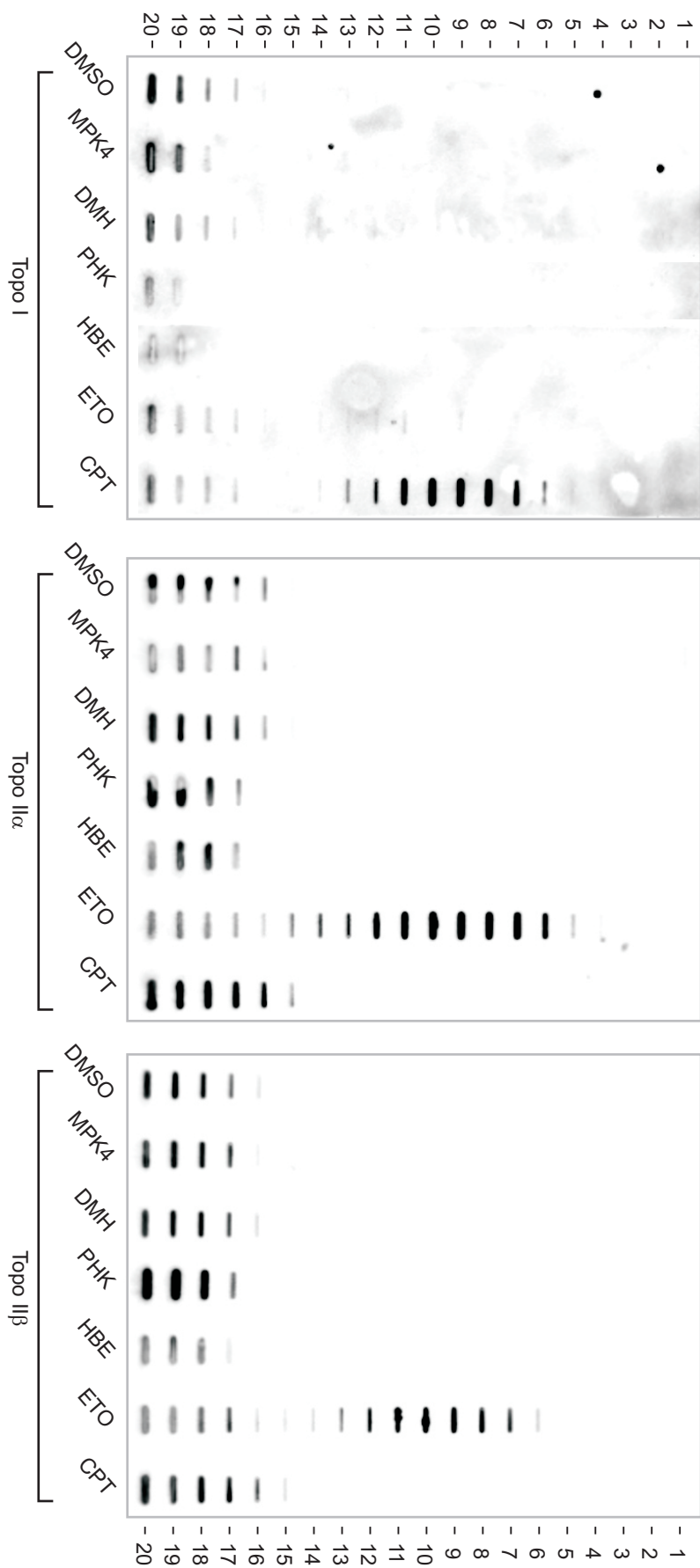


Abbildung 40: Topoisomerasegeftende Wirkung von HBE und HBE-beladenen MPK, PKH und DMH im ICE-Bioassay (*In vitro complex of enzyme*). HT29-Zellen wurden 1h serumfrei in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) inkubiert. Gezeigt sind repräsentative Blotbilder für die Topoisomerasen I, II α und II β aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. Freie Topoisomerasen: Fraktionen 15–20, DNA/Topoisomeraseaddukte: Fraktionen 5–14. Abkürzungen: CPT: Camptothecin; DMH: doppelstrahlungsinduzierte multidisperse Hüllkapseln; DMSO: Dimethylsulfoxid; ETO: Etoposid; MPK: molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln; PHK: pektinamidbasierte Hüllkapseln; Topo: Topoisomerase.

4.3 Bioaktivität ausgewählter HBE-Subfraktionen und isolierter Inhaltsstoffe

Anthocyanreichen Lebensmitteln konnten in mehreren epidemiologischen Studien protektive Wirkungen hinsichtlich Tumor- oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugeordnet werden [Rossi *et al.*, 2006, Bobe *et al.*, 2009, Mink *et al.*, 2007, Sesso *et al.*, 2007]. Gestützt werden diese Untersuchungen durch Ergebnisse aus humanen Interventionsstudien [Thomasset *et al.*, 2009a, Wang *et al.*, 2011, Duthie *et al.*, 2006] und *in vivo*-Tierversuchen [Singletary *et al.*, 2003, Cooke *et al.*, 2006]. In diesen Untersuchungen wurden meist anthocyanreiche Beerenextrakte eingesetzt. Mechanistische Untersuchungen der Wirkweise wurden sowohl an anthocyanreichen als auch an isolierten Anthocyanen und Anthocyanidinen durchgeführt. In vielen Studien konnte isolierten Anthocyanen, gegenüber den freien Aglyca, keine oder nur eine niedrige biologische Wirksamkeit zugeordnet werden [Katsube *et al.*, 2003, Meiers *et al.*, 2001]. Dennoch wurde die biologische *in vitro*-Wirkung anthocyanreicher Extrakte häufig dem Anthocyananteil zugeschrieben [Seeram *et al.*, 2001, Zhao *et al.*, 2004, Teller *et al.*, 2009b].

Aufgrund vorangegangener Ergebnisse (Abschnitt 4.2.1) wurde die Frage aufgeworfen, inwiefern der Anthocyananteil des HBE für die biologische Wirkung des unverkapselten HBE verantwortlich ist. Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit sollen die EGFR-hemmende und zellwachstumsunterdrückende Wirkung des unverkapselten HBE isolierten Bestandteilen bzw. Subfraktionen zugeordnet werden.

4.3.1 Cyanidin und Cy-3-glc

Mit 34,1 % (w/w) stellen Delphinidinglycoside den größten Anteil der HBE-Anthocyane dar. Das Aglycon Delphinidin wurde bereits von Fridrich *et al.* [2008b] und Teller *et al.* [2009a] hinsichtlich seiner EGFR-hemmenden Wirkung untersucht. Zur Ergänzung dieser Daten wurde in der vorliegenden Arbeit das Aglycon Cyanidin als Referenz mitgeführt. Cyanidinglycoside machten mit 27,5 % (w/w) die zweitgrößte Gruppe der Anthocyane des HBE aus. Das Anthocyan Cy-3-glc stellt mit einem Anteil von 13,0 % nach Del-3-glc (14,6 %) das zweithäufigste Anthocyan des Extrakts dar.

Mittels Western Blot Analyse sollte eine vergleichende Untersuchung von Cyanidin und Cy-3-glc hinsichtlich der EGFR-hemmenden Aktivität durchgeführt werden. Wie in den Untersuchungen in Zusammenhang mit HBE und den Kapselsystemen, wurden HT29-Zellen 45 min serumfrei und in Anwesenheit von Katalase (100 µg/ml) mit aufsteigenden Substanzkonzentrationen inkubiert. Die EGFR-Aktivität wurde über die Rezeptorphosphorylierung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) ermittelt.

Cyanidin unterdrückte die EGFR-Aktivität in HT29-Zellen nach 45 min Inkubation signifikant und konzentrationsabhängig ab einer Konzentration von 100 µM (Abbildung 41A). Die stärkste Hemmung der Rezeptoraktivität auf 70 ± 18 % (T/C) wurde bei 200 µM beobachtet. Der IC_{50} -Wert wurde bis zu einer Substanzkonzentration von jeweils 200 µM nicht erreicht. Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Inkubation mit Cyanidin nicht

signifikant moduliert. Cy-3-glc hatte im Gegensatz zu Cyanidin bis zu einer Konzentration von 200 μM keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivität (Abbildung 41B).

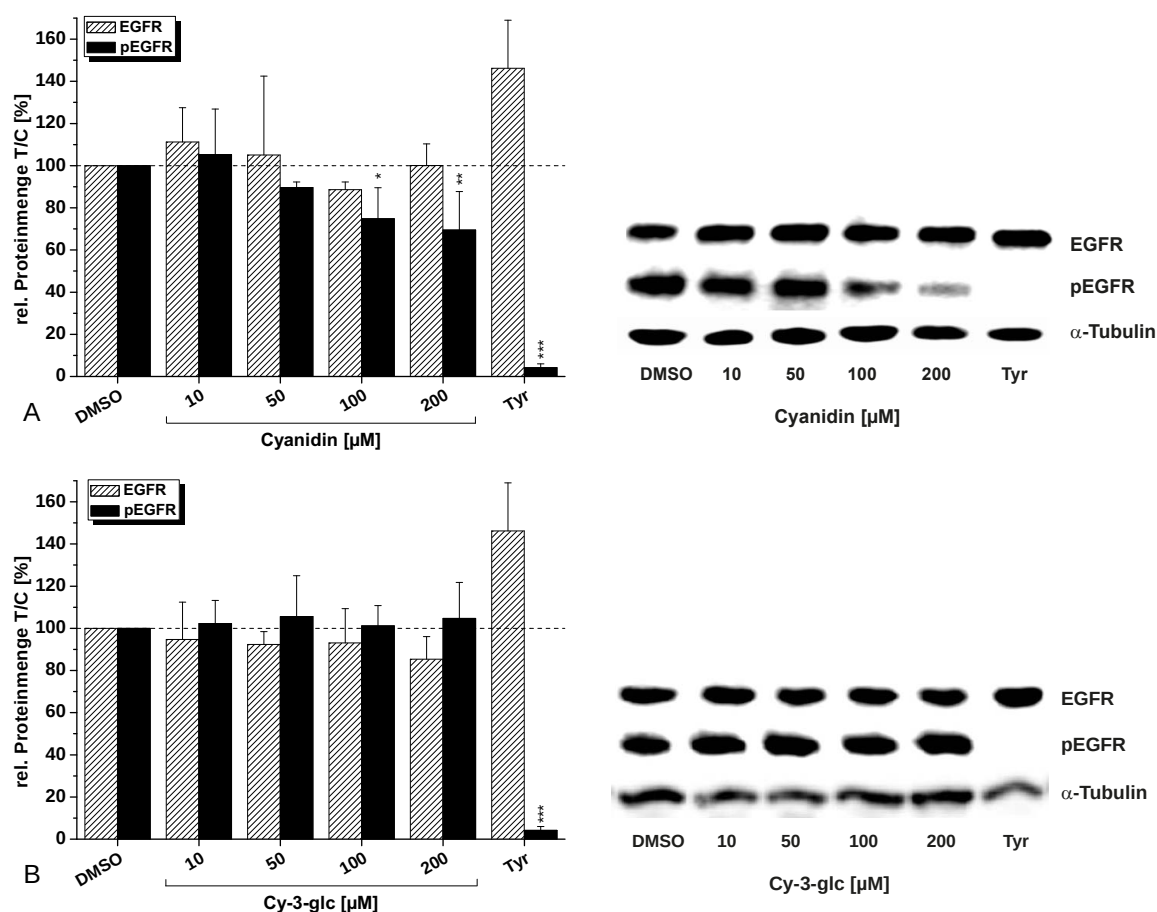


Abbildung 41: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch A) Cyanidin und B) Cy-3-glc, ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 1 μM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW $\pm$ SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Blotbild. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben.

Die Untersuchungen in HT29-Zellen sollten als Modell für die Kolonkanzerogenese dienen. Obgleich der EGFR-vermittelte MAPK-Signalweg in HT29-Zellen aktiv ist, wird der Rezeptor vergleichsweise schwach exprimiert [Xu *et al.*, 2005]. Das EGFR-Signalling in den Vulvakarzinomzellen A431 ist durch die starke Überexpression des Rezeptors entartet [Kim *et al.*, 2005b]. Exemplarisch sollte daher untersucht werden, ob sich der Einfluss von Cyanidin und Cy-3-glc hinsichtlich der EGFR-hemmenden Wirkung in diesen Zellen unterscheidet. Die Inkubationen fanden analog zu den Inkubationen in HT29-Zellen statt.

Nach 45 min Inkubation mit Cyanidin wurde die EGFR-Aktivität in A431-Zellen signifikant und konzentrationsabhängig auf $50 \pm 26\%$ (T/C) unterdrückt (Abbildung 42A). Tyrphostin AG 1478 unterdrückte die Aktivität des Rezeptors auf einen Wert von 2 % (T/C) fast vollständig. Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde weder durch die Inkubation mit

Cyanidin noch durch Tyrphostin AG 1478 beeinflusst. Die EGFR-Aktivität sowie die endogene Rezeptormenge unterlag nach Inkubation mit Cy-3-glc Schwankungen, wurde jedoch nicht signifikant moduliert (Abbildung 42B).

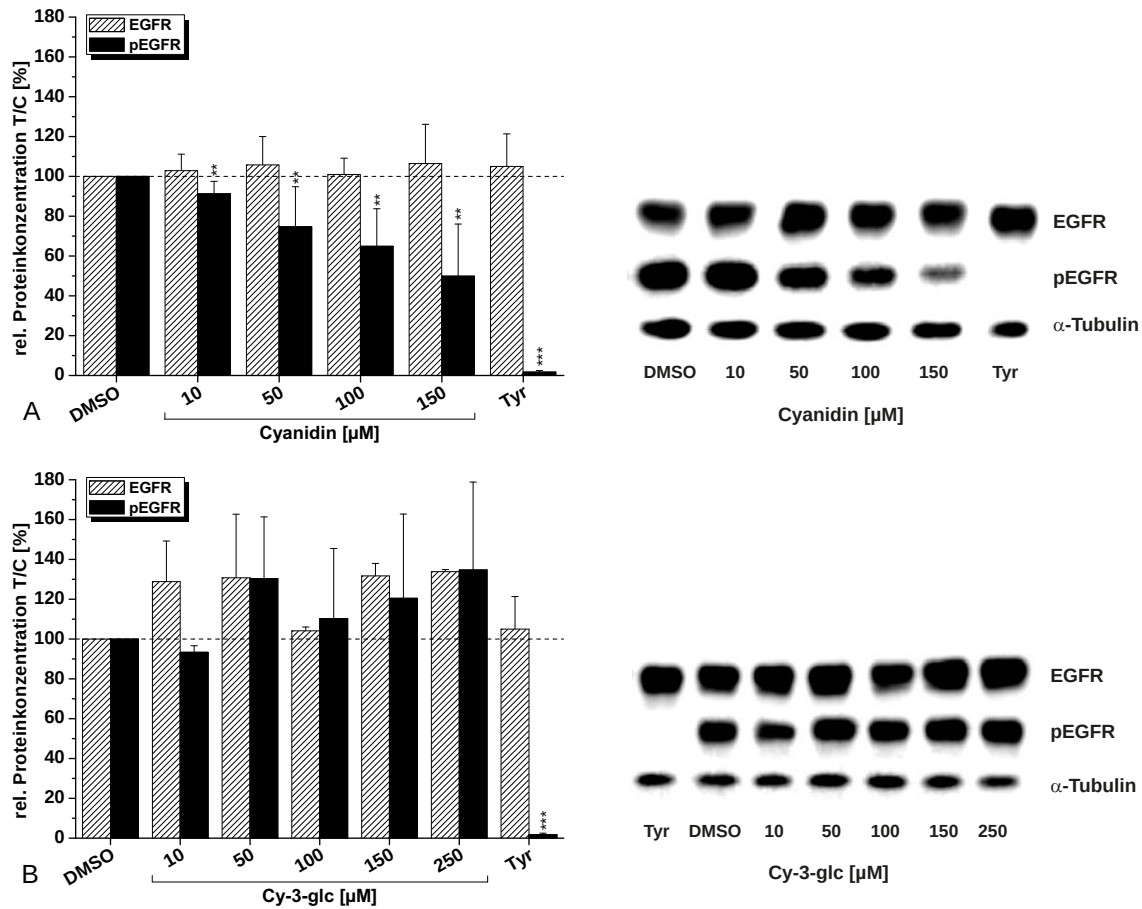


Abbildung 42: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in A431-Vulvakarzinomzellen durch A) Cyanidin und B) Cy-3-glc, ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 1 μM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW $\pm$ SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Blotbild.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Cyanidin einen Hemmstoff für den EGFR im zellulären System darstellt. Die Hemmwirkung für Delphinidin wurde von Fridrich *et al.* [2008b] mit IC_{50} -Werten von $54 \pm 11 \mu\text{M}$ (HT29-Zellen) bzw. $71 \pm 31 \mu\text{M}$ (A431-Zellen) berechnet. Beide Untersuchungen wurden jedoch ohne Katalase durchgeführt. Teller *et al.* [2009a] bestimmten in A431-Zellen in Anwesenheit von Katalase einen niedrigeren IC_{50} -Wert von $33 \pm 14 \mu\text{M}$. Damit scheint Cyanidin im zellulären System einen schwächer hemmenden Effekt im Vergleich zu Delphinidin auf den EGFR zu besitzen. Im zellfreien System (ELISA) hingegen waren beide Anthocyane ähnlich potent [Marko *et al.*, 2004]. Im Gegensatz dazu konnten Marko *et al.* [2004] für die methoxylierten Anthocyanidine Malvidin und Peonidin im zellfreien System (ELISA) nur eine sehr schwache EGFR-Hemmwirkung aufzeigen. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wies Malvidin im zellulären System (A431-Zellen) bis zu einer

Konzentration von 100 μM keine Hemmwirkung auf [Fridrich *et al.*, 2008b].

Cyanidin übte in der vorliegenden Untersuchung in A431-Zellen eine höhere Hemmwirkung als in HT29-Zellen auf den EGFR aus (Vergl. Abbildungen 41A und 42A). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Kim *et al.* [2005b]: Sie zeigten, dass sich die EGFR-überexprimierenden A431-Zellen gegenüber dem spezifischen EGFR-Hemmstoff Erlotinib deutlich sensibler verhielten als EGFR-normalexprimierende Zellen. In den zuvor genannten Untersuchungen von Fridrich *et al.* [2008b] wurde die Autophosphorylierung des EGFR durch das Anthocyanidin Delphinidin (50–100 μM) jedoch in den beiden Zelllinien HT29 und A431 in ähnlichem Ausmaß gehemmt (IC_{50} : 54 ± 11 bzw. $71 \pm 31 \mu\text{M}$).

Das Anthocyan Cy-3-glc übte bis 200 μM im Gegensatz zum Aglycon Cyanidin in beiden untersuchten Zellsystemen keine Hemmwirkung auf den EGFR aus. Polyphenolglycoside werden von Zellen grundsätzlich schlechter aufgenommen als die entsprechenden Aglyca. Diese Beobachtung ist auf die höhere Polarität der glycosidischen Verbindungen zurückzuführen [Spencer *et al.*, 2004]. Darüber hinaus konnten Meiers *et al.* [2001] im zellfreien Assay (ELISA) für Cy-3-gal im Gegensatz zu Cyanidin keine Hemmwirkung auf den EGFR nachweisen. Somit dürfte im zellulären System nicht nur die schlechtere zelluläre Aufnahme für das Ausbleiben der Bioaktivität verantwortlich sein, sondern zusätzlich das Fehlen der eigentlichen Hemmwirkung. Um die EGFR-Hemmwirkung der Anthocyane im zellulären System abschließend zu beurteilen, müssen weitere Untersuchungen mit Delphinidinglycosiden durchgeführt werden. Da Delphinidin im zellulären System eine deutlich höhere EGFR-Hemmwirkung als Cyanidin aufwies [Teller *et al.*, 2009a], könnten auch dessen Glycoside eine hemmende Wirkung besitzen. Delphinidinglycoside wurden bislang weder im zellulären noch im zellfreien System untersucht.

Weiterhin müssen synergistische Effekte zwischen verschiedenen Anthocyanen in polyphenolreichen Extrakten in Betracht gezogen werden. Rahman *et al.* [2006] untersuchten die superoxidradikalfangenden Eigenschaft von Anthocyanen aus Heidelbeeren. Dabei war die Summe der Aktivitäten der einzelnen Anthocyane kleiner, als die Wirkung des komplexen Extrakts. Durch Rekonstitution der Anthocyanzusammensetzung erreichten sie jedoch die Aktivität des nativen Extrakts. Somit bestünde die Möglichkeit, dass isolierte Anthocyane auch auf andere biologische Endpunkte keine oder lediglich geringe EGFR-Hemmwirkung aufweisen. Im komplexen Gemisch könnte sich ihre Aktivität hingegen potenzieren und die Gesamtaktivität wäre größer als die Summe der Einzelaktivitäten. Die Hemmwirkung einer hochaufgereinigten Anthocyanfraktion wurde daher im anschließenden Abschnitt untersucht, um die biologische Wirkung des komplexen Anthocyangemisches zu erfassen.

4.3.2 HBE-Subfraktionen

Um die biologische Wirksamkeit des HBE bestimmten Inhaltsstoffen zuordnen zu können, wurde der untersuchte HBE von der Arbeitsgruppe Winterhalter (Technische Universität Braunschweig, Institut für Lebensmittelchemie) in Subfraktionen aufgeteilt.

Subfraktionierung

Für die Separation der HBE-Inhaltsstoffe wurde von Juadjur und Winterhalter [2012] eine neue Methode entwickelt, die mittels adsorptiver Membranchromatographie erlaubt, Anthocyane spezifisch von weiteren Inhaltsstoffen abzutrennen. Beim verwendeten Membransystem handelte es sich um einen sauren Kationenaustauscher (Sartobind® S, Sartorius). Die Adsorption der Anthocyane an die Membran und die Elution der Nichtanthocyane fand im Säuren (5 % (v/v) Essigsäure) statt. Der Anthocyananteil wurde im Neutralen (1 M NaCl) eluiert. Anschließend wurde die Anthocyanlösung zur Stabilisierung angesäuert (1 % (v/v) Essigsäure), säulenchromatographisch von NaCl befreit und lyophilisiert. Die resultierenden Fraktionen wurden als anthocyanhaltige (AF) und anthocyanfreie Subfraktion (FF) bezeichnet.

FF wurde im Anschluss durch repetitive Lösemittlextraktion ($4 \times$) zwischen Essigsäureethylester und Wasser/Methanol (4:1) in die Kopigment- (CF) und Polymerfraktion (PF) aufgetrennt. CF wurde im Anschluss nochmals mittels Lösemittlextraktion ($4 \times$) zwischen Essigsäureethylester und Wasser in eine polare (CFp) und eine unpolare Subfraktion (CFu) unterteilt. Ein Flussdiagramm der Subfraktionierung ist in Abbildung 43 dargestellt. Die mittels HPLC-DAD-Analyse quantifizierten Inhaltsstoffe des HBE und der Subfraktionen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

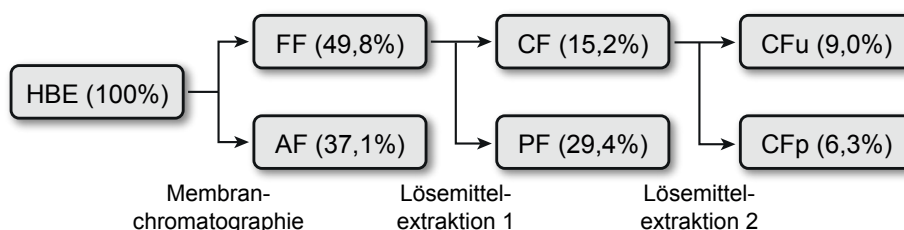


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Subfraktionierung des HBE. Lösemittlextraktion 1: Essigsäureethylester gegen Wasser/Methanol (4:1); Lösemittlextraktion 2: Essigsäureethylester gegen Wasser. Abkürzungen: AF: anthocyanhaltige Subfraktion; FF: anthocyanabgereicherte Subfraktion; HBE: Heidelbeerextrakt; PF: Polymerfraktion; CF: Kopigmentfraktion; CFu: unpolare Kopigmentfraktion; CFp: polare Kopigmentfraktion. Modifiziert nach Juadjur und Winterhalter [2012].

Die Nomenklatur der Subfraktionen wurde der Publikation von Juadjur und Winterhalter [2012] entnommen. Bei Kopigmenten handelt es sich um Substanzen, die die Farbwirkung von Anthocyanen beeinflussen [Asen *et al.*, 1972]. In der vorliegenden Arbeit sind darunter alle ungeladenen Polyphenole des HBE zu verstehen. Der Begriff Polymere wurde der Publikation von Gu *et al.* [2002] entlehnt. In dieser Arbeit wird mit „Polymeren“ ein nicht exakt definiertes Konglomerat an polymeren Proanthocyanidinen, die in der HPLC-DAD-Analyse von Juadjur und Winterhalter [2012] als „polymer hump“ zwischen 55 und 70 min detektiert werden, bezeichnet.

Die HBE-Subfraktionen wurden in vergleichenden Untersuchungen mit dem nativen HBE hinsichtlich des EGFR- und wachstumshemmenden Potentials untersucht. Um die biologische Wirkung der Subfraktionen mit dem nativen HBE vergleichen zu können, wurde für diese

Tabelle 16: Inhaltsstoffe des HBE und dessen Subfraktionen, quantifiziert mittels HPLC-DAD-Analyse. Die Werte sind sowohl als Massenanteil [% (w/w)] als auch als Stoffmengenkonzentration [μM], die durch Lösen einer Äquivalenzkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auftreten, angegeben. Abkürzungen: AF: anthocyanhaltige Subfraktion; FF: anthocyanfreie Subfraktion; HBE: Heidelbeereextrakt; PF: Polymerfraktion; CF: Kopigmentfraktion; CFp: polare Kopigmentfraktion; CFu: unpolare Kopigmentfraktion; n. m.: nicht messbar aufgrund von Koelution mit Anthocyanen; n. d.: nicht detektierbar (Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze).
a) Cy-3-glc-Äquivalente ($\lambda = 520 \text{ nm}$); b) Que-3-glc-Äquivalente ($\lambda = 351 \text{ nm}$); c) Gallussäureäquivalente ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

	[% (w/w)]/[μM]	HBE	AF	FF	PF	CF	CFp	CFu
Anthocyangehalt ^a	gesamt	27,6/113,9	70,9/108,4	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Anthocyanidine								
Delphinidin	n. m.	0,35/0,86	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Cyanidin	n. m.	0,29/0,75	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Petunidin	0,09/0,51	0,15/0,32	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Peonidin	0,03/0,2	0,05/0,12	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Malvidin	0,06/0,33	0,13/0,26	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Chlorogensäure	1,10/6,21	n. d.	1,34/3,77	n. d.	2,68/2,30	5,82/2,07	0,48/0,24	
Flavonole ^b								
Quercetin	0,28/1,85	n. d.	1,62/5,34	n. d.	4,97/5,01	0,44/0,18	8,15/4,83	
Quer-3-gal	0,34/1,46	n. d.	0,23/0,49	n. d.	0,31/0,20	0,47/0,13	0,19/0,07	
Quer-3-glc	0,41/1,71	n. d.	0,57/1,19	n. d.	1,52/0,97	3,19/0,84	0,36/0,13	
Quer-3-arab	0,12/0,55	n. d.	n. m.	n. d.	0,12/0,08	0,28/0,08	n. d.	
Quer-3-rham	0,12/0,53	n. d.	n. m.	n. d.	0,08/0,05	0,19/0,05	n. d.	
Myricetin	0,15/0,94	n. d.	0,48/1,50	n. d.	2,13/2,04	0,32/0,13	3,39/1,92	
Phenolcarbon-säuren ^c								
Gallussäure	0,15/1,76	n. d.	0,32/1,87	n. d.	0,63/1,13	1,24/0,92	0,20/0,21	
Protocatechu-säure	0,21/2,73	n. d.	0,42/2,72	n. d.	1,15/2,27	0,80/0,65	1,39/1,62	
5-Hydroxy-vanillinsäure	0,05/0,54	n. d.	0,34/0,81	n. d.	0,15/0,56	0,35/0,24	0,33/0,32	
Vanillinsäure	n. m.	n. d.	0,39/0,83	n. d.	0,14/0,71	0,24/0,18	0,50/0,53	
Syringasäure	n. m.	n. d.	0,27/0,55	n. d.	0,11/0,42	0,18/0,11	0,35/0,32	
Hydroxyzimtsäuren ^c								
Kaffeesäure	n. m.	n. d.	0,23	n. d.	0,46	0,15	0,67	
p-Cumarsäure	n. m.	n. d.	0,42	n. d.	1,29	0,26	2,02	
sonstige ^c								
Depsid	0,01	n. d.	0,10	n. d.	0,19	0,19	0,20	
Cumaryl-iridoid	0,13	n. d.	0,08	n. d.	0,06	0,15	n. d.	
Cumarsäure-derivat	0,05	n. d.	0,09	n. d.	0,13	0,31	n. d.	

Konzentrationen gewählt, die aus Inkubation mit bestimmten HBE-Konzentrationen resultieren würden. Diese Konzentrationen werden im Folgenden als Äquivalenzkonzentrationen bezeichnet. Die Effekte auf die Rezeptorphosphorylierung können so direkt im Kontext des HBE diskutiert werden. Eine Gegenüberstellung der Äquivalenzkonzentrationen und den entsprechenden Realkonzentrationen ist in Tabelle 17 für die unterschiedlichen Subfraktionen aufgeführt.

Tabelle 17: Realkonzentrationen der HBE-Subfraktionen nach Inkubation mit den Äquivalenzkonzentrationen (ÄK) 100 und 200 µg/ml. AF: anthocyanhaltige Subfraktion; FF: anthocyanfreie Subfraktion; PF: Polymerfraktion; CF: Kopigmentfraktion; CFp: polare Kopigmentfraktion; CFu: unpolare Kopigmentfraktion.

	Anteil an HBE	Realkonzentration (RK)	
		ÄK 100 µg/ml	ÄK 200 µg/ml
AF	37,1 %	37,1 µg/ml	74,2 µg/ml
FF	49,8 %	49,8 µg/ml	99,6 µg/ml
PF	29,4 %	29,4 µg/ml	58,8 µg/ml
CF	15,2 %	15,2 µg/ml	30,4 µg/ml
CFp	6,3 %	6,3 µg/ml	12,6 µg/ml
CFu	9 %	9 µg/ml	18 µg/ml

4.3.3 Einfluss auf die EGFR-Aktivität

Die EGFR-Hemmwirkung der Subfraktionen wurde wie zuvor in HT29-Zellen nach 45 min Inkubation in serumfreien Medium und in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) untersucht. Tyrphostin AG 1478 (1 µM) und HBE (200 µg/ml) wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Unterschiede zur Negativkontrolle (1 % DMSO) wurden statistisch mit dem Student's *t*-Test in Bezug zur Lösemittelkontrolle ausgewertet. Darüber hinaus wurde ebenfalls mit dem Student's *t*-Test berechnet, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Wirkungen der Subfraktionen (200 µg/ml Äquivalenzkonzentration) und des nativen HBE (200 µg/ml Realkonzentration) vorlagen.

Anthocyanhaltige Fraktion (AF)

Die Inkubation mit AF übte bis zu einer Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml ($\cong$ 74,2 µg/ml Realkonzentration) keinen signifikanten Einfluss auf die EGFR-Phosphorylierung (Abbildung 44A) aus. Die Rezeptoraktivität wurde auf max. 83 ± 21 % (T/C) gesenkt. Gegenüber der Positivkontrolle (200 µg/ml HBE), die eine Verringerung der Rezeptoraktivität auf 45 ± 14 % (T/C) zur Folge hatte, bestand ein signifikanter Unterschied. In hohen Konzentrationen (200 µg/ml Realkonzentration) konnte zwar eine Unterdrückung der EGFR-Aktivität auf 62 ± 27 % (T/C) beobachtet werden, der Unterschied zur Negativkontrolle war jedoch nicht signifikant.

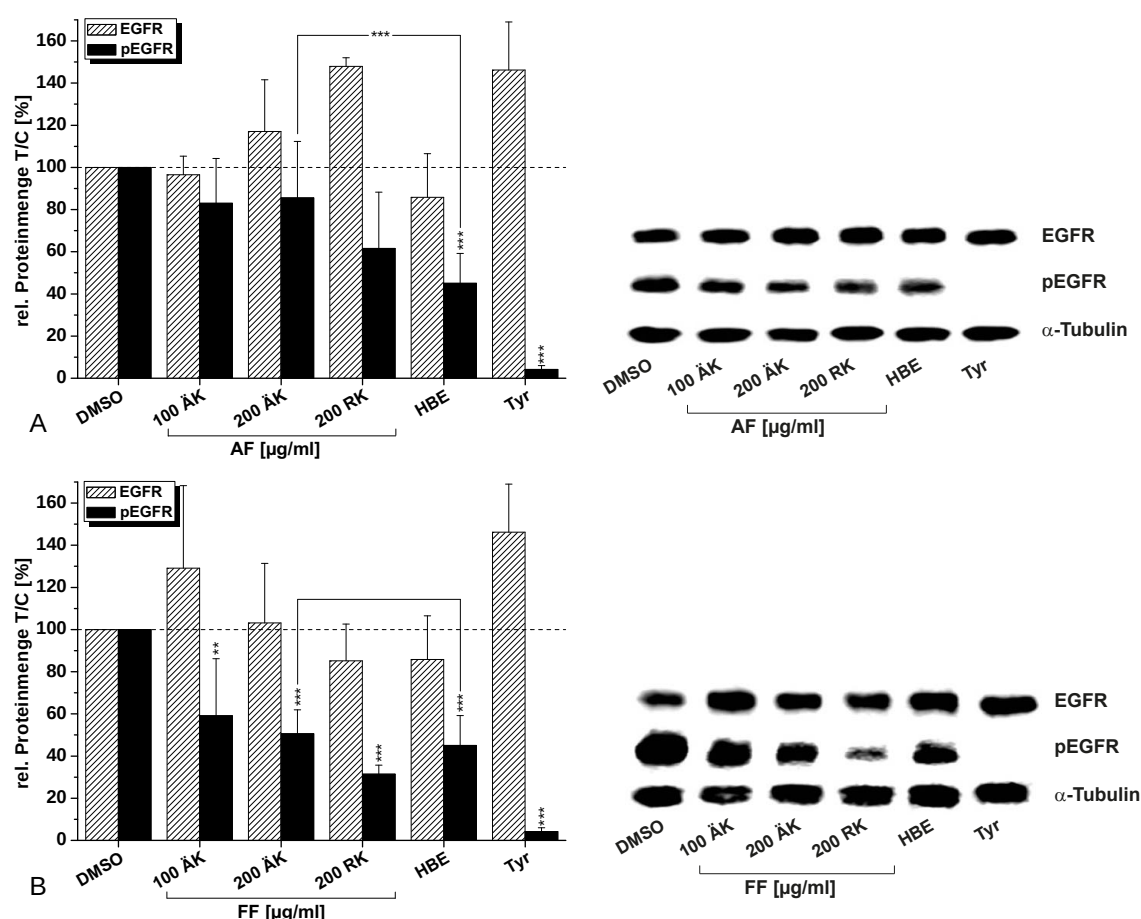


Abbildung 44: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch die A) anthocyanreiche (AF) und B) anthocyanfreie HBE-Subfraktion (FF), ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 200 µg/ml HBE und 1 µM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW ± SD von vier bis acht unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 µg/ml): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet ist ein repräsentatives Blotbild. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben. ÄK: Äquivalenzkonzentration; HBE: Heidelbeerextrakt; RK: Realkonzentration.

Diese Daten zeigen, dass der Anthocyananteil lediglich einen geringen Beitrag zur EGFR-Hemmwirkung des HBE bei 200 µg/ml leistet. In hoher Konzentration von AF (200 µg/ml Realkonzentration), die bei Inkubation der ~2–3-fachen Menge an HBE (539 µg/ml Realkonzentration) auftreten würde, konnte die Rezeptoraktivität allerdings verringert werden.

Anthocyanfreie Fraktion (FF)

FF enthielt alle löslichen Substanzen des HBE mit Ausnahme der Anthocyane. Der Großteil der darin charakterisierten Verbindungen setzte sich aus Polyphenolen zusammen. Die Inkubation mit FF führte bereits ab einer Äquivalenzkonzentration von 100 µg/ml ($\hat{=}$ 49,8 µg/ml Realkonzentration) zu einer signifikanten Verringerung der EGFR-Aktivität in HT29-Zellen (Abbildung 44B). In der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml ($\hat{=}$ 99,6 µg/ml Realkonzentration) wurde die EGFR-Aktivität signifikant auf $50,6 \pm 11$ % (T/C) verringert.

Ein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle HBE ($45 \pm 14\%$ (T/C)) konnte nicht festgestellt werden. Nach Inkubation mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Realkonzentration FF, die aus einer Inkubation mit 402 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HBE resultieren würde, reduzierte sich die EGFR-Aktivität auf einen Wert von $31 \pm 4\%$ (T/C). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Substanzinkubation nicht beeinflusst (Abbildung 44B).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die EGFR-Hemmwirkung (Inkubation mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HBE) hauptsächlich auf den anthocyanfreien Anteil des Extrakts zurückzuführen ist und nicht auf die enthaltenen Anthocyane. In FF sind eine Reihe an bioaktiven Verbindungen wie Quercetin, Chlorogensäure (Abbildung 45A und B) und polymere Proanthocyanidine enthalten, für die zuvor eine EGFR-hemmende Wirkung sowohl am isolierten Rezeptor als auch im zellulären System nachgewiesen werden konnte [Bhatia *et al.*, 2001, Fridrich *et al.*, 2007b, 2008b].

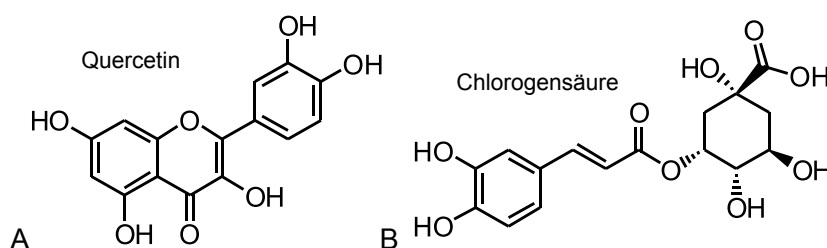


Abbildung 45: Strukturformeln der Polyphenole A) Quercetin und B) Chlorogensäure.

Polymerfraktion (PF)

Um die EGFR-Hemmwirkung von FF bestimmten Substanzgruppen zuordnen zu können, wurde diese Subfraktion mittels Lösemittelfraktionierung weiter unterteilt. PF enthält lösliche, höhermolekulare Verbindungen, insbesondere polymere Proanthocyanidine, zu denen Procyanidine und Prodelphinidine zählen [Hellström *et al.*, 2009]. FF unterdrückte in der Äquivalenzkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\cong 58,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ Realkonzentration) die EGFR-Aktivität signifikant auf $88 \pm 10\%$ (T/C) (Abbildung 46A). Der Unterschied zum unverkapselten HBE (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) war signifikant. In der Realkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\cong 680 \mu\text{g}/\text{ml}$ Äquivalenzkonzentration) erfolgte jedoch eine potente Verringerung der Rezeptoraktivität auf $56 \pm 4\%$ (T/C)). Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Inkubation mit PF nicht signifikant beeinflusst.

Kopigmentfraktion (CF)

Die zweite Subfraktion, die durch Auftrennung von FF erhalten wurde, ist die Kopigmentfraktion (CF). Sie enthielt vorwiegend monomere Polyphenole. Die Inkubation mit einer Äquivalenzkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CF ($\cong 30,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ Realkonzentration) über 45 min beeinflusste die EGFR-Aktivität in HT29-Zellen nicht signifikant (Abbildung 46B). Die Inkubation mit einer Realkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führte jedoch zu einer signifikanten

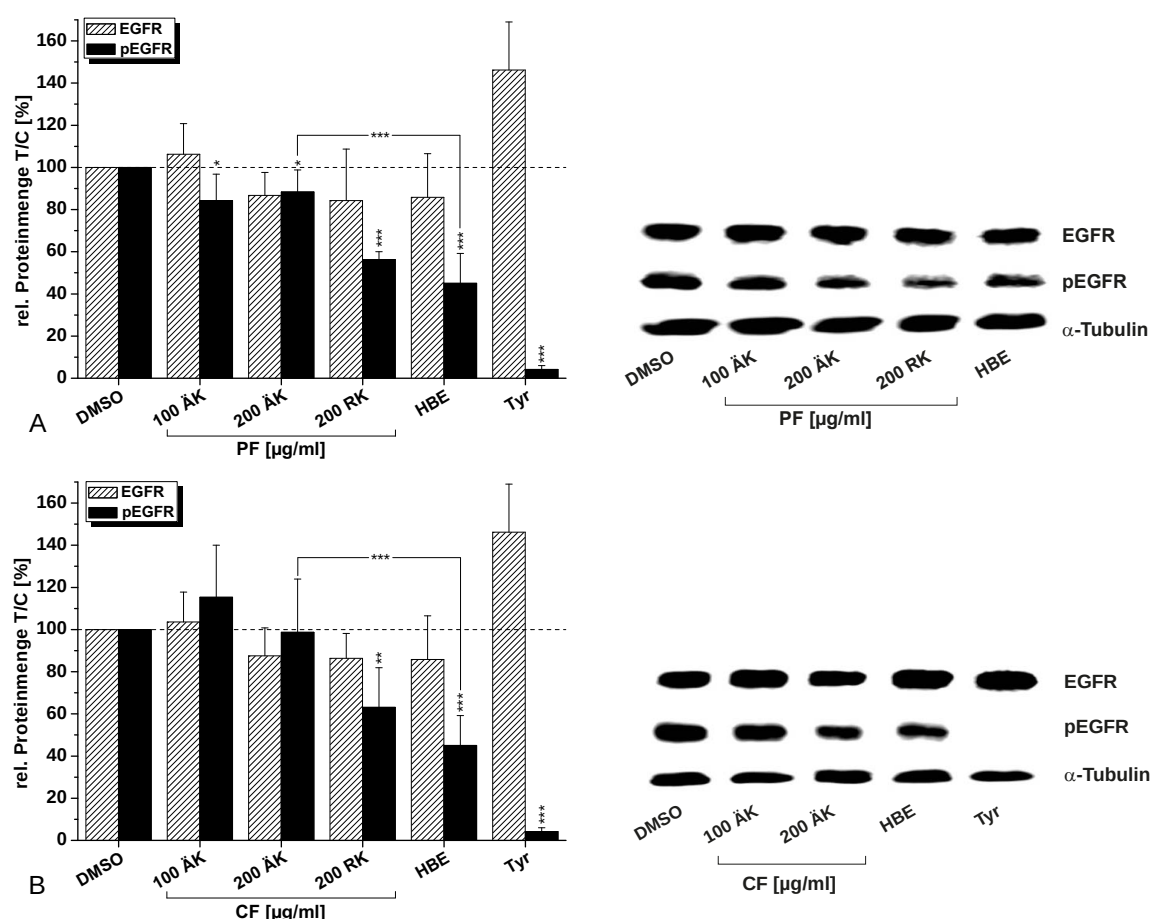


Abbildung 46: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch die A) Polymer- (PF) und B) Kopigmentfraktion (CF), ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 200 µg/ml HBE und 1 µM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW ± SD von drei bis acht unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 µg/ml): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Blotbild. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben. ÄK: Äquivalenzkonzentration; RK: Realkonzentration.

Unterdrückung der Rezeptoraktivität auf einen Wert von $63 \pm 19\%$ (T/C). Da der Anteil von CF an HBE mit 15,24 % vergleichsweise klein ist, würde diese Realkonzentration von 200 µg/ml einer HBE-Konzentration von 1312 µg/ml entsprechen und somit nur nach Inkubation mit sehr hohen Extraktmengen auftreten. Konzentrationen dieser Höhe wären auch nach Verzehr großer Mengen anthocyanreicher Früchte im GIT nicht zu erwarten.

CF enthält, wie die übergeordnete Fraktion FF, monomere Polyphenole wie Quercetin, Phenolcarbonsäuren und Chlorogensäure. In dieser Subfraktion sind, aufgrund ihrer Polarität, vermutlich auch di- und trimere Proanthocyanidine des HBE enthalten. Insbesondere Quercetin und niedermolekulare Proanthocyanidine wurden für die EGFR-hemmende Wirkung der übergeordneten FF verantwortlich gemacht. CF, die somit die Substanzen mit der bislang ausgeprägtesten Bioaktivität enthält, stellte sich in der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml jedoch als unwirksam heraus.

Polare und unpolare Kopigmentfraktion (CFp und CFu)

CF besaß lediglich die in sehr hoher Konzentration einen Einfluss auf die Rezeptoraktivität, wobei in der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml keine biologische Wirksamkeit festgestellt werden konnte. Um zu überprüfen, ob eventuell gegenseitig kompensierende Effekte zwischen Inhaltsstoffen der Subfraktion vorliegen, wurde diese in polare und unpolare Bestandteile aufgetrennt. Die resultierenden Subfraktionen wurden ebenfalls auf die EGFR-Hemmwirkung überprüft.

Die beiden Subfraktionen CFp und CFu modulierten die EGFR-Aktivität in HT29-Zellen über einen Zeitraum von 45 min bis zur Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml ($\hat{=}$ 12,6 bzw. 18 µg/ml Realkonzentration) nicht (Abbildung 47A und B). Beide Subfraktionen tragen somit nicht zur Bioaktivität des HBE bei. Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch die Inkubationen ebenfalls nicht beeinflusst. Inkubationen mit 200 µg/ml Realkonzentration der

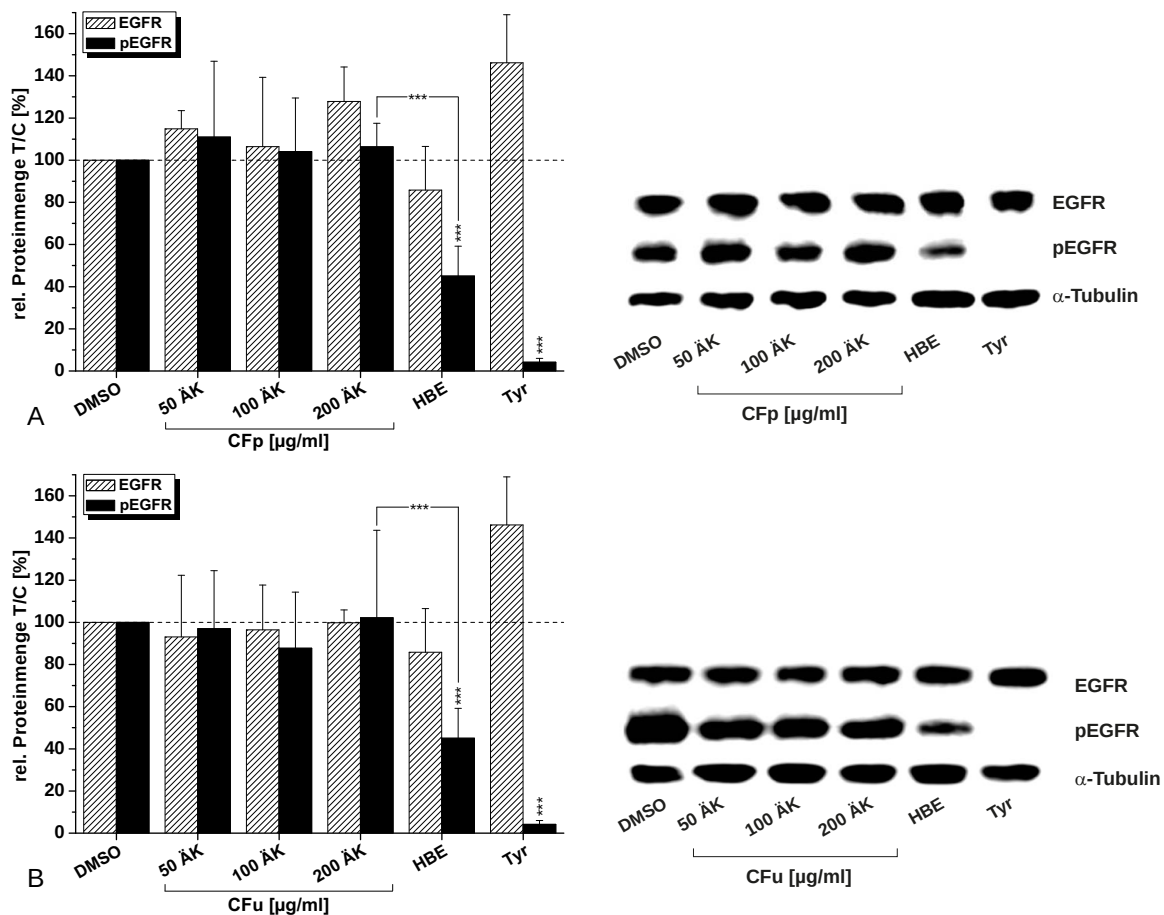


Abbildung 47: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch die A) polare (CFp) und B) unpolare Kopigmentfraktion (CFu), ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 200 µg/ml HBE und 1 µM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW $\pm$ SD von mindestens vier unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 µg/ml): *** $p < 0,001$. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Blotbild. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben. ÄK: Äquivalenzkonzentration.

beiden Subfraktionen konnte nicht untersucht werden, da jeweils nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen.

CFp zeichnete sich durch einen gegenüber von CF erhöhten Chlorogensäure- (Abbildung 45B) und Quercetin-3-*O*-glucosidgehalt aus, während in CFu vergleichsweise hohe Konzentrationen an freiem Quercetin auftraten (Tabelle 16). Kern *et al.* [2005] wiesen unter zellfreien Bedingungen (ELISA) für Chlorogensäure keine EGFR-hemmende Wirkung nach. Der Einfluss dieser Substanz auf die EGFR-Aktivität in HT29-Zellen wird in Abschnitt 4.3.4 dargestellt.

Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Subfraktionen

In Abbildung 48 sind die EGFR-Hemmwirkungen der unterschiedlichen HBE-Subfraktionen vergleichend dargestellt. Während der Anthocyananteil keine signifikante Modulation der EGFR-Aktivität bewirkt, kann die EGFR-hemmende Wirkung des HBE nahezu vollständig auf den anthocyanfreien Anteil (FF) zurückgeführt werden. Nach weiter Auftrennung dieser Subfraktion konnte die EGFR-hemmende Wirkung jedoch nicht vollständig zurückverfolgt werden. Lediglich die proanthocyanidinreiche Subfraktion reduzierte in der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml die Rezeptoraktivität signifikant. Diese Verringerung war jedoch so gering, dass die Aktivität der übergeordneten Fraktion (FF) nicht allein auf diese Fraktion (PF) zurückgeführt werden konnte. In höheren Realkonzentrationen (200 µg/ml) wiesen alle untersuchten Subfraktionen eine EGFR-Hemmung auf. Diese Konzentration würden jedoch nur bei Inkubation mit extrem hohen HBE-Mengen auftreten, die nach Verzehr von anthocyanreichen Früchten im Darmlumen vermutlich nicht erreicht würden.

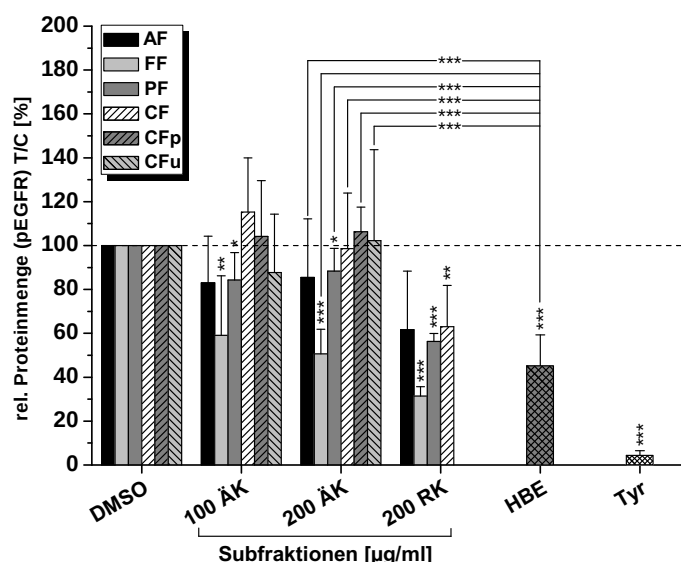


Abbildung 48: Zusammenfassung der Daten zur EGFR-Aktivitätshemmung durch HBE-Subfraktionen. Inkubationsdetails siehe Abbildungen 44–47. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 µg/ml): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. AF: anthocyanreiche Subfraktion; FF: anthocyanfreie Subfraktion; PF: Polymerfraktion; CP: Kopigmentfraktion; CFp: polare Kopigmentfraktion; CFu: unpolare Kopigmentfraktion. ÄK: Äquivalenzkonzentration; RK: Realkonzentration; HBE: Heidelbeerextrakt (200 µM).

Synergistische Wirkungen zwischen Polyphenolen wurden mehrfach beschrieben. Rossetto *et al.* [2002] wiesen die synergistische Beziehung zwischen Mv-3-glc und (+)-Catechin für die inhibierende Wirkung auf die Peroxidation von Linolsäure nach. Die Autoren führten den beobachteten Effekt auf die regenerative Wirkung durch (+)-Catechin zurück, das selber nur eine geringe antioxidative Wirkung besitzt. Herranz-López *et al.* [2012] zeigten, dass die bioaktive Wirkung eines nativen Rosellenextrakts (*Hibiscus sabdariffa*) hinsichtlich der Adipogenese (Einlagerung von Triglyceriden in Adipozyten) deutlich höher ist, als die aufsummierten Effekte der entsprechenden Einzelsubstanzen.

Der beobachtete Verlust der biologischen Aktivität nach Subfraktionierung des Extrakts in der vorliegenden Studie könnte ebenfalls auf synergistische Wirkungen zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung für die Verringerung der biologischen Wirksamkeit wären der Verlust oder der Abbau bioaktiver HBE-Inhaltsstoffe während der Lösemittelfraktionierung. Um dies aufzuklären müssten weitere Koinkubationsversuche mit den Subfraktionen untereinander durchgeführt werden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Subfraktionen war dies jedoch nicht möglich.

4.3.4 Chlorogensäure

In CF und CFp konnte eine deutliche Anreicherung an Chlorogensäure beobachtet werden (Tabelle 16). Diese Subfraktionen zeichnen sich durch ein besonders schwaches EGFR-Hemmpotential aus. Chlorogensäure wurde in isolierter Form betrachtet, um zu überprüfen, ob von dieser Substanz möglicherweise ein antagonistischer Effekt auf die EGFR-Hemmwirkung ausgeht. Wie zuvor wurden HT29-Zellen für 45 min serumfrei in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) in aufsteigender Substanzkonzentration inkubiert.

Die Inkubation mit 30 µM Chlorogensäure induzierte die EGFR-Aktivität signifikant auf $134 \pm 12\%$ (T/C) (Abbildung 49). Durch weitere Erhöhung der Chlorogensäurekonzentration bis 300 µM konnte die EGFR-Aktivität weiter gesteigert werden. In diesen hohen Konzentrationen war die Zunahme der Aktivität gegenüber der Lösemittelkontrolle aufgrund der Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen jedoch nicht statistisch signifikant. Die endogene Rezeptormenge des EGFR wurde durch Chlorogensäure in keiner der untersuchten Konzentrationen signifikant beeinflusst.

Die beobachtete Induktion der EGFR-Aktivität stimmt mit den Ergebnissen von Krumböck [2010] überein. Krumböck zeigte nach Chlorogensäureinkubation unter analogen Bedingungen einer Zunahme der EGFR-Aktivität in HT29-Zellen. Weiterhin wurde die Wirkung von Chlorogensäure auf die EGFR-Aktivität im zellfreien System (ELISA) von Kern *et al.* [2005] untersucht. Die Autoren dieser Studie konnten keine Modulation des isolierten Enzyms durch Chlorogensäure aufzeigen.

In diesem Zusammenhang wurde die Frage aufgeworfen, ob Chlorogensäure lediglich im isolierten Zustand die EGFR-Aktivität induziert oder inwiefern die Substanz in der Lage ist, eine durch EGFR-Hemmstoffe vermittelte Aktivitätsreduktion einzuschränken. Um dies zu überprüfen sollte Chlorogensäure in Koinkubation mit Substanzen bzw. HBE-Subfraktionen,

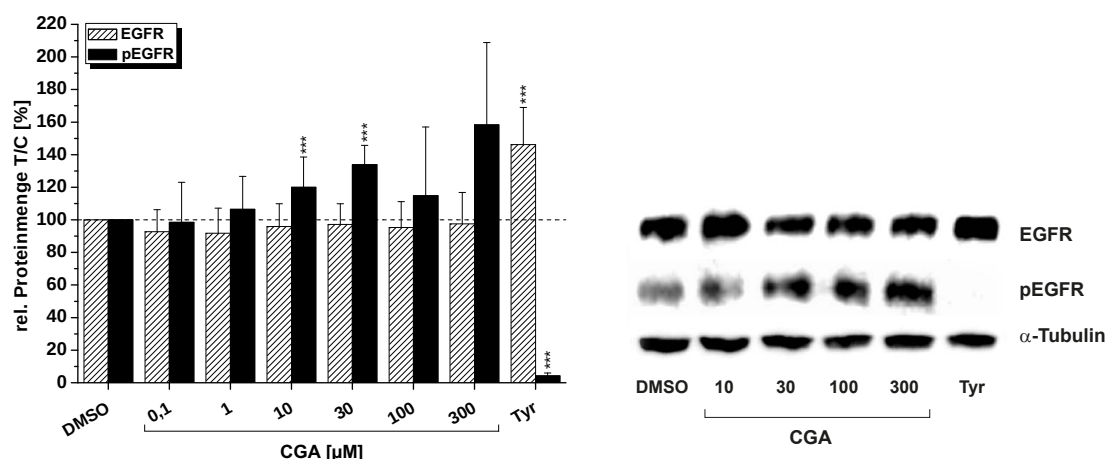


Abbildung 49: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch Chlorogensäure (CGA), ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 1 µM Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW ± SD von sieben unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: *** $p < 0,001$. Abgebildet ist ein repräsentatives Blotbild. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben.

die sich zuvor als EGFR-hemmend herausgestellt hatten, auf die Wirksamkeit in der Western Blot Analyse untersucht werden. Da die Chlorogensäurekonzentration von 30 µM in der vorangegangenen Untersuchung als die Potenteste herausstellte, wurde diese gewählt, um HT29-Zellen in Kombination mit FF, AF (jeweils 200 µg/ml Äquivalenzkonzentration) oder Cyanidin (200 µM) zu inkubieren. Die Inkubationsbedingungen wurden analog zur vorangegangenen Untersuchungen von Chlorogensäure gewählt.

Der Zusatz von Chlorogensäure erhöhte nach 45 min Inkubation in den Koinkubationsansätzen die EGFR-Phosphorylierung (Abbildung 50) gegenüber den Testsubstanzen (FF und Cyanidin) und verminderte somit deren EGFR-hemmende Wirkung. Die Erhöhung der EGFR-Aktivität war jedoch nicht signifikant ausgeprägt (gekennzeichnet durch Linien in Abbildung 50). Während die Hemmwirkung im Fall von FF und Cyanidin um 19 bzw. 41 % reduziert wurde (bezogen auf die ursprüngliche Hemmwirkung), modulierte Chlorogensäure die Wirkung von AF nicht.

In den vorausgegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Chlorogensäure einen HBE-Inhaltsstoff darstellt, der sowohl in isolierter Form als auch in Gemischen mit EGFR-Hemmstoffen die EGFR-Aktivität erhöht. Damit stellt die Substanz einen funktionellen Antagonisten für EGFR-hemmende Substanzen dar. Durch die Subfraktionierung wird Chlorogensäure insbesondere in CF und CFp gegenüber anderen Inhaltsstoffen erhöht (Tabelle 16). Durch Inkubation mit einer Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml CF resultiert eine Chlorogensäurekonzentration von 2,3 µM. Dieser Wert liegt am unteren Ende des wirksamen Konzentrationsbereichs der Chlorogensäure (Abbildung 49). Da in dieser Konzentration lediglich eine geringe Induktion der Rezeptoraktivität beobachtet wurde (Abbildung 49), ist der Einfluss der Substanz auf die Bioaktivität des HBE und

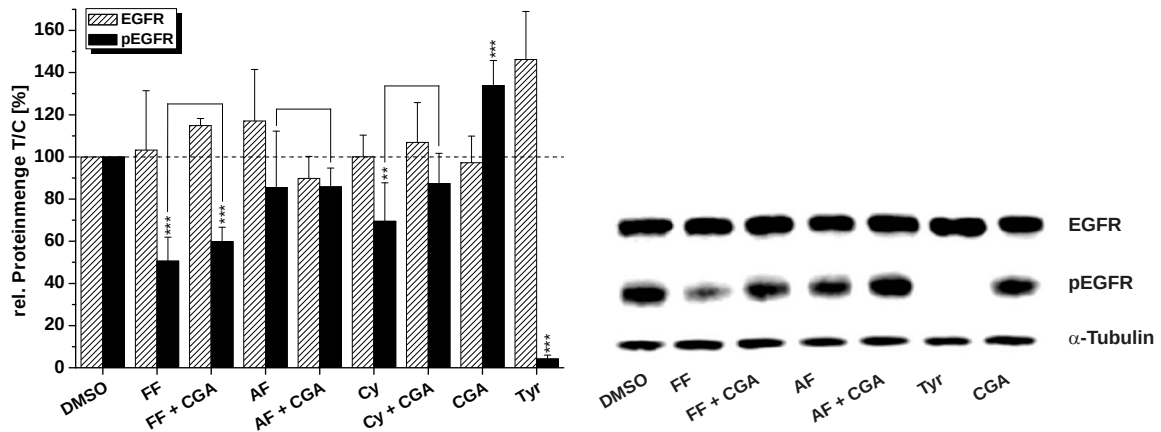


Abbildung 50: Modulation der EGFR-Phosphorylierung in HT29-Zellen durch Chlorogensäure (CGA, 30 μ M) in Koinkubation mit der anthocyanfreien (FF, 200 μ g/ml), der anthocyanhaltigen HBE-Subfraktion (AF, 200 μ g/ml) und Cyanidin (200 μ M) ermittelt in der Western Blot Analyse. Serumfreie Inkubation über 45 min in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. Stimulierung mit dem spezifischen Liganden EGF (100 ng/ml) in den terminalen 15 min. Positivkontrolle: 1 μ M Tyrphostin AG 1478 (Tyr). MW $\pm$ SD von sieben unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf FF, AF bzw. Cyanidin: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abgebildet ist ein repräsentatives Blotbild. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben.

den untersuchten Subfraktionen als gering einzuschätzen. Zudem weisen die Ergebnisse (Abbildung 50) darauf hin, dass der bioaktivitätsreduzierende Einfluss von Chlorogensäure auf EGFR-hemmende Substanzen limitiert ist. Somit trägt die Anreicherung von Chlorogensäure in CF und CFp zur Verringerung der Bioaktivität dieser Subfraktionen vermutlich nur teilweise bei.

4.3.5 Einfluss auf das Zellwachstum

Die Untersuchungen des HBE in Verkapselungssystemen ergab gegensätzliche Ergebnisse in Hinblick auf die EGFR-Hemmwirkung und das zellwachstumshemmende Potential: Selbst wenn die Anthocyanfreisetzung aus den Kapselsystemen nach kurzer Zeit abgeschlossen war, konnte keine bzw. lediglich eine deutlich verminderte EGFR-Hemmwirkung festgestellt werden. Das wachstumshemmende Potential des HBE blieb jedoch bei allen Formulierungsarten erhalten und wurde teils sogar erhöht (Abschnitte 4.1.2, 4.2.1 und 4.2.2). Daher stellte sich die Frage, welche HBE-Inhaltsstoffe wesentlich zur Wachstumshemmung beitragen. In Analogie zu den Kapselsystemen wurden daher auch die unterschiedlichen Subfraktionen im SRB-Assay auf tumorzellwachstumshemmende Eigenschaften untersucht.

Die Inkubation der HT29-Zellen fand im 24 Well-Format über 72 h statt. Die Inkubationskonzentration wurden analog zu den Untersuchungen hinsichtlich der EGFR-Aktivität gewählt. Äquivalenzkonzentrationen wurden in die Untersuchungen eingeschlossen, um die Ergebnisse der EGFR-Hemmwirkung des nativen HBE gegenüberzustellen. Realkonzentrationen von 200 μ g/ml (für AF und FF) wurde gewählt um die absoluten Wirkungen der Subfraktionen untereinander vergleichen zu können.

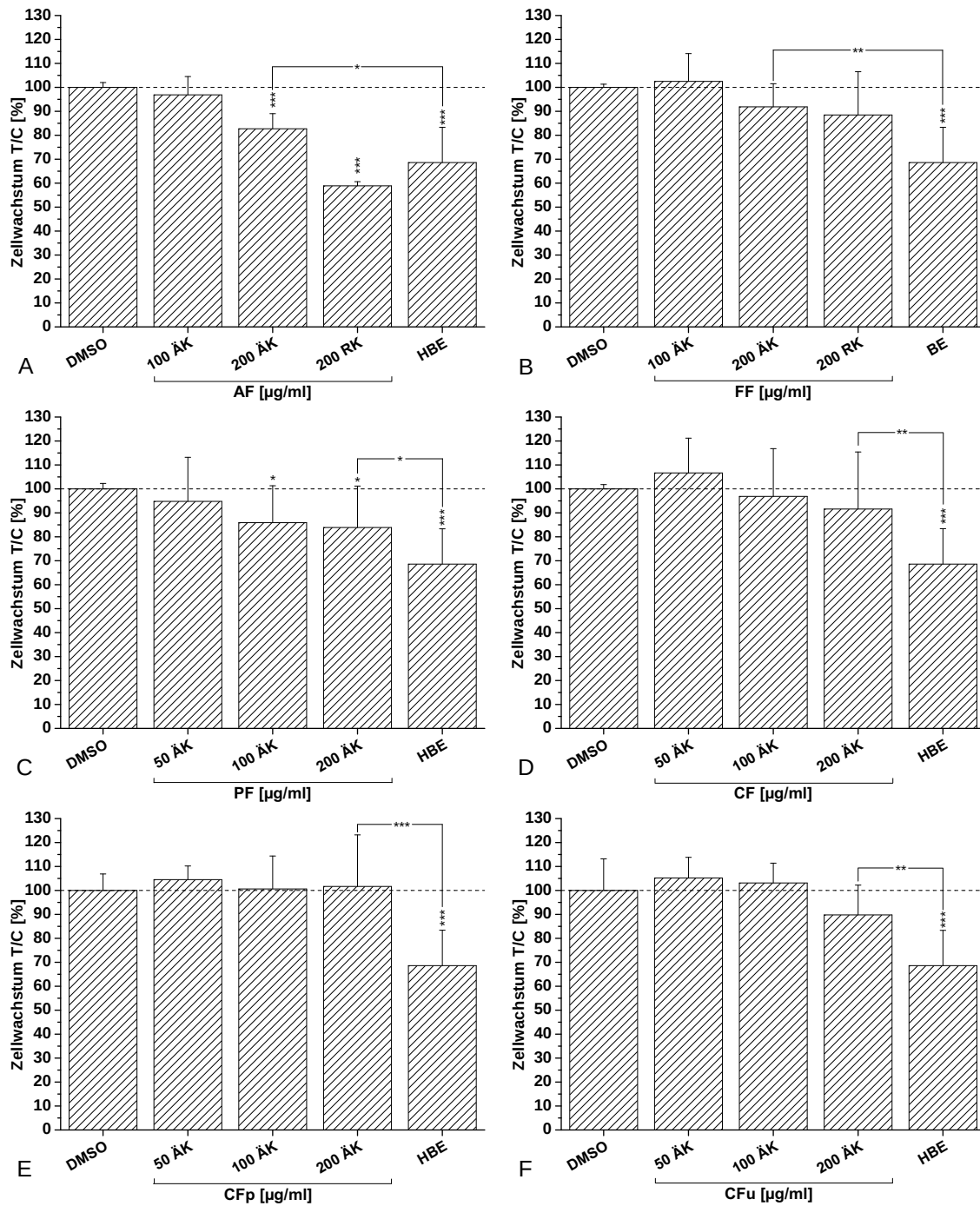


Abbildung 51: Modulation des Zellwachstums von HT29-Zellen durch Subfraktionen des HBE ermittelt im SRB-Assay. A) anthocyanhaltige Subfraktion (AF), B) anthocyanfreie Subfraktion (FF), C) Polymerfraktion (PF), D) Kopigmentfraktion (CF), E) polare Kopigmentfraktion (CFp) und D) unpolare Kopigmentfraktion (CFu). Serumhaltige Inkubation (10 % FKS) über 72 h in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase. MW $\pm$ SD von jeweils vier bis sechs unabhängigen Experimenten, normiert auf die Negativkontrolle (1 % DMSO). Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 μ g/ml): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Andrea Brunner erhoben. ÄK: Äquivalenzkonzentration; RK: Realkonzentration

Das wachstumshemmende Potential des nativen HBE wurde bereits zuvor untersucht (Abbildung 37). In den folgenden Untersuchungen wurde der Extrakt daher in einer Konzentration von 200 µg/ml zum Vergleich mitgeführt.

AF unterdrückte das Zellwachstum nach 72 h Inkubation potent und konzentrationsabhängig (Abbildung 51A). Durch Inkubation mit der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml ($\cong 74,2$ µg/ml Realkonzentration) konnte das Zellwachstum gegenüber der Negativkontrolle (1 % DMSO) signifikant auf 83 ± 6 % (T/C) verringert werden. Die Hemmwirkungen von AF und HBE unterscheiden sich signifikant voneinander. In der höheren Realkonzentration von 200 µg/ml wurde das Zellwachstum auf 59 ± 2 % (T/C) verringert.

FF unterdrückte das Zellwachstum in der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml ($\cong 99,6$ µg/ml Realkonzentration) auf 92 ± 10 % (T/C) (Abbildung 51B). Die beobachtete Verringerung war jedoch aufgrund der Abweichungen zwischen den Einzelexperimenten nicht signifikant. Die beobachtete Wachstumshemmung kann somit lediglich als Tendenz betrachtet werden. Im Gegensatz zu FF konnte für deren Subfraktion PF eine signifikante Unterdrückung des Zellwachstums auf 84 ± 17 % (T/C) festgestellt werden (Abbildung 51C). CF sowie deren Subfraktionen CFp und CFa übten keine signifikante Hemmwirkung auf das Wachstum der HT29-Zellen aus (Abbildungen 51D–F).

In Abbildung 52 sind die Ergebnisse der Abbildungen 51A–F vergleichend dargestellt. Während AF das Tumorzellwachstum am potentesten unterdrückt, hatte FF einen vergleichsweise schwachen Einfluss auf diesen Parameter. PF, die Subfraktion von FF, besaß eine stärkere Hemmwirkung als FF selbst. Die restlichen Fraktionen übten keine signifikante Wachstumshemmung auf HT29-Zellen aus. Durch Addition der wachstumshemmenden Wir-

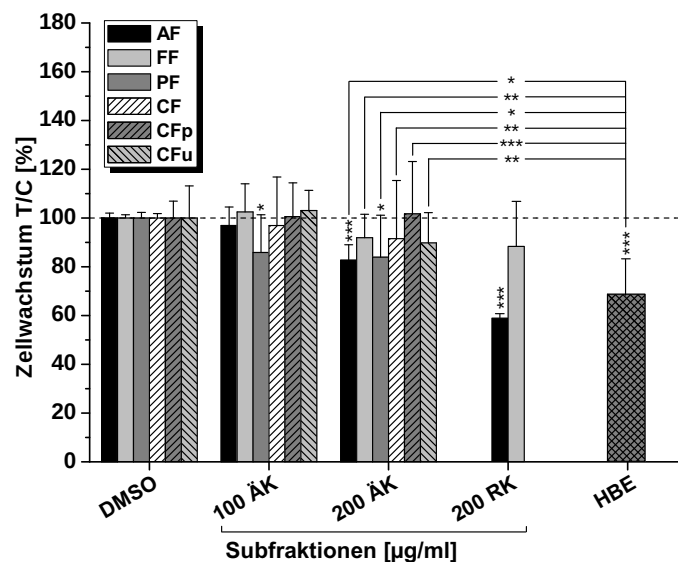


Abbildung 52: Zusammenfassung der Daten zur Wachstumshemmung durch HBE-Subfraktionen (Abbildung 51). Wachstumshemmung durch HBE-Subfraktionen. AF: anthocyanreiche Fraktion; FF: anthocyanfreie Fraktion; PF: Polymerfraktion; CP: Kopigmentfraktion; CFp: polare Kopigmentfraktion; CFu: unpolare Kopigmentfraktion. ÄK: Äquivalenzkonzentration; RK: Realkonzentration; HBE: Heidelbeerextrakt (200 µM). Inkubationsdetails siehe Abbildung 51. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle und auf HBE (200 µg/ml): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

kungen der beiden Hauptfraktionen AF und FF wird mit $25 \pm 11\%$ (T/C) nahezu die hemmende Wirkung des Gesamtextrakts ($31 \pm 15\%$ (T/C)) erreicht. Die Ergebnisse lassen eine additive Wirkung vermuten. Dies müsste jedoch in einer Koinkubation bestätigt werden, was aufgrund der Materiallimitierung nicht möglich war. Die Wirkung von FF scheint ausschließlich auf den Anteil der polymeren Proanthocyanidine zurückzugehen, da CF keine wachstumshemmende Wirkung vermittelt. Der Vergleich der Fraktionierungsexperimente legt den Schluss nahe, dass die wachstumshemmenden Eigenschaften des HBE durch andere Verbindungen vermittelt werden, als die EGFR-Hemmwirkung des Extrakts (Abschnitt 4.3.3). Während die EGFR-hemmende Kapazität vorwiegend in der anthocyanfreien Fraktion FF (Abbildung 44B) lokalisiert wurde, trug die Anthocyanfraktion AF durchaus substantiell zur wachstumshemmenden Wirkung bei.

4.4 Einfluss auf die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene

4.4.1 Bioaktivität HBE-beladener Kapselsysteme *in vivo*

In vitro wurde weder in der vorliegenden Arbeit noch in den Untersuchungen von Schantz [2011] eine Steigerung der Bioaktivität des HBE nach Einbringung in die unterschiedlichen Kapselsysteme aufgezeigt. In Abhängigkeit der untersuchten Formulierungssysteme und der biologischen Endpunkte wurde entweder keine Modulation der Bioaktivität (EGFR- bzw. Zellwachstumshemmung) beobachtet oder es mussten moderate bis komplette Verluste der biologischen Wirksamkeit nach Verkapselung des HBE verzeichnet werden. Die Resultate der *ex vivo*-Fermentation mit Ileostomaausfluss (Abbildungen 36A–C) weisen darauf hin, dass die EGFR-Hemmung im GIT vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt. Damit stellte sich die Frage, welche Biomarker *in vivo* geeignet sind, eine biologische Aktivität zu erfassen, um den Einfluss der Verkapselung vergleichen zu können. Hierbei sind insbesondere systemische Wirkungen von Interesse, da sie Einflüsse auf die Bioverfügbarkeit zumindest teilweise widerspiegeln. Als Parameter für diese Untersuchungen wurde daher der Nrf2-aktivierende Einfluss des anthocyanreichen HBE *in vivo* und *in vitro* betrachtet. Im Fokus dieser Untersuchungen stand darüber hinaus die Frage, inwiefern neben der Stabilisierung wertgebender Inhaltsstoffe auch deren Bioverfügbarkeit *in vivo* durch Verkapselung optimiert werden kann, sodass eine verbesserte chemopräventive Wirkung im Organismus resultiert.

Die kontrollierte Humanstudie, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Richling (Technische Universität Kaiserslautern, Institut für Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie) und Arbeitsgruppe Melcher (Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik II) durchgeführt wurde, gliederte sich in zwei Probandenkollektive (Genehmigt durch den Ethikausschuss der Universität Würzburg, Nr. 32/10). Das erste Kollektiv

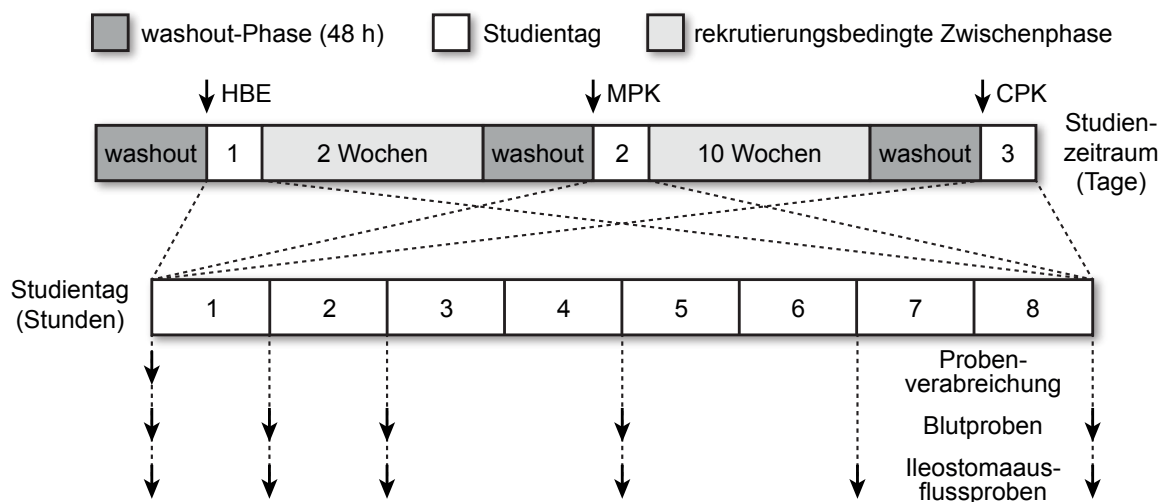


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Studienkonzeption. Abkürzungen: HBE: Heidelbeerextrakt; MPK: molkenproteinbasierte Hohlkapseln; CPK: Citruspektinkapseln. Genehmigt durch den Ethikausschuss der Universität Würzburg, Nr. 32/10.

(Ileostomieprobanden, IP) setzte sich aus fünf weiblichen Morbus-Crohn-Patientinnen, die aufgrund ihrer Erkrankung einen künstlichen Darmausgang nach dem terminalen Ileum (Ileostoma) besitzen, zusammen. Das Kontrollkollektiv (Kontrollprobanden, KP) bestand aus fünf gesunden Frauen. Die Interventionsstudie wurde in drei Studienabschnitte zu je drei Tagen untergliedert (Abbildung 53). Die Zeiträume zwischen den Studienabschnitten betrugen rekrutierungsbedingt zwei bzw. zehn Wochen. Im ersten Studienabschnitt konsumierten die Probanden 10 g unverkapselten HBE. Diese Menge entspricht etwa dem Polyphenolgehalt von 300 g frischen Wildheidelbeeren. Im zweiten und dritten Studienabschnitt wurden den Probanden 10 g HBE verkapselt in molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln (MPK, Abschnitt 2.6.1) bzw. schellackbeschichteten Citruspektinkapseln (CPK, Abschnitt 2.6.4) verabreicht. HBE sowie die beiden Kapselsysteme wurden jeweils als Bolusgabe¹, eingerührt in 150 g Magermilchjoghurt, auf nüchternen Magen verzehrt. Im Zeitraum von 48 h vor der Probenverabreichung waren die Probanden angehalten, sich polyphenolarm zu ernähren. Unmittelbar vor der Probenverabreichung (0 h) sowie 1, 2, 4 und 8 h danach wurden Blut- und Ileostomaausflussproben gesammelt (Abbildung 53). 6 h nach der Intervention wurde eine zusätzliche Ileostomaausflussprobe genommen.

Als Studienparameter wurden die Transkriptionsänderung Nrf2/ARE-abhängiger Gene und die DNA-Schädigung (Basis- und oxidative Schäden) mononukleärer peripherer Blutzellen (PBMC), die Beeinflussung des GSH-Status im Blutplasma sowie Anthocyangehalte der Ileostomaausflüsse bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkriptionsänderung Nrf2/ARE-regulierter Gene untersucht. Die restlichen Parameter wurden von der Arbeitsgruppe Richling bestimmt.

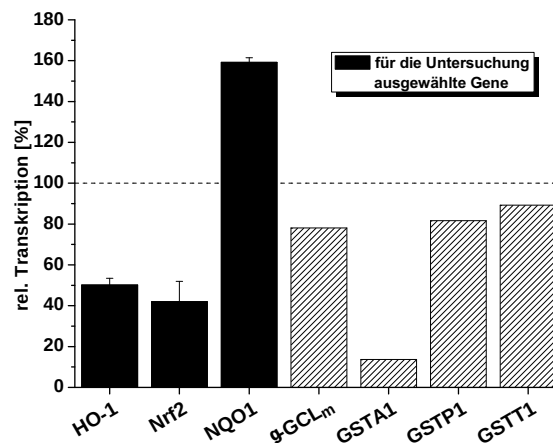


Abbildung 54: Vorauswahl Nrf2/ARE-regulierter Gene. Untersucht wurden die Transkriptänderungen der Gene HO-1, Nrf2, NQO1, γ -GCL_m, GSTA1, GSTP1 und GSTT1 in PBMC gesunder Probanden mittels qRT-PCR 8 h nach Verzehr von 10 g HBE. Die Quantifizierung erfolgte in Duplikaten normiert auf β -Aktin als endogenes Kontrollgen und die Basislinie ($t = 0$ h). MW $\pm$ R/2 von ein bis zwei Probanden.

Vorauswahl Nrf2/ARE-regulierter Gene

Die relative Transkription der Gene HO-1, Nrf2, NQO1, γ -GCL_m, GSTA1, GSTP1 und GSTT1 (Abschnitt 2.2.9) wurde in ein bis zwei gesunden Probanden 8 h nach Verzehr von unverkapseltem HBE mittels qRT-PCR bestimmt. β -Aktin wurde als endogenes Kontrollgen zur Quantifizierung der Transkription herangezogen. Signifikante Unterschiede zur Basislinie (t = 0 h) wurden aufgrund der niedrigen Probenzahl nicht bestimmt.

Die Transkription der Gene HO-1 und NQO1 wurde nach HBE-Verzehr auf ~ 40 –50 % verringert. Gleichzeitig erhöhte sich der mRNA-Level von NQO1 auf ~ 160 % (Abbildung 54). Die Transkription der Gene γ -GCL_m, GSTP1 und GSTT1 war nach 8 h nicht wesentlich beeinflusst (Verringerung ≤ 20 %). Das Gen GSTA1 wies eine sehr niedrige mRNA-Absolutmenge auf (C_q -Werte > 40). Die Transkription der Gene γ -GCL_m, GSTP1, GSTT1 und GSTA1 wurden daher nicht weiter verfolgt.

Unverkapselter HBE

Die Transkriptmengen der Nrf2/ARE-regulierten Gene HO-1, Nrf2 und NQO1 in PBMC der Kontroll- und Ileostomieprobanden wurde 1–8 h nach Verzehr von 10 g unverkapseltem HBE quantifiziert. Als endogene Kontrollgene dienten β -Aktin und Glycerolaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH). Die Quantifizierung der Gentranskription erfolgte letztlich in Relation zu GAPDH, da die Transkriptmenge von β -Aktin (C_q) einerseits größeren Schwankungen unterlag und andererseits stärker von den Transkriptkonzentrationen der zu untersuchenden Gene abwich (ΔC_q).

In PBMC der Kontrollprobanden wurde die Menge der HO-1-Transkripte bereits 1 h

¹Bolusgabe: Einmalige Verabreichung einer Testsubstanz.

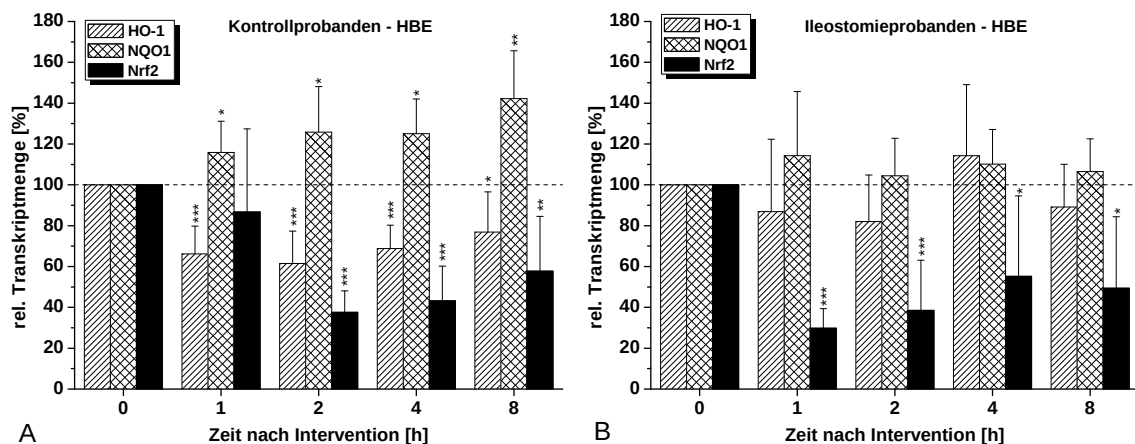


Abbildung 55: Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in PBMC von A) Kontrollprobanden (n = 5) und B) Ileostomieprobanden (n = 5) nach einmaligem Verzehr von 10 g HBE. Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR in Triplikaten, normiert auf GAPDH als endogenes Kontrollgen und die Basislinie (t = 0 h). MW $\pm$ SD von relativen Transkriptmengen aus jeweils fünf Probanden. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abkürzungen: HBE: Heidelbeerextrakt; PBMC: Mononukleäre peripheren Blutzellen.

nach Verzehr signifikant verringert (Abbildung 55A). Die minimale Transkriptmenge wurde nach 2 h mit $61 \pm 16 \%$ beobachtet. Im anschließenden Zeitraum (4–8 h) erhöhte sich die Menge leicht. Eine signifikante Absenkung konnte für Nrf2 erst nach 2 h beobachtet werden. Auch bei diesem Gen lag das Minimum bei 2 h mit einer Verringerung auf $38 \pm 11 \%$. Die NQO1-Transkriptmenge wurde signifikant und zeitabhängig erhöht. Die stärkste Induktion wurde nach 8 h mit einer Transkripterhöhung auf $142 \pm 23 \%$ gemessen. Der Effekt war zu diesem Zeitpunkt somit noch nicht abgeklungen. Inwiefern die Transkriptmenge im weiteren Zeitverlauf möglicherweise erhöht wird, kann aus den Daten nicht abgeschätzt werden.

In PBMC der Ileostomieprobanden wurden die Transkriptmengen der Gene HO-1 und NQO1 nach Verzehr von HBE nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 55B), jedoch konnte für HO-1 nach 1 und 2 h eine geringfügige Verringerung auf 87 ± 35 bzw. $82 \pm 23 \%$ beobachtet werden. Der mRNA-Level von Nrf2 wurde signifikant reduziert: Bereits nach 1 h wurde eine maximale Unterdrückung der Nrf2-Transkriptmenge auf $30 \pm 10 \%$ beobachtet.

Extraktbeladene MPK

Im zweiten Studienabschnitt wurden 10 g HBE, verkapselt in 144 g MPK verabreicht. Aufgrund des sauren Geschmacks der Kapseln durften die Probanden die Zubereitung nach Belieben mit Süßstoff süßen. In der Kontrollgruppe standen in diesem Studienabschnitt nur vier der fünf Probandinnen zur Verfügung, da eine Person die Studie unterbrechen musste. Weiterhin wurden die RNA-Proben der restlichen Probanden 1 h nach Verzehr nicht zur Berechnung der Gentranskription herangezogen, da die RNA-Qualität dieser Proben zu niedrig war (RNA-Integritätswerte (RIN) < 5 ; Abschnitt 6.3.3).

Die Transkriptmengen in PBMC der Kontrollprobanden unterlag nach Intervention mit MPK starken interindividuellen Schwankungen (Abbildung 56A). Keines der untersuchten Gene wurde signifikant in seiner relativen Transkription moduliert. Die Transkriptmengen in PBMC der Ileostomieprobanden wurden nicht signifikant modifiziert (Abbildung 56B) und die Schwankungen zwischen den Probanden waren deutlich niedriger. Lediglich 1 h nach Verzehr der MPK konnte eine signifikante Unterdrückung der Gene HO-1 und Nrf2 auf jeweils $79 \pm 23 \%$ verzeichnet werden. Im weiteren Verlauf der Intervention (2–8 h) hielt sich die Transkription der Gene im Bereich der Basislinie auf.

Extraktbeladene CPK

Im letzten Studienabschnitt wurde HBE in CPK verzehrt (10 g HBE in 30 g Kapseln). Dieses Kapselsystem wurde zuvor in den *in vitro*-Versuchen nicht untersucht. Bei diesen Kapseln handelt es sich im Gegensatz zu den flüssigkeitsgefüllten PHK um feste Matrixkapseln (Abschnitt 2.6.4). Da diese Kapseln einen Schellacküberzug aufwiesen, waren diese, im Gegensatz zum unverkapselten HBE und den beladenen MPK, weitgehend geschmacksneutral.

Nach Intervention mit den extraktbeladenen CPK wurden die mRNA-Level der Gene HO-1 und NQO1 in PBMC der Kontrollprobanden bereits nach 1 h signifikant auf 73 ± 9 bzw. $67 \pm 15 \%$ verringert (Abbildung 57A). Die Transkriptmenge von HO-1 hielt sich im

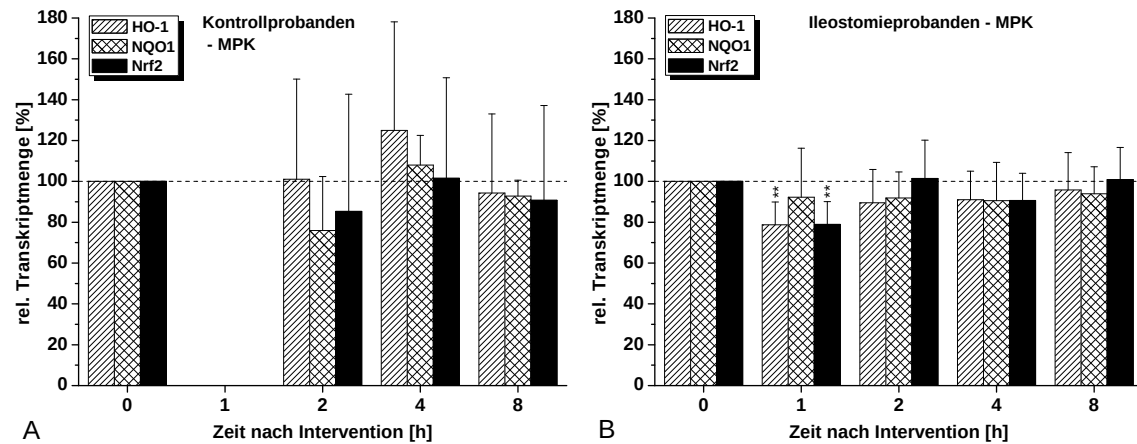


Abbildung 56: Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in PBMC von A) Kontrollprobanden (n=4) und B) Ileostomieprobanden (n=5) nach einmaligem Verzehr von 10 g HBE verkapselt in 144 g MPK. Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR in Triplikaten, normiert auf GAPDH als endogenes Kontrollgen und die Basislinie (t=0 h). MW $\pm$ SD von relativen Transkriptmengen aus jeweils fünf Probanden. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: ** p < 0,01. Abkürzungen: HBE: Heidelbeerextrakt; MPK: Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln; PBMC: Mononukleäre peripheren Blutzellen.

anschließenden Zeitraum signifikant unterdrückt auf $\sim 80\%$. NQO1 unterlag im folgenden Zeitverlauf Schwankungen. Die Transkriptmenge von Nrf2 in PBMC der Kontrollprobanden wurde durch die Intervention mit MPK nicht signifikant beeinflusst.

Die Messungen der Gentranskription in PBMC der Ileostomieprobanden unterlag größeren Schwankungen (Abbildung 57B). Eine Tendenz zeichnete sich dahingehend ab, dass die Transkriptmengen aller Gene zeitabhängig verringert wurden. Dieser Effekt erwies sich für Nrf2 nach 8 h Intervention mit einer Verringerung auf $76 \pm 20\%$ als signifikant.

In den vorausgegangenen Untersuchungen in gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass der Konsum von Heidelbeerinhaltsstoffen innerhalb kurzer Zeit (1–2 h nach Intervention) einen Einfluss auf die Transkriptmenge Nrf2/ARE-abhängiger Gene in Blutzellen hat. Während die Transkriptmenge für NQO1 erhöht wurde, konnte für die mRNA-Mengen von HO-1 und Nrf2 eine Verringerung beobachtet werden. In PBMC der Ileostomieprobanden waren diese Effekte auf die Transkriptmengen deutlich schwächer ausgeprägt als in Blutzellen der Kontrollgruppe. Die Verkapselung des HBE führte dazu, dass die für den unverkapselten Extrakt beobachteten Effekte auf die Gentranskription merklich reduziert wurden.

Um die Unterschiede der Transkriptionsmuster zwischen dem unverkapselten Extrakt und den Kapselsystemen zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 58 die Effekte der verschiedenen Präparationen vergleichend dargestellt. In Abbildung 58A und B wird ersichtlich, dass in PBMC der Kontroll und Ileostomieprobanden für die Transkriptmengen von HO-1 nach Verzehr des verkapselten HBE keine signifikanten Unterschiede zum unverkapselten Extrakt bestehen. Die Transkriptmengen von NQO1 sind in Kontrollprobanden nach Verzehr der Kapseln jedoch signifikant niedriger als nach Verzehr des freien Extrakts (Abbildung 58C). In den Ileostomieprobanden wurde für den unverkapselten Extrakt kein Effekt festgestellt, daher konnte nach Verkapselung auch keine Veränderung gezeigt werden (Abbildung 58D).

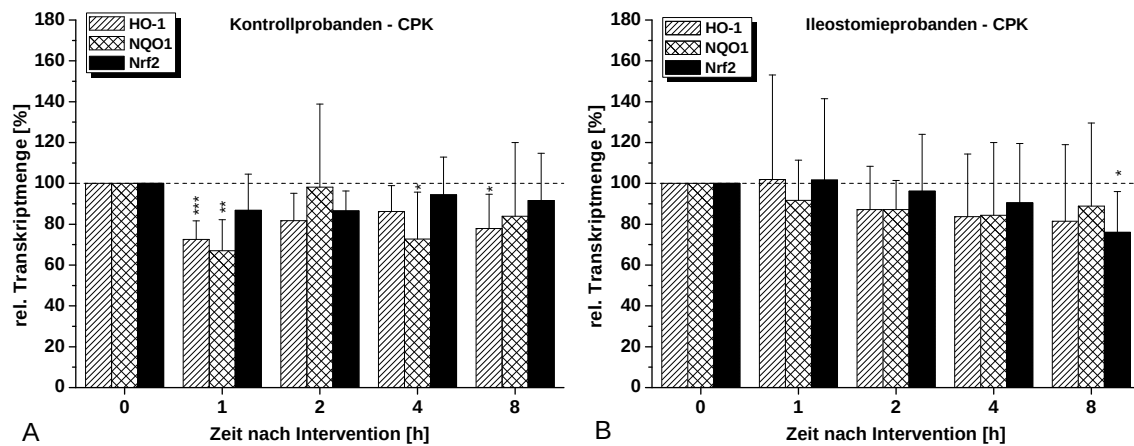


Abbildung 57: Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in PBMC von A) Kontrollprobanden ($n = 5$) und B) Ileostomieprobanden ($n = 5$) nach einmaligem Verzehr von 10 g HBE verkapselt in 30 g CPK. Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR in Triplikaten, normiert auf GAPDH als endogenes Kontrollgen und die Basislinie ($t = 0$ h). $MW \pm SD$ von relativen Transkriptmengen aus jeweils fünf Probanden. Student's t -Test bezogen auf die Negativkontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abkürzungen: CPK: Citruspektinkapseln; HBE: Heidelbeerextrakt; PBMC: Mononukleäre peripheren Blutzellen.

Die in PBMC der Kontroll- und Ileostomieprobanden gemessene Unterdrückung der Nrf2-Transkription durch unverkapselten HBE war nach Verzehr der extraktbeladenen Kapselsysteme signifikant schwächer. Für die Kontrollgruppe gilt dies für die Zeitpunkte 2 und 4 h (Abbildung 58E) und in der Ileostomiegruppe für die Zeitpunkte 2 und 8 h (Abbildung 58F).

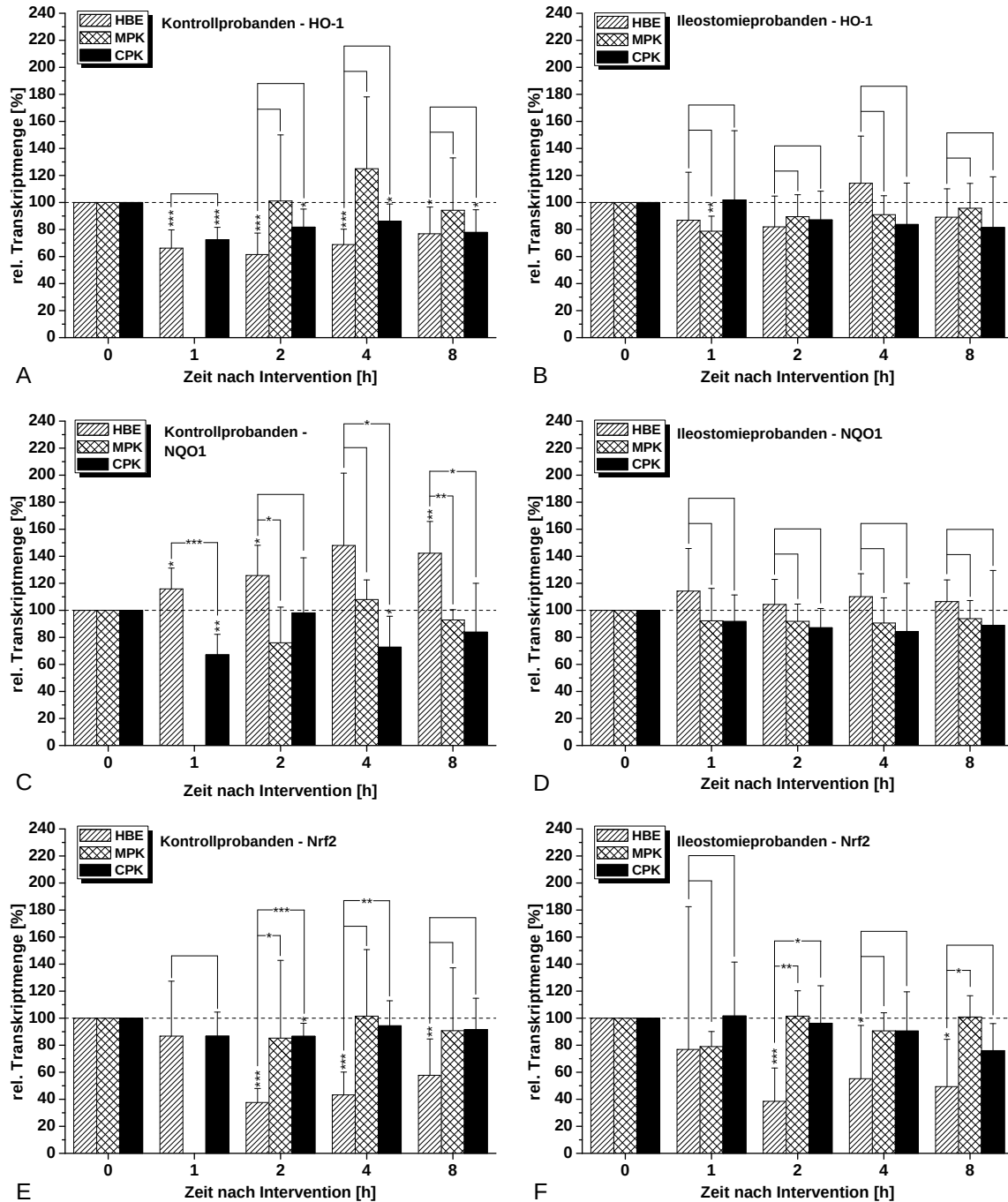


Abbildung 58: Übersicht der Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene (A,B: HO-1; C,D: NQO1; E,F: Nrf2) in PBMC von Kontrollprobanden (A, C, E) und Ileostomieprobanden (B, D, F) nach einmaligem Verzehr von 10g HBE (unverkapselt, in MPK oder CPK). Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR in Triplikaten, normiert auf GAPDH als endogenes Kontrollgen und die Basislinie ($t=0$ h). MW $\pm$ SD von relativen Transkriptmengen aus jeweils fünf Probanden. Student's t -Test bezogen auf die Basislinie ($t=0$ h) bzw. die Intervention mit HBE: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abkürzungen: CPK: Citruspektinkapseln; HBE: Heidelbeerextrakt; MPK: Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln; PBMC: Mononukleäre peripheren Blutzellen.

4.4.2 Bioaktivität ausgewählter HBE-Inhaltsstoffe und -Abbauprodukte *in vitro*

In vivo konnte die Beeinflussung der Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene nach Intervention mit unverkapseltem HBE gezeigt werden. Die Transkriptmengen von HO-1 und NQO1 wiesen nach HBE-Konsum zwischen den Kontroll- und Ileostomieprobanden signifikante Unterschiede auf: Während in PBMC der Kontrollprobanden die Transkription dieser beiden Gene moduliert wurde, konnte in der Ileostomiegruppe keine Veränderung der Transkriptmengen beobachtet werden. Die mRNA-Mengen von Nrf2 wurden jedoch in beiden Gruppen nach HBE-Intervention vermindert. Da die Modulation der Gene NQO1 und HO-1 nur in Probanden mit einem aktiven Kolon beobachtet wurde, stellte sich die Frage ob intestinal gebildete Abbauprodukte an der biologischen Wirkung des HBE beteiligt sind. In den folgenden Untersuchungen wurden daher der unverkapselte HBE, HBE-Bestandteile und Anthocyanabbauprodukte hinsichtlich einer Nrf2-aktivierende Wirkung mittels Luciferase-Reporterergenassay sowie qRT-PCR untersucht.

Luciferase-Reporterergenassay

Die Messung der Nrf2-Aktivität wurde zunächst in einem Luciferase-Reporterergenassay in CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary cells*) durchgeführt. Die Zellen wurden stabil mit einem Expressionsvektor, der für ein mGSTA1-ARE gekoppeltes *Photinus pyralis*-Luciferasegen kodiert, und einen zweiten Vektor, kodierend für das GFP-Gen (*Green fluorescent protein*), transfiziert. Fertig transfizierte Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Dirsch (Universität Wien, Institut für Pharmakognosie) zur Verfügung gestellt.

Die transfizierten CHO-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen des nativen HBE, sowie den beiden HBE-Subfraktionen AF und FF, um zwischen der Wirkung von Anthocyanen und des Nichtanthocyananteils zu unterscheiden, inkubiert. Weiterhin wurde das Anthocyan Cy-3-glc und das entsprechenden Aglycons Cyanidin untersucht. Darüber hinaus erfolgten Inkubationen mit den intestinal gebildeten Anthocyanabbauprodukten Protocatechusäure, Gallussäure, Syringasäure und Phloroglucinolaldehyd [Fleschhut *et al.*, 2006]. 2-Cyan-3,12-dioxo-1,9-dien-28-oleanolsäureimidazolid (CDDO-Im, Abbildung 12D) als wurde als positiver Nrf2-Aktivator eingesetzt.

Die Inkubationen mit HBE, den Subfraktionen AF und FF, dem Anthocyan Cy-3-glc, dem Anthocyanidin Cyanidin und den Phenolcarbonsäuren Protocatechu-, Gallus- bzw. Syringasäure hatten nach 20 h keinen signifikanten Effekt auf die Nrf2-Aktivität im Luciferase-Reporterergenassay (Abbildung 59A). Phloroglucinolaldehyd, das gemeinsame Abbauprodukt aller Anthocyane, war als einzige Testsubstanz in der Lage, die Nrf2-Aktivität signifikant auf $129 \pm 16\%$ (T/C) (400 μ M) zu erhöhen. Die Positivkontrolle CDDO-Imidazolid induzierte die Nrf2-Aktivität auf $300 \pm 24\%$ (T/C). Die Viabilität der CHO-Zellen, gemessen als GFP-Fluoreszenz, wurde durch keine der Testsubstanzen signifikant beeinträchtigt (Abbildung 59B).

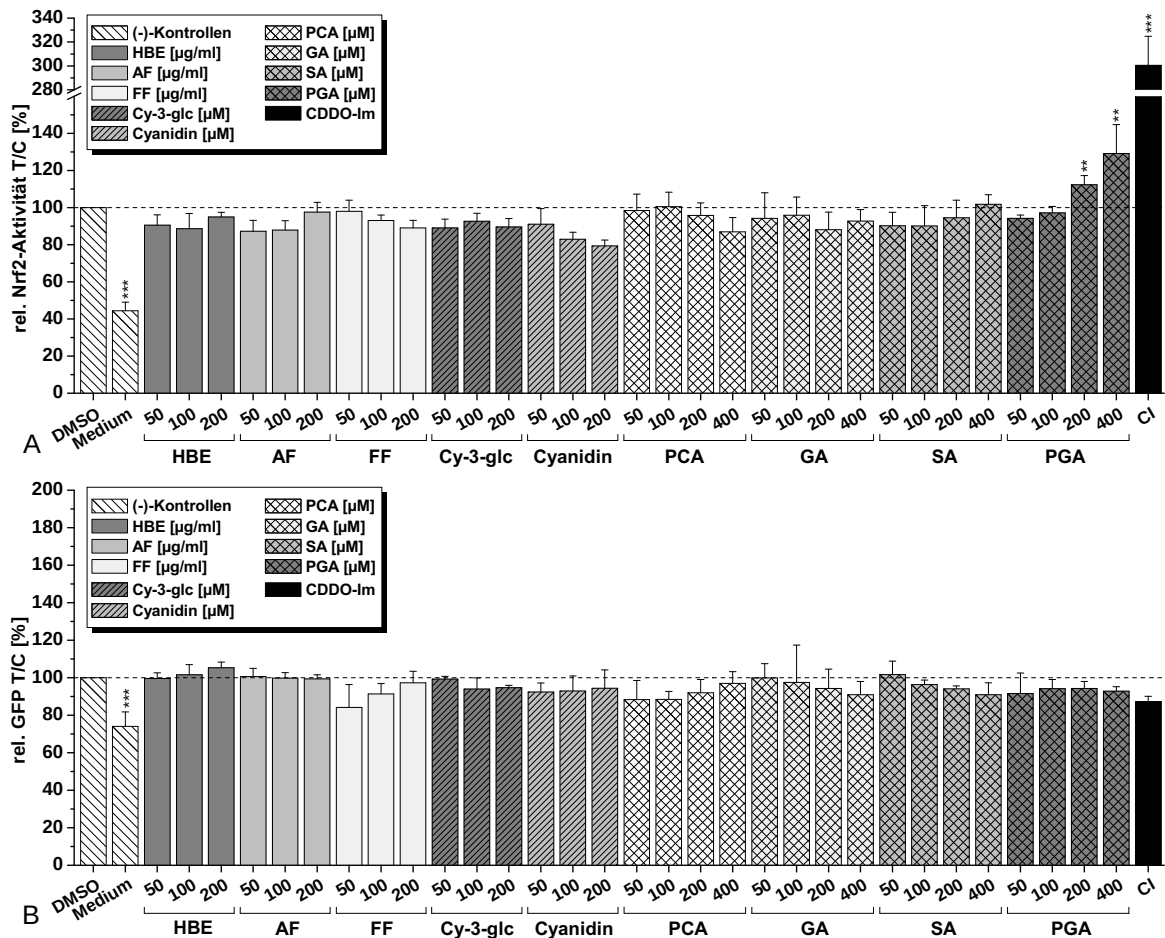


Abbildung 59: ARE-Induktion verschiedener HBE-Inhaltsstoffe und -abbauprodukte im Luciferase-Reportergenassay. CHO-Zellen wurden stabil mit mGSTA1-ARE gekoppelten *Photinus pyralis*-Luciferasegen transfiziert. Die Zellen wurden 20 h mit den Testsubstanzen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml) inkubiert. A) Nrf2-Induktion gemessen an der Luciferaseaktivität; B) Viabilität der CHO-Zellen, gemessen an der GFP-Fluoreszenz. Die relative Nrf2-Aktivität wurde normiert auf das GFP-Signal und die Negativkontrolle (1 % DMSO). MW $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abkürzungen: AF: anthocyanfreie Subfraktion; CI: CDDO-Imidazolid; FF: anthocyanfreie Subfraktion; GA: Gallussäure; HBE: Heidelbeerextrakt; PCA: Protocatechusäure; PGA: Phloroglucinolaldehyd; SA: Syringasäure.

Transkriptionsanalyse

Die mRNA-Level Nrf2/ARE-regulierter Gene wurden nach Inkubation mit ausgewählten Testsubstanzen im Kolonkarzinommodell (HT29-Zellen) mittels qRT-PCR ermittelt, um die Ergebnisse des Luciferase-Reportergenassay auf Transkriptionsebene zu ergänzen. Die Gene HO-1, NQO1 und Nrf2, die bereits zuvor in der Humanstudie untersucht wurden (Abschnitt 4.4.1), dienten in dieser Studie ebenfalls als Zielgene hinsichtlich einer Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs. HT29-Zellen wurden in Anlehnung an die Untersuchung der Nrf2-Aktivierung im Luciferase-Reportergenassay 20 h mit nativem HBE, dem Anthocyan Cy-3-glc bzw. den intestinal gebildeten Cyanidinabbauprodukten Protocatechusäure und Phloroglucinolaldehyd inkubiert. Als Positivkontrollen dienten CDDO-Imidazolid und *t*-BHQ.

Die Transkriptmengen der Gene HO-1 und Nrf2 wurden nach Inkubation mit Phloroglucinolaldehyd konzentrationsabhängig und signifikant auf 331 ± 52 bzw. 215 ± 23 % (Abbildung 60). HBE, Cy-3-glc und PCA erwiesen sich als unwirksam. NQO1 hingegen wurde durch keine der untersuchten Substanzen beeinflusst. Im Gegensatz zu Phloroglucinolaldehyd erhöhten die Positivkontrollen CDDO-Imidazolid und *t*-BHQ die Transkriptmengen der Gene HO-1 und NQO1. Die Nrf2-mRNA-Level wurden hingegen nicht signifikant moduliert.

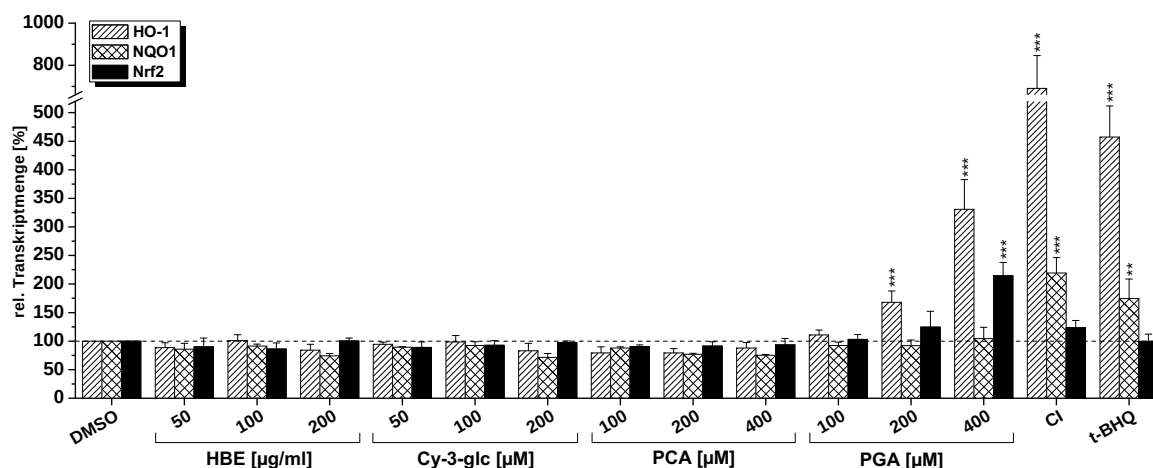


Abbildung 60: Modulation Nrf2/ARE-regulierter Gene nach 20h Inkubation mit HBE, Cy-3-gly, Protocatechusäure (PCA) und Phloroglucinolaldehyd (PGA) in Gegenwart von Katalase (100 U/ml). Die relativen Transkriptmengen wurden normiert auf β -Aktin und die Negativkontrolle (1 % DMSO). Positivkontrollen: CDDO-Imidazolid (CI, 100 nM) und *t*-BHQ (200 μ M). MW $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen. Student's *t*-Test bezogen auf die Negativkontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass durch die Inkubation mit Phloroglucinolaldehyd sowohl eine Induktion der Luciferase im Nrf2-Reportersystem sowie eine Modulation der Gentranskription der Nrf2/ARE-regulierten Gene HO-1 und Nrf2 resultierte. Diese Daten sprechen für eine Aktivierung des Nrf2-Signalwegs durch Phloroglucinolaldehyd als einzige untersuchte Substanz. Der native Extrakt, verschiedene Subfraktionen, Anthocyane, Anthocyanidine sowie aus Abbau resultierende Phenolcarbonsäuren konnten den Nrf2-Signalweg in beiden Testsystemen im gewählten Konzentrationsbereich nicht induzieren.

4.5 Gesamtdiskussion

Tumorerkrankungen stellen in Deutschland nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache bei Männern und Frauen dar [Statistisches Bundesamt, 2011]. Als Verursacher für die meisten Tumorerkrankungen mit Todesfolge wird der Einfluss der Ernährung noch vor Tabakkonsum angeführt [Robert-Koch-Institut, 2012]. Obwohl bereits eine Vielzahl an Ernährungsempfehlungen erstellt wurden, konnten bislang vergleichsweise wenige wissenschaftlich bestätigt werden [Wicki und Hagmann, 2011]. Die häufigsten, ernährungsbedingten Ursachen stellen Übergewicht, erhöhter Konsum von Alkohol und rotem Fleisch sowie ein geringer Verzehr von Obst und Gemüse dar [Parkin *et al.*, 2011]. Neben dem Ballaststoffanteil wurden in Obst und Gemüse vor allem die Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe als präventiv hinsichtlich der Tumorbildung identifiziert [Thomasset *et al.*, 2007]. Heidelbeeren beispielsweise enthalten einen hohen Anteil an Polyphenolen [Juadjur und Winterhalter, 2012]. Darüber hinaus konnte die bioaktive Wirkung von Heidelbeerextrakten mehrfach gezeigt werden [Teller *et al.*, 2009b, Thomasset *et al.*, 2009a]. Die Wirkung von Polyphenolen ist organ- bzw. gewebeabhängig [Crozier *et al.*, 2009]. Insbesondere im GIT treten nach Verzehr vergleichsweise hohe lokale Konzentrationen dieser Substanzen auf, daher dürften unter anderem im Dünndarm und Kolon wesentliche bioaktive Wirkungen zu erwarten sein [Kahle *et al.*, 2006].

In dieser Arbeit sollte die Auswirkung der Verkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen eines anthocyanreichen Heidelbeerextrakts (HBE) sowohl analytisch als auch auf Basis der biologischen Wirksamkeit erfasst werden. Die Verkapselung zielt daher einerseits auf die Stabilisierung sensitiver Naturstoffe in Lebensmitteln und andererseits auf eine Modulation der lokalen Verfügbarkeit bzw. die kontrollierte Freisetzung dieser Substanzen im GIT ab. Da in vorausgegangenen Arbeiten des Arbeitskreises insbesondere anthocyanreiche Extrakte potentiell bioaktive Wirkungen aufwiesen [Teller *et al.*, 2009b, Esselen *et al.*, 2011a,b], wurde das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf den Anthocyananteil der HBE-Polyphenole gelegt.

Anthocyanfreisetzung aus Kapseln

Um die biologischen Wirkungen des verkapselten HBE in *in vitro*-Untersuchungen interpretieren zu können ist die Kenntnis über die Konzentration bioaktiver HBE-Inhaltsstoffe im Zellkulturmedium während der Inkubation notwendig. Untersucht wurden hierbei ausschließlich die einzelnen Anthocyane des HBE mittels HPLC-DAD-Analyse. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Freisetzung dieser Substanzen stark abhängig vom gewählten Verkapselungssystem ist und von einem raschen Abbau im neutralen Medium überlagert wird. Aus den verhältnismäßig kleinen MPK ($x_{50,3} = 52 - 412 \mu\text{m}$) wurde eine extrem schnelle Anthocyanfreisetzung innerhalb weniger Minuten beobachtet (Abbildung 25A), während die Freisetzung aus den deutlich größeren PHK ($d = 1 - 3 \text{ mm}$) bis zu 60 min benötigte (Abbildung 26A).

Die diffusionsbasierte Freisetzung von Substanzen aus sphärischen Partikeln ist abhängig

von deren volumenspezifischen Oberfläche S_v , die sich wiederum reziprok proportional zum Sauterdurchmesser¹ $x_{1,2}$ der Partikel verhält (Formel 4.1).

$$S_v = \frac{6}{x_{1,2}} \quad (4.1)$$

Die freigesetzte Masse der eingebetteten Substanz $\dot{m}$ ist wiederum proportional zur Übertragungsfläche S_v . Darüber hinaus ist $\dot{m}$ abhängig vom Konzentrationsunterschied der Substanz zwischen Kapselmatrix (c) und Zellkulturmedium (c_F). Somit gilt der Zusammenhang in Formel 4.2 [Baehr, 2010].

$$\dot{m} \propto \frac{6}{x_{1,2}} \times |c - c_F| \quad (4.2)$$

Die schnelle Freisetzung aus MPK ist folglich über die größere Übertragungsfläche S_v und eine höhere Anthocyanbeladung c zu erklären (Die Extraktabsolutkonzentration im Kulturmedium wurde konstant gehalten, indem entsprechend weniger Kapseln eingesetzt wurden). Darüber hinaus ist auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Kapselmatrix zu berücksichtigen, sodass die Freisetzung der Anthocyane nicht ausschließlich von Partikelgröße und der Beladung abhängig ist.

Nach Integration der Flächen unter den Konzentrationsverläufen (AUC) in Abbildung 27B zeigte sich, dass die Anthocyanmenge im Zellkulturmedium nach Inkubation mit MPK (bei gleicher Ausgangskonzentration) über die Zeit signifikant höher ($119 \pm 10 \%$) war als für den unverkapselten Extrakt (100%). Die AUC resultierend aus Anthocyanen des PHK-Systems war dagegen signifikant verringert ($75 \pm 3 \%$).

MPK scheinen sich somit stabilisierend auf die Anthocyane des HBE auszuwirken (Abbildung 27B). Fehler durch eine möglicherweise erhöhte Beladung der Kapseln konnten ausgeschlossen werden, da der Anthocyananteil der Kapseln im Vorfeld der Untersuchung ermittelt wurde. Die Stabilisierung ist vermutlich auf den Proteingehalt der Kapseln zurückzuführen. Die Proteinassoziation und die damit verbundene Stabilisierung von Polyphenolen wurde in mehreren Studien nachgewiesen. In einer Struktur-/Aktivitätsuntersuchung zeigten Xiao *et al.* [2011] die Affinität einer Vielzahl an monomeren Flavonoiden zu γ -Globulin auf. Die Hydroxylierung des B-Ringes führte in ihren Untersuchungen zu einer Erhöhung der Proteinaffinität. Die Einführung von Methoxygruppen verringerte diese Affinität jedoch deutlich. Anthocyane wurden in diese Untersuchung jedoch nicht eingeschlossen. Die Proteinbindung von Polyphenolen kann sehr unterschiedlich ausfallen: So wiesen Rehse *et al.* [1981] für das Cumarin Warfarin eine sehr hohe Proteinbindungsaffinität auf. In ihrer Studie zeigten sie, dass 99,5 % des Cumarins an humanes Serumalbumin gebunden werden. Boulton *et al.*

¹Sauterdurchmesser: Kenngröße zur Partikelgrößenverteilung von Feststoffen und zerkleinerten Flüssigkeiten (z. B. Sand, Sprays oder Emulsionen). Sie ist definiert als Durchmesser einer Kugel, die das selbe Volumen/Oberflächenverhältnis besitzt, wie die Gesamtheit der Partikel des betrachteten Stoffgemisches [DIN ISO 9276-2 (D), 2006].

[1998] zeigten, dass auch die Art des Proteins für die Bindungsaffinität von Polyphenolen entscheidend ist. So war in ihrer Untersuchung das Flavonol Quercetin zu 99,4 % mit humanem Plasmaalbumin assoziiert, jedoch nur zu 39,2 % mit α_1 -saurem Glycoprotein. Viljanen *et al.* [2005] untersuchten die Proteinbindung von Anthocyanen in proteinstabilisierten O/W-Emulsionen. Sie zeigten eine Assoziation von bis zu 20 % der gelösten Anthocyane an Proteine in den O/W-Grenzflächen. Ackermann [2010] konnte dagegen eine Bindung von 70–84 % gelöster Anthocyane (in Abhängigkeit der Struktur) an humanes Serumalbumin nachweisen. Darüber hinaus konnte er eine stabilisierende Wirkung der Proteinassoziation auf die Anthocyane zeigen. Die Bindung konnte durch Säuredenaturierung wieder aufgelöst werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass Anthocyane sowie Polyphenole mit ähnlichen Struktureigenschaften an Proteine binden. Diese Assoziation wird wahrscheinlich über Hydroxygruppen des B-Rings vermittelt. Diese reversible Bindung könnte zu einem verminderten Abbau bzw. einer verringerten Reaktionsfähigkeit gegenüber anderen Substanzen führen. Die beobachtete, stabilisierende Wirkung der MPK könnte somit aus einer Proteinassoziation resultieren.

Der Abbau der Anthocyane nach Freisetzung aus den Kapselsystem wurde durch Ansäuern für die HPLC-Quantifizierung abgestoppt. Anthocyane, die mit löslichem Protein im Zellkulturmedium assoziiert vorlagen, konnten aufgrund der sauren Proteindenaturierung gelöst und folglich erfasst werden. Die Freisetzungskurven stellen somit den kompletten Gehalt im Zellkulturmedium dar, unabhängig davon, ob die Anthocyane mit löslichem Protein (freigesetzt aus den Kapseln) assoziiert waren oder nicht. Die Inkubationen wurden ohne Zusatz von FKS durchgeführt, eine Assoziation an Serumproteine konnte folglich ausgeschlossen werden.

Die Proteinassoziation schien einen stabilisierenden Effekt auf die Anthocyane auszuüben. Somit sind die AUC, gemessen mittels HPLC-Analyse, im Vergleich zum unverkapselten Extrakt und Extrakt in PHK größer. Diese Assoziation könnte unter Umständen die Bioaktivität des HBE verringern, da wirksame Inhaltsstoffe in proteingebundener Form nicht mehr zur Interaktion mit potentiellen Zielen (Beispielsweise Rezeptoren auf der Zelloberfläche) zur Verfügung stehen. Die Freisetzung der Anthocyane (und anderer bioaktiver Inhaltsstoffe) gibt somit Anhaltspunkte für eine mögliche Modulation der Bioaktivität durch die Formulierung (Beispielsweise die Menge und Freisetzungsrates verfügbarer Substanzen). Eine Testung in biologischen Systemen, wie diese anschließend erfolgte, ist jedoch unabdingbar, um die Wirkung der Verkapselung auf das Bioaktivitätsprofil des HBE abzuschätzen.

Biologische Wirksamkeit der extraktbeladenen Kapseln *in vitro*

Die biologische Wirksamkeit des HBE nach Verkapselung wurde in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen hinsichtlich potentiell bioaktiver Eigenschaften betrachtet. Die Bioaktivität wurde anhand der EGFR-Hemmwirkung im zellulären System, der Wachstumshemmung von Kolonkarzinomzellen und dem Einfluss auf die Aktivität von Topoisomerasen untersucht. Eine

Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Übersicht der Ergebnisse hinsichtlich der Freisetzung und der Modulation der Bioaktivität des HBE aus verschiedenen Kapselsystemen. Effekte in Relation zum unverkapselten HBE: – kein Effekt; ↓ moderate Unterdrückung; ↓↓ starke Unterdrückung; n. u.: nicht untersucht. HBE: unverkapselter Heidelbeerextrakt; MPK: Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln; PHK: Pektinamidbasierte Hohlkapseln; DMH: Doppelemulsionsbasierte, multidisperse Hüllkapseln.

Untersuchung	HBE	MPK	PHK	DMH
Anthocyanfreisetzung				
- Zeit	sofort	< 5 min	~ 1 h	≫ 1 h
- AUC	100 %	119 %	75 %	n. d.
EGFR-Aktivität				
- intakt	↓↓↓	–	↓	–
- aufgeschlossen	–	–	↓↓↓	n. u.
- nach <i>ex vivo</i> Verdau	–	–	–	n. u.
Zellwachstum				
	↓	↓	↓	↓↓↓
Topoisomerase-aktivität				
	–	–	–	–

Die Bioaktivität des HBE wurde in Abhängigkeit der untersuchten biologischen Endpunkte durch Verkapselung unterschiedlich moduliert: Prinzipiell wurde die biologische Wirksamkeit nicht erhöht, sondern blieb entweder konstant oder wurde durch die jeweilige Formulierung reduziert. Substanzielle Verluste der Bioaktivität wurden insbesondere hinsichtlich der EGFR-Hemmwirkung des unverkapselten HBE (Abbildung 28A und B) nach Formulierung in MPK (Abbildungen 73A und B sowie 74A und B) und DMH verzeichnet (Abbildung 34). Die Verkapselung in PHK verringerte die EGFR-Hemmwirkung des Extrakts deutlich (Abbildung 33A), nach mechanischem Aufschluss dieses Systems konnte jedoch die Bioaktivität des Extrakts vollständig wieder hergestellt werden (Abbildung 33A). In Bezug auf die Wachstumshemmung von HT29-Zellen zeigten die extraktbeladenen Systeme MPK und PHK eine vergleichbare Wirkung wie der unverkapselte HBE (Abbildung 39), extraktbeladene DMH verringerten das Wachstum der Zellen sogar stärker (Abbildung 38B).

Hinsichtlich der Modulation der Bioaktivität spielten somit Freisetzungszeit und Kapselmaterial eine Rolle. Im Hinblick auf den kurzfristigen Effekt (45–180 min) der EGFR-Hemmung wurde nach Inkubation mit intakten Kapseln eine Reduktion der biologischen Wirksamkeit festgestellt, die mit der Freisetzungsgeschwindigkeit der Extraktbestandteile negativ korrelierte (Tabelle 18). In der Untersuchung der Wachstumshemmung, die einen längerfristigen Effekt (72 h) des HBE reflektiert, spielte die Freisetzungsgeschwindigkeit des HBE-Bestandteile hingegen eine untergeordnete Rolle.

Dieser Wirkung stand der Einfluss des Kapselhüllmaterials gegenüber. Besonders auffällig war die Reduktion der EGFR-Hemmwirkung des HBE nach Verkapselung in MPK (Abbildungen 73A und B sowie 74A und B), obwohl die enthaltenen Anthocyane bereits nach kurzer Zeit (≤ 5 min) freigesetzt waren (Abbildung 25A und B). Für die Verringerung der biologischen Wirksamkeit durch Proteinverkapselung können zwei Hypothesen aufgestellt

werden: 1.) Verluste bioaktiver Inhaltsstoffe während des Verkapselungsprozesses und 2.) die verzögerte Freisetzung bzw. „*Trapping*“ solcher Substanzen in der Kapselmatrix.

Kondensierte Tannine (oligomere und polymere Proanthocyanidine, Abschnitt 2.4.3) wirken aufgrund ihrer hohen Anzahl an vicinalen Hydroxygruppen denaturierend auf Proteine und sind für die Adstringenz vieler Beerenfrüchte verantwortlich. In mehreren Studien konnten Tanninen sowohl antioxidative als auch chemopräventive Eigenschaften zugeschrieben werden [Kenny *et al.*, 2004, Gossé *et al.*, 2005, Saito *et al.*, 2005]. Fridrich *et al.* [2007a] konnten oligomere Procyanidine als potente Inhibitoren des EGFR identifizieren. Die Hemmwirkung war sowohl am isolierten Rezeptor (ELISA) als auch in HT29-Zellen im niedrigen mikromolaren Bereich zu beobachten. Auch hydrolysierbaren Tanninen, wie Ellagtanninen, konnte eine potente, hemmende Wirkung gegenüber der EGFR-Aktivität zugeordnet werden [Fridrich *et al.*, 2008a]. Der Tanninanteil könnte folglich mitverantwortlich für die EGFR-Hemmwirkung des HBE sein.

Bereits während der MPK-Herstellung wurde ein Verlust des Tanninanteils des HBE beobachtet [persönliche Mitteilung Michael Betz]: Während der Erstellung der wässrigen Grundlösung aus Molkenprotein und HBE bildete sich ein Präzipitat, das durch Zentrifugation abgetrennt wurde (Abbildung 61). Dieses bestand neben unlöslichen HBE-Bestandteilen zu 64 % aus Tannin/Protein-Komplexen (6,65 % der ursprünglichen Lösung). Das Ausfällen der Tannine während der Kapselproduktion in Kombination mit weiteren Faktoren wie Abbau oder Polymerisierung der Anthocyane, könnte den substanziellen Verlust der Bioaktivität des HBE aus den MPK erklären.

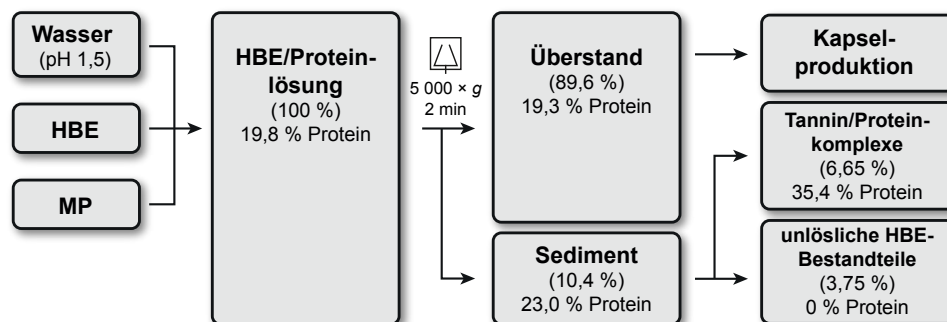


Abbildung 61: Verlust von Tanninen und unlöslicher HBE-Bestandteile bei der Erzeugung der HBE/Molkenproteinlösung für die Kapselproduktion. MP: Molkenprotein. [persönliche Mitteilung Michael Betz].

Die Untersuchungen der HBE/Protein-Koinkubationen (Abbildung 31) unterstreichen diese Hypothese. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die biologische Wirksamkeit der HBE-Inhaltsstoffe in Kombination mit Proteinen substanziell vermindert wird, obwohl Proteinlösungen auf Anthocyane generell eine stabilisierende Wirkung ausüben [Ackermann, 2010, Schantz, 2011]. Dies könnte auf die Ausbildung irreversibler Tannin/Proteinagglomerate oder die reversible Komplexbildung von Anthocyanen durch Proteine zurückzuführen sein [Ackermann, 2010]. Beide Stoffklassen wären somit während der Inkubation nicht in der Lage, mit Zellen in Interaktion zu treten und ihre biologische Wirksamkeit zu vermitteln. Da der

HBE nicht vollständig charakterisiert wurde, müssen weitere, eventuell noch unaufgeklärte bioaktive Substanzen in Betracht gezogen werden, die im Gegensatz zu Anthocyanen nicht in der Lage sind, die Proteingelmatrix im untersuchten Zeitfenster über diffusionsbasierte Prozesse zu verlassen. Einen Hinweis darauf könnte die Inkubation mit intakten MPK3 geben (Abbildung 32). In dieser Untersuchung wurden Anthocyane aus den MPK innerhalb von Minuten freigesetzt, während die Tannine wahrscheinlich fest mit dem Kapselmateriale assoziiert waren. Die Rezeptoraktivität wurde nach zwei Stunden, wenngleich schwächer als durch unverkapselten Extrakt, gehemmt. Dies könnte durch weitere, unaufgeklärte Substanzen vermittelt worden sein, die langsamer als die untersuchten Anthocyane aus den Kapseln freigesetzt wurden. Die *in vitro*-Untersuchung ohne enzymatischen Aufschluss der Kapseln stellt in dieser Hinsicht ein besonders artifizielles System dar und spiegelt die physiologischen Vorgänge im Darmlumen nicht wider.

Das Hüllmaterial der aufgeschlossenen PHK schien einen deutlich kleineren Einfluss auf die biologische Wirksamkeit des HBE zu vermitteln (Abbildung 33A). Obwohl die Komplexbildung von Tanninen mit Pektinen beschrieben ist [Taira *et al.*, 1997], scheint diese im Falle der PHK keinen Einfluss zu haben. Die Tannine des HBE sind vor allem im flüssigen Kern der Kapseln lokalisiert. Diese sind jedoch lediglich von einer dünnen Pektinhülle umgeben, die im Vergleich zum Volumen der Kapseln eine kleine Oberfläche besitzt. Die Tanninbindungsstellen der Kapselhülle könnten somit schnell abgesättigt sein, ohne dass eine nennenswerte Verringerung der Gerbstoffkonzentration in den Kapseln erfolgt.

Schantz [2011] untersuchte den Einfluss derselben Verkapselungsmethoden auf das antioxidative Potential des HBE. Die Untersuchungen wurden in Caco-2-Zellen (Kolonkarzinomzellen) über 1 bzw. 24 h Inkubation durchgeführt. Für die Einordnung der Modulation der Bioaktivität wurden drei biologische Endpunkte untersucht:

- Die Unterdrückung menadioninduzierter, oxidativer DNA-Schäden wurde im Comet-Assay [Singh *et al.*, 1988, Collins *et al.*, 1996] untersucht. Der unverkapselte HBE wies sowohl nach 1 h als auch 24 h insbesondere in niedrigen Konzentrationen (5–10 µg/ml) eine protektive Wirkung hinsichtlich der DNA-Schädigung durch Menadion auf. Während nach 1 h Inkubation keine oder lediglich geringe Effekte beobachtet wurden, lag die gemessene Unterdrückung der DNA-Schäden durch HBE aus MPK und PHK nach 24 h im Bereich der Wirksamkeit des unverkapselten Extrakts.
- Die Modulation menadioninduzierter GSH-Depletion wurde nach einer Methode von Gallagher *et al.* [1994] bestimmt. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der HBE lediglich in hohen Konzentrationen (250–500 µg/ml) nach 24 h Vorinkubation in der Lage war, den GSH-Spiegel leicht, jedoch nicht signifikant anzuheben. HBE aus allen untersuchten Kapselsystemen (MPK, PHK und DMH) führte nach 24 h zur gleichen tendenziellen Erhöhung der GSH-Konzentration.
- Die Reduktion *t*-BHQ-vermittelter ROS durch unverkapselten und formulierten HBE wurde im Dichlorfluoresceinassay [Wang und Joseph, 1999] ermittelt. Der unverkapselte

HBE verringerte in hoher Konzentration (500 µg/ml) sowohl nach 1 h als auch 24 h Inkubation intrazelluläre ROS signifikant. HBE aus den Systemen MPK und PHK zeigten unabhängig der Inkubationszeit den gleichen Effekt.

Die Untersuchungen von Schantz zeigten folglich für die meisten untersuchten Endpunkte, dass die biologische Aktivität des Extrakts durch die Verkapselung nicht beeinflusst wird. In der Untersuchung zur DNA-protektiven Wirkung (Comet-Assay) wurde jedoch eine Verringerung der Wirksamkeit des HBE nach Verkapselung beobachtet. Eine Erhöhung der biologischen Wirksamkeit konnte, in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit, in den Untersuchungen von Schantz nicht festgestellt werden.

Die Effekte, die in den verschiedenen Assays von Schantz [2011] und der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden, sind wahrscheinlich auf jeweils unterschiedliche Substanzen bzw. Substanzklassen des HBE zurückzuführen. Diese unterscheiden sich, entsprechend ihrer chemischen Natur, im Freisetzungsverhalten aus den Kapseln. Die Verkapselungsmethoden haben folglich, je nach betrachtetem biologischen Endpunkt, einen unterschiedlichen Effekt auf die biologische Wirksamkeit des HBE.

Kapselaufschluss durch *ex vivo*-Fermentation

Nach Inkubation der Kolonkarzinomzellen wurde ein substanzieller Verlust der EGFR-Hemmung des HBE durch Formulierung in die Kapselsysteme festgestellt. Das *in vitro*-Zellkulturmodell bildet aufgrund fehlender Verdauungsenzyme den physiologischen Zustand im GIT, insbesondere hinsichtlich makroskopischer Strukturen wie den Kapselpartikeln, nur unzureichend ab. In einem weiterführenden Versuchsansatz wurden daher Kapseln vor der eigentlichen Zellinkubation einer anaeroben *ex vivo*-Fermentation mit Ileostoma-ausfluss unterzogen. Die Anwesenheit aktiver Verdauungsenzyme im Inkubationsmedium erforderte den deaktivierenden Einsatz von FKS während der Zellbehandlung. Die EGFR-Aktivitätsanalyse musste daher unter diesen Bedingungen neu etabliert werden. Sowohl HBE (400 µg/ml) als auch Tyrphostin AG 1478 (1 µM) waren unter diesen Bedingungen in der Lage, die EGFR-Aktivität potent zu unterdrücken (69 ± 16 bzw. 9 ± 3 % (T/C)). Nach *ex vivo*-Fermentation wurden jedoch sowohl für den unverkapselten HBE als auch für die extraktbeladenen Kapselsysteme der vollständige Verlust der biologischen Wirksamkeit festgestellt (Abbildung 36A–C).

Die glycolytische Spaltung von Polyphenolglycosiden durch *ex vivo*-Verdau mit Ileostoma-ausfluss wurde von Knaup *et al.* [2007] gezeigt. Für Quercetinglycoside konnten sie folgende Reihenfolge der Stabilität im Fermentationsansatz aufstellen: Que-3-glc $\ll$ Que-3-gal < Que-3-xyl < Que-3-arab. Que-3-rham wurde dagegen nicht gespalten. Die Spaltung von Que-3-glc lief innerhalb der ersten 2 h der Inkubation vollständig ab. Darüber hinaus konnten die Autoren in weiterführenden Untersuchungen mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) zeigen, dass die hydrolytische Spaltung der Quercetinglycoside ausschließlich auf die mikrobielle Aktivität zurückzuführen ist und nicht auf freie Enzyme.

Die im Dünndarm vorkommende β -Glucosidase LPH (Abschnitt 2.4.4) ist membran-gebunden und somit nicht im Ileostomaausfluss zu erwarten. Humane sowie mikrobielle Glycosidasen zeigen in der Regel keine hohe Spezifität für das gebundene Aglycon [Voet und Voet, 2004]. In diesem Kontext ist davon auszugehen, dass Anthocyane (Glucoside, Galactoside und Arabinoside) und andere Flavonoidglycoside des HBE durch die Glycosidaseaktivität während des *ex vivo*-Ileostomaverdaus der vorliegenden Untersuchung gespalten wurden. Anthocyanidinglucoside, die den größten Anteil der Anthocyane darstellen, wurden dabei vermutlich am schnellsten hydrolysiert. Da Anthocyanidine im Vergleich zu den glycosidisch gebundenen Anthocyanen eine deutlich höhere Bioaktivität aufweisen (Abschnitt 4.3), wäre zu vermuten, dass die Bioaktivität des HBE durch die Hydrolyse während des *ex vivo*-Verdaus erhöht wird.

Der beobachtete Verlust der Bioaktivität des HBE durch den *ex vivo*-Verdau (Abbildung 36A) stimmt mit dieser Annahme nicht überein. Für diese Beobachtung können verschiedene Ursachen angeführt werden:

- Anthocyanidine sind instabiler als Anthocyane. Noch während ihrer Bildung beim *ex vivo*-Verdau wurden diese vermutlich weiter abgebaut. Dazu trug einerseits der vergleichsweise hohe pH-Wert (pH 6,3) und andererseits die mikrobielle Aktivität bei. Keppler und Humpf [2005] wiesen den mikrobiellen Abbau von verschiedenen Anthocyanen zu den entsprechenden Phenolcarbonsäuren und Aldehyden in porzinem Caecum nach. Anthocyanidine wurden dabei nur in geringem Maße nachgewiesen. In vorausgegangenen Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit von Anthocyanidinen wurden diese zu Beginn der Inkubation in hoher Konzentration eingesetzt (50–100 μ M) [Fridrich *et al.*, 2008b, Teller *et al.*, 2009a]. In den hier gezeigten Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass die aus Anthocyanen freigesetzten Anthocyanidine bereits vor Beginn der Zellinkubation in erheblichem Maße abgebaut wurden und die Anthocyanidinkonzentrationen während der Inkubation somit gering waren.
- Anthocyane bzw. Anthocyanidine spielen für die Bioaktivität des HBE eventuell nur eine untergeordnete Rolle. Andere bioaktive Substanzen des HBE, wie Tannine, könnten mit Proteinbestandteilen des Fermentationsansatzes abreagieren, wodurch die Bioaktivität des HBE verringert würde. Der Proteingehalt des Verdauungsansatzes wurde nicht bestimmt. Obwohl ein großer Teile der Nahrungsproteine nach Beendigung der Dünndarmpassage resorbiert sein sollte, kann davon ausgegangen werden, dass neben sezernierten Proteinen auch unverdauliche Proteine aus der Nahrung den Dünndarm verlassen. Diese Proteine könnten bioaktive Substanzen des HBE abfangen (Abschnitt 4.2.1).

Der *ex vivo*-Verdau der Kapseln konnte die biologische Aktivität des HBE nicht wieder herstellen. Der Verlust der Aktivität ist vermutlich analog zum unverkapselten HBE zu bewerten. Der mikrobielle Abbau von Inhaltsstoffen sowie die Bindung gerbender Bestandteile an Proteine resultierte möglicherweise in einer substanziellen Reduktion bioaktiver Komponenten

und spiegelte sich in der verringerten Fähigkeit, die EGFR-Aktivität zu unterdrücken, wider. Untersuchungen mit proteinfreien, spezifisch zusammengesetzten Verdauungsmedien müssen angeschlossen werden, um die biologische Wirkung matrixgebundener HBE-Inhaltsstoffe in Proteinkapseln abschließend zu beurteilen.

Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen

Der Einfluss der Verkapselung auf das wachstumshemmende Potential des HBE wurde im SRB-Assay (für MDH) bzw. Trypanblauausschlusstest (für MPK und PHK) untersucht. Die Verkapselung in MPK und PHK hatte im untersuchten Konzentrationsbereich (100–400 µg/ml) keinen vermindernenden Einfluss auf die Wirksamkeit des Extrakts (Abbildung 39). Die Verkapselung in DMH bewirkte sogar eine leichte Steigerung dieses Parameters ($IC_{50} = 323 \text{ µg/ml}$ (HBE) gegenüber 105 µg/ml (DMH); Abbildung 38B). Diese Daten stehen somit scheinbar im Widerspruch zur EGFR-Hemmwirkung, bei der für intakte MPK und DMH ein kompletter und für intakte PHK zumindest ein teilweiser Verlust der biologischen Wirksamkeit beobachtet wurde. Diese Beobachtung könnte auf mehrere Ursachen beruhen:

- Die Freisetzungsgeschwindigkeit könnte für kurzfristige Effekte, wie dies bei der EGFR-Hemmung der Fall ist, eine deutlich größere Rolle als für den längerfristigen Effekt der Wachstumshemmung spielen. Die Freisetzungszeit der Extraktbestandteile lag für PHK in der Größenordnung der Inkubationszeit bei der EGFR-Aktivitätsbestimmung, für DMH sogar darüber. Unter Umständen wurden bioaktive Nichtanthocyan-Extraktbestandteile nicht komplett freigesetzt, bevor der Assay beendet wurde. In der Untersuchung der Wachstumshemmung konnten aufgrund der langen Inkubationszeit alle Bestandteile, sofern sie nicht irreversibel am Kapselmaterial gebunden waren, in das Zellkulturmedium freigesetzt werden, sodass die Wirksamkeit des HBE nicht verringert wurde.
- Bestandteile, die am Kapselmaterial gebunden vorlagen, hätten sich innerhalb der langen Inkubationszeit (72 h) lösen können. Diskutiert wurde die Komplexierung von Tanninen an das Kapselprotein der MPK (Seite 121). Es wäre möglich, dass diese Substanzen durch Quellung oder langsames Zersetzen des Kapselmaterials während der langen Inkubation wieder freigesetzt wurden.
- Die Bildung von bioaktiven Intermediaten, beispielsweise Anthocyanidinen aus Anthocyanen durch glycolytische Spaltung, könnte in einem Zeitfenster erfolgen, dass nicht durch die Aktivitätsuntersuchungen des EGFR abgedeckt wurde. Im GIT werden Anthocyane mithilfe mikrobieller β -Glucosidasen bzw. epithelgebundener LPH hydrolysiert [Kay, 2006]. In steriler Umgebung wurde bislang jedoch keine Freisetzung der Aglyca beobachtet [Keppler und Humpf, 2005, Pérez-Vicente *et al.*, 2002]. Dennoch wäre es denkbar, dass in Anwesenheit von HT29-Zellen Anthocyanidine aus Anthocyanen freigesetzt werden. Dieser Vorgang würde jedoch langsam erfolgen und die gebildeten Anthocyanidine würden aufgrund ihrer geringen Stabilität schnell weiter

zerfallen. Hohe Anthocyanidinkonzentrationen, die zu einem Zeitpunkt nach 45 min eine Wachstumshemmung induzieren könnten, sind daher unwahrscheinlich. Untersuchungen von Kern *et al.* [2007] lassen jedoch darauf schließen, dass die Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch Anthocyanidine nicht durch deren intakte Struktur, sondern über unbekannte Abbauprodukte vermittelt wird. Diese könnten für Anthocyane und Anthocyanidine identisch sein. Die Unterdrückung des Zellwachstums durch eine Reduktion der EGFR-Aktivität bei $t \geq 45$ min wäre daher denkbar.

- Die EGFR-Hemmung und die Reduktion des zellulären Wachstums stehen möglicherweise nicht in einem kausalen Zusammenhang. Weitere zelluläre Mechanismen, wie die Induktion von Apoptose oder die Beeinflussung des Zellzyklus über andere RTK, besitzen ebenfalls einen Einfluss auf das Zellwachstum [Chen *et al.*, 2005, Seeram *et al.*, 2006, Oak *et al.*, 2006]. Die Prozesse der Rezeptoraktivitäts- und der Zellwachstumshemmung könnten folglich durch jeweils unterschiedliche Substanzen vermittelt werden. Voneinander abweichende Freisetzungs- bzw. Adhäsionsverhalten dieser Substanzen aus dem bzw. an das Kapselmaterial könnten die unterschiedlichen Effekte der verschiedenen Kapselsysteme erklären.

Einfluss auf die Aktivität von Topoisomerasen

Weiterhin wurde untersucht, ob während der Freisetzung der verkapselten Inhaltsstoffe hohe, lokale Substanzkonzentrationen auftreten, die in der Lage sind, adverse Effekte zu verursachen. Als Parameter hierfür wurde die stabilisierende Wirkung von Polyphenolen auf DNA/Topoisomeraseintermediate mittels ICE-Assay betrachtet.

Eine Stabilisierung von DNA/Topoisomeraseintermediaten wurde jedoch weder für den unverkapselten, noch für den formulierten HBE beobachtet. Dies zeigt sich in der Abwesenheit der Banden 5 – 15 im ICE-Bioassay nach Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern gegen die Topoisomerasen I, II α und II β (Abbildung 40).

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Esselen *et al.* [2011b]. Die Autoren zeigten, dass zwei verschiedene anthocyanreiche Beerenextrakte bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ die Bildung von DNA/Topoisomerasekomplexen in HT29-Zellen nicht beeinflusste. In der genannten Studie konnte jedoch eine potente katalytische Hemmwirkung gegenüber den humanen Topoisomerasen I und II der untersuchten Extrakte festgestellt werden. Die Hemmwirkung der Extrakte korrelierte dabei nicht mit deren Anthocyangehalt und wurde auf weitere, nicht charakterisierte Inhaltsstoffe zurückgeführt. Die Autoren führten Procyanidine, deren hemmende Wirkung gegenüber Topoisomerasen von Fridrich *et al.* [2007a] nachgewiesen wurde, als Beispiel an. Constantinou *et al.* [1995] identifizierten die HBE-Inhaltsstoffe Myricetin und Quercetin (Tabelle 6) als Topoisomeraseinhibitoren. Die katalytische Hemmung der Topoisomerasen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht als biologischer Endpunkt herangezogen, um die Modulation der Bioaktivität des HBE durch Verkapselung zu untersuchen. Das Einbringen der formulierten Systeme in reine Enzymassays erschien aufgrund der biologischen Relevanz als nicht aussagekräftig.

Die stabilisierende Wirkung der Heidelbeerinhaltsstoffe Quercetin und Myricetin auf DNA/Topoisomeraseintermediate und die damit verbundene DNA-Schädigung wurde in mehreren Studien beschrieben [Austin *et al.*, 1992, Constantinou *et al.*, 1995, López-Lázaro *et al.*, 2002, Bandele und Osheroff, 2007]. Bei den genannten Studien handelte es sich jedoch ausschließlich um zellfreie Untersuchungen. Die Verifizierung dieser Ergebnisse in zellbasierten Systemen steht noch aus. Obwohl Quercetin und Myricetin im untersuchten HBE enthalten waren, zeigte dieser weder vor noch nach Verkapselung eine stabilisierende Wirkung auf DNA/Topoisomeraseintermediate. Die Konzentration der Extrakte in den Untersuchungen waren unter Umständen jedoch zu niedrig, um eine giftige Wirkung auf Topoisomerasen zu beobachten. Auch nach der Freisetzung aus den Kapseln in das Zellkulturmedium traten möglicherweise keine lokal erhöhten Wirkstoffkonzentrationen auf, die eine topoisomerasegiftige Wirkung vermitteln würden.

Somit bleibt festzuhalten, dass die Formulierung des HBE in die untersuchten Kapselsysteme in relevanter Konzentration keine adversen Effekte hinsichtlich einer stabilisierenden Wirkung auf DNA/Topoisomeraseintermediate aufweisen. Im Falle einer topoisomerase-stabilisierenden Wirkung einer Substanz müsste nach Inkubation von Zellen von einer erhöhten DNA-Strangbruchrate ausgegangen werden. Die Daten der vorliegenden Arbeit werden daher durch Untersuchungen von Schantz [2011] gestützt, die keinen Hinweis auf eine DNA-schädigende Wirkung des HBE auch in hohen Konzentrationen (unverkapselt und in verschiedenen Systemen formuliert) im Comet-Assay ergaben.

Biologische Wirksamkeit unterschiedlicher HBE-Subfraktionen

In vorausgegangenen Studien wurde die biologische Wirksamkeit von Beerenfrüchten und daraus gewonnenen Extrakten im Wesentlichen auf den Anthocyangehalt zurückgeführt [Kähkönen und Heinonen, 2003, Weisel *et al.*, 2006, Teller *et al.*, 2009b]. Nach Untersuchung der extraktbeladenen Kapselsysteme stellte sich jedoch die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete *in vitro*-Aktivität des HBE ebenfalls den enthaltenen Anthocyanen zuzuschreiben ist. Folgende Beobachtungen sprachen gegen diesen ursächlichen Zusammenhang:

- Anthocyane aus extraktbeladenen MPK werden innerhalb sehr kurzer Zeit komplett freigesetzt (Abbildungen 25A). Trotzdem zeigten die Kapseln keine EGFR-Hemmwirkung auf (Abbildungen 30). Eine Ursache hierfür könnte allerdings die zuvor diskutierte Assoziation an Proteine, die aus den Kapseln in das Zellkulturmedium abgegeben werden, darstellen.
- Die Anthocyanfreisetzung aus PHK in das Zellkulturmedium ist nach 1 h abgeschlossen (Abbildung 26A). Eine signifikante Verringerung der EGFR-Aktivität durch HBE aus intakten PHK konnte jedoch erst nach 3 h beobachtet werden (Abbildung 33B). Die Hemmung durch freien Extrakt wurde bereits nach 45 min beobachtet (Abbildung 28A).
- In den Untersuchungen von Schantz [2011] konnte die antioxidative Wirkung des HBE in keinem der untersuchten biologischen Endpunkte auf den Anthocyananteil

zurückgeführt werden.

- Die Wachstumshemmung von HT29-Zellen durch polyphenolreiche Extrakte scheint nicht mit deren Anthocyangehalten zu korrelieren (Tabelle 15).

Die biologischen Wirkungen von Beerenextrakten sind folglich nicht zwingend auf deren Anthocyangehalt zu begrenzen, sondern könnten möglicherweise durch andere Substanzen vermittelt werden, die mit Anthocyanen assoziiert sind. So weisen viele Flavonoide ähnliche Polaritäten wie Anthocyane auf und sind somit in den entsprechenden Extrakten vertreten.

Die zuvor untersuchten proliferationsassoziierten Parameter der EGFR- und Tumorzellwachstumshemmung wurden daher verwendet, um das bioaktive Potential unterschiedlicher HBE-Subfraktionen (an- bzw. abgereichert an Anthocyanen) abzuschätzen. Die Subfraktionen wurden durch eine neuartige Auftrennung des HBE nach Juadjur und Winterhalter [2012] erhalten. Weiterhin wurden verschiedene, isolierte HBE-Inhaltsstoffe in die Untersuchungen miteinbezogen. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Einfluss getesteter HBE-Subfraktionen und isolierter Bestandteile auf die EGFR-Aktivität und das Wachstum von Tumorzellen. Effekte im Vergleich zum unverkapselten HBE: ↓↓↓↓ starke Unterdrückung; ↓↓ moderate Unterdrückung; ↓ schwache Unterdrückung; ↑ Induktion; – keine Modulation; n. u.: nicht untersucht; n. q.: nicht quantifiziert, aufgrund von Koelution mit Anthocyanen; AF: Anthocyanreiche Subfraktion; FF: Anthocyanabgereicherte Subfraktion; PF: Polymerreiche Fraktion; CF: Kopigmentfraktion; CFu: unpolare Kopigmentfraktion; CFp: polare Kopigmentfraktion; CGA: Chlorogensäure.

Substanz	Anteil an HBE	EGFR-Aktivität	Zellwachstum
HBE	100 %	↓↓↓↓	↓↓↓↓
AF	37,1 %	↓↓	↓↓
FF	49,8 %	↓↓↓↓	↓
PF	29,4 %	↓↓	↓↓
CF	15,2 %	↓↓	↓↓
CFp	6,3 %	–	↓
CFu	9,0 %	–	↓
Cyanidin	n. q.		
HT29-Zellen		↓↓	n. u.
A431-Zellen		↓↓	n. u.
Cy-3-glc	3,86 %		
HT29-Zellen		–	n. u.
A431-Zellen		–	n. u.
CGA	1,1 %	↑	n. u.

Die Inkubation mit der Äquivalenzkonzentration 200 µg/ml AF hatte keinen signifikanten Einfluss auf die EGFR-Aktivität in HT29-Zellen (Abbildung 44A). Aus Inkubation mit dieser AF-Menge resultiert eine Gesamtanthocyankonzentration von 108,5 µM (berechnet als Cy-3-glc-Äquivalente). Diese Ergebnisse sind somit in Übereinstimmung mit den zuvor

erhobenen Daten zum isolierten Anthocyan Cy-3-glc in HT29- und A431-Zellen (Abbildungen 41B und 42B). Die Inkubation mit Cy-3-glc bis 200 μM (HT29) bzw. 250 μM (A431) hatte in diesen Untersuchungen keine Verringerung der Rezeptoraktivität zur Folge. In einer vorausgegangenen Studie von Meiers *et al.* [2001] wurden die Anthocyane Cy-3-gal und Mv-3-glc am isolierten EGFR betrachtet. Auch in dieser Untersuchung wurde für diese Anthocyane keine Verringerung der Rezeptoraktivität bis zu Substanzkonzentrationen von jeweils 100 μM beobachtet.

In einer Studie von Rahman *et al.* [2006] wurde eine synergistische Wirkung zwischen verschiedenen Anthocyanen beschrieben. Der Synergismus unterschiedlicher Anthocyane muss deswegen in auch hinsichtlich der EGFR-Hemmwirkung in Betracht gezogen werden. Es wäre möglich, dass Cy-3-glc als Einzelsubstanz keine Aktivität besitzt, in Verbindung mit weiteren Anthocyanen jedoch eine Hemmwirkung vermittelt. Durch Inkubation mit AF, die als Konglomerat die native Anthocyanzusammensetzung des HBE widerspiegelte, konnte keine EGFR-Hemmwirkung erzielt werden. Es gibt damit keinen Hinweis auf einen Synergismus der Anthocyane untereinander als Beitrag zur Bioaktivität des HBE.

In hohen Konzentrationen wies AF ein EGFR-hemmendes Potential auf (Abbildung 44A), die komplette Unwirksamkeit der Anthocyane konnte folglich nicht bestätigt werden. Das Aglycon Delphinidin erwies sich als das Aglycon mit dem höchsten Hemmpotenzial gegenüber der EGFR-Aktivität und zeigte auch in vorausgegangenen Studien mit anderen Endpunkten die höchste Bioaktivität unter den Anthocyanidinen [Kähkönen und Heinonen, 2003, Marko *et al.*, 2004, Hou *et al.*, 2004]. Glycoside von Delphinidin wurden hinsichtlich der EGFR-Hemmwirkung bislang weder im zellulären System noch am isolierten EGFR untersucht. Diese Glycoside könnten aufgrund der deutlich stärkeren Hemmwirkung ihrer Aglyca ebenfalls eine hemmende Wirkung aufweisen. In weitergehenden Untersuchungen sollten daher isolierte Delphinidinglycoside in Bioaktivitätsstudien hinsichtlich der Unterdrückung der EGFR-Aktivität integriert werden. In AF enthaltene freie Anthocyanidine sind in sehr geringen Konzentrationen enthalten (Tabelle 16), dass sie selbst in der hohen untersuchten Konzentration von AF keinen Beteiligung an EGFR-hemmenden Wirkung bitzen dürften (Anthocyanidinkonzentrationen in 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Realkonzentration: 0,3–2,3 μM).

Die Isolierung der Anthocyane nach Juadjur und Winterhalter [2012] beinhaltet einen neutralen Elutionsschritt, bei dem eventuell ein geringer Teil der Anthocyane abgebaut werden könnte. Dies würde insbesondere Glycoside von Delphinidin betreffen, da diese unter neutralen Bedingungen besonders instabil sind (Abbildung 24). Ein möglicher Verlust von (hypothetisch aktiven) Delphinidinglycosiden bei der Anthocyanisolation könnte dazu beitragen, dass von AF nur eine geringe Bioaktivität ausgeht. Diese Annahme ist jedoch rein spekulativ, da die Anthocyanzusammensetzung dieser Fraktion aufgrund der Materiallimitierung nicht bestimmt werden konnte.

Die Untersuchung des Aglycons Cyanidin zeigte in beiden untersuchten Zelllinien (HT29 und A431) eine potente Unterdrückung der EGFR-Aktivität (Abbildungen 41A und 42A). Allerdings war die beobachtete EGFR-Hemmwirkung deutlich niedriger als die von Delphinidin in vorausgegangenen Untersuchungen [Fridrich *et al.*, 2008b, Teller *et al.*, 2009a]. Der

Mechanismus der EGFR-Hemmung durch Anthocyanidine ist bislang noch nicht aufgeklärt. Einen wichtigen Einfluss scheint die Substitution des B-Rings zu besitzen [Meiers *et al.*, 2001, Marko *et al.*, 2004]. Delphinidin ist deutlich instabiler als Cyanidin [Kern *et al.*, 2007]. Ein Einfluss der Bildungsrate von Abbauprodukten auf die Aktivität einzelner Anthocyanidine wäre daher denkbar. Dieser Ansatz könnte auch die Inaktivität der Anthocyane erklären, da diese durch die glycosidische Bindung in der Zellkultur deutlich stabilisiert werden. Die verschiedenen Phenolcarbonsäuren, die durch den Abbau von Anthocyanidinen entstehen, zeigten, mit Ausnahme von Gallussäure ($IC_{50} = 189 \pm 15 \mu\text{M}$), gegenüber dem isolierten EGFR keine Hemmwirkung [Kern *et al.*, 2007]. Das gemeinsame Abbauprodukt aller Anthocyane bzw. Anthocyanidine, Phloroglucinolaldehyd, wird hauptsächlich durch den intestinalen, mikrobiellen Abbau gebildet und konnte nach spontanem Zerfall der Anthocyanidine im Zellkulturmedium bislang nicht nachgewiesen werden. Der Abbau von Anthocyanen resultiert jedoch nicht ausschließlich in der Bildung von Phenolcarbonsäuren. So konnten bisher nur $\sim 20\%$ des Anthocyanabbaus auf die Bildung von Phenolcarbonsäuren zurückgeführt werden, wobei nicht auszuschließen ist, dass möglicherweise weitere Metabolite, die eine EGFR-hemmende Wirkung vermitteln, gebildet werden [Keppler und Humpf, 2005, Kern *et al.*, 2007].

HBE enthält neben Anthocyanen auch freie Anthocyanidine. Die Konzentrationen dieser Substanzen sind jedoch sehr gering (Tabelle 16), sodass sie wahrscheinlich keinen wesentlichen Beitrag zur biologische Aktivität hinsichtlich der EGFR-Hemmung im zellulären System leisten. Darüber hinaus werden enthaltene Anthocyanidine durch die Methode nach Juadgur und Winterhalter [2012] in AF angereichert. Für diese Subfraktion konnte jedoch keine EGFR-Hemmwirkung in der Äquivalenzkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ gezeigt werden (Abbildung 44A). Diese Beobachtung unterstreicht die Annahme, dass Anthocyanidine an der EGFR-Hemmwirkung des HBE bei Kurzzeitinkubation eine untergeordnete Rolle spielen.

Im Gegensatz zu AF wies der anthocyanfreie Anteil der HBE-Inhaltsstoffe (FF) in der Äquivalenzkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ eine potente EGFR-Hemmwirkung auf (Reduktion auf $51 \pm 11\%$ (T/C), Abbildung 44B). Die EGFR-hemmende Wirkung des nativen HBE bei $200 \mu\text{g/ml}$ (Reduktion auf $45 \pm 14\%$ (T/C)) konnte nahezu vollständig auf FF zurückgeführt werden.

FF enthält insbesondere Flavonole, darunter Quercetin und Myricetin, sowie Glycoside dieser beiden Verbindungen in niedrigen Konzentrationen (Tabelle 16). Die EGFR-hemmende Wirkung von Quercetin wurde von Fridrich *et al.* [2007b] in HT29- und A431-Zellen untersucht. Insbesondere in HT29-Zellen wies Quercetin eine potente Hemmwirkung mit einem IC_{50} -Wert von $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ auf. Die Inkubation mit FF in einer Äquivalenzkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ resultiert in einer Quercetinkonzentration von $5,3 \mu\text{M}$. Die Bioaktivität von FF und folglich von HBE könnte somit zumindest teilweise auf den Quercetinanteil des Extrakts zurückgeführt werden. Allerdings wurde Quercetin in der Studie von Fridrich *et al.* [2007b] ohne Zugabe von Katalase untersucht. Wie andere Polyphenole auch, ist Quercetin in der Lage, H_2O_2 zu generieren und folglich experimentelle Artefakte in *in vitro*-Assays zu verursachen (Abschnitt 2.4.6). In einer weiteren Studie von Bhatia *et al.* [2001] konnte die

EGFR-Aktivität in A431-Zellen durch Inkubation mit 200 μM Quercetin dagegen lediglich um 20–30 % reduziert werden. Auch in dieser Studie wurde die Inkubation ohne Katalase durchgeführt. Die EGFR-Hemmwirkung von Quercetin unterscheidet sich somit zwischen verschiedenen Studien erheblich. Weitere Untersuchungen unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen sind daher notwendig, um eine abschließende Aussage über den Beitrag des Quercetinanteils zur EGFR-Hemmwirkung des HBE zu treffen.

Der EGFR-hemmende Einfluss von Myricetin, das sich nur durch eine Hydroxygruppe am B-Ring von Quercetin unterscheidet, wurde bislang nur in wenigen Studien untersucht. Kumamoto *et al.* [2009] zeigten für Myricetin (20 μM) in murinen Epidermalzellen (JB6 P⁺) einen induzierenden Effekt auf die EGFR-Aktivität um das $\sim 1,5$ -fache. Die Wirkung von Myricetin würde somit der Aktivität von FF entgegenwirken. Die Myricetinkonzentration betrug nach Inkubation mit FF (200 $\mu\text{g/ml}$) 1,5 μM (Tabelle 16) und war damit deutlich niedriger als in der genannten Studie. Da sich die murinen JB6 P⁺-Zellen grundsätzlich von humanen HT29-Zellen unterscheiden, können die beobachteten Effekte nicht direkt verglichen werden. Somit müsste neben Quercetin auch der Beitrag von Myricetin an der Bioaktivität des HBE unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Im zellfreien System (ELISA) wurde für Quercetinglycoside eine EGFR-hemmende Wirkung aufgezeigt [Kern *et al.*, 2005]. Insbesondere Glucoside und Galactoside von Quercetin erwiesen sich dabei als potente Inhibitoren. Rhamnoside und Rutinoside wiesen dagegen nur eine niedrige Aktivität auf. Im Gegensatz dazu zeigten Fridrich *et al.* [2007b] für Quercetinglucosid keine EGFR-Hemmwirkung auf den isolierten EGFR (ELISA). Damit übereinstimmend zeigte Fridrich [2008] im zellulären System (HT29-Zellen), dass Quercetinglycoside aus Apfelsaftextrakt in Gegenwart von Katalase keinen Einfluss auf die EGFR-Aktivität ausüben. Der Anteil der Quercetinglycoside in HBE und FF ist darüber hinaus vergleichsweise gering (0,53–1,7 μM , Tabelle 16), sodass deren Einfluss selbst bei bestehender Aktivität als niedrig einzuordnen wäre.

Eine weitere Gruppe an Verbindungen, die in FF angereichert wurden, sind Phenolcarbonsäuren. Diese entstehen unter anderem als Abbauprodukte aus Anthocyanen (Abschnitt 2.4.2). Kern *et al.* [2007] konnten im zellfreien System (ELISA) aus dieser Substanzgruppe lediglich Gallussäure eine EGFR-Hemmwirkung mit einem IC_{50} -Wert von $189 \pm 15 \mu\text{M}$ zuordnen. Durch Inkubation von FF mit einer Äquivalenzkonzentration 200 μM würde allerdings nur eine Gallussäurekonzentration von 1,87 μM resultieren. Der Einfluss dieser Phenolcarbonsäure im zellulären System ist daher als vergleichsweise gering einzuschätzen.

Eine weniger gut charakterisierte Stoffgruppe in FF stellen oligo- und polymeren Proanthocyanidine dar. Diese treten im HPLC-Chromatogramm als undifferenzierter breiter Peak („polymer hump“) in Erscheinung [Juadjur und Winterhalter, 2012]. Insbesondere oligomere Procyanidine konnten bereits als potente EGFR-Inhibitoren identifiziert werden [Kern *et al.*, 2005, Fridrich *et al.*, 2007a]. Um den Einfluss dieser Substanzgruppe auf FF und folglich auf den HBE abschätzen zu können, wurde FF mittels Fraktionierung weiter in die Subfraktionen PF und CF unterteilt.

PF, die ausschließlich höhermolekulare Verbindungen, darunter polymere Proanthocyanidine enthält, hatte in der Äquivalenzkonzentration von 200 µg/ml nur einen moderat hemmenden Einfluss auf die EGFR-Aktivität im zellulären System (Unterdrückung auf 88 % (T/C), Abbildung 46A). In höherer Konzentration (200 µg/ml Realkonzentration $\cong$ 680 µg/ml Äquivalenzkonzentration) zeichnete sich jedoch eine potente Hemmwirkung ab (56 % (T/C)).

Dieses Ergebnis deckt sich damit weitgehend mit zuvor erhobenen Ergebnissen hinsichtlich der EGFR-Hemmwirkung von oligomeren Procyanidinen. Kern *et al.* [2005] konnten im zellfreien System eine moderat EGFR-hemmende Wirkung für dimere Procyanidine mit IC_{50} -Werten von 38–50 µM feststellen. Die Flavan-3-ole (+)-Catechine und (–)-Epicatechin (Grundbausteine der Procyanidine) zeigten dagegen keine hemmende Wirkung bis 300 µM. Auch Epigallocatechin (Grundbaustein der Prodelphinidine) wies mit einem IC_{50} -Wert von 297 ± 24 µM nur eine schwache EGFR-Hemmwirkung auf. In einer Struktur-/Aktivitätsstudie untersuchten Fridrich *et al.* [2007a] den Einfluss von oligomeren Procyanidinen auf die EGFR-Aktivität. Sie zeigten, dass im zellfreien System keine Unterschiede zwischen Hemmwirkungen verschiedener, dimerer Procyanidine bestehen (IC_{50} -Werten jeweils ~ 10 µM). Tri- bzw. tetramere Procyanidine wiesen mit IC_{50} -Werten von 0,2–1,3 µM nochmals potentere EGFR-Hemmwirkungen im zellfreien System auf. Im zellulären System mit HT29-Zellen konnten die Autoren jedoch aufzeigen, dass lediglich di- und trimere Procyanidine einen signifikanten Einfluss auf die EGFR-Aktivität besaßen. Das tetramere Procyanidin A2 erwies sich dagegen als ineffektiv. Diese Daten deuten darauf hin, dass die biologische Wirksamkeit der Proanthocyanidine durch deren Molekulargewicht begrenzt wird. Proanthocyanidine die mit PF abgetrennt wurden, sind vermutlich höhermolekular. Dies könnte die in der vorliegenden Studie beobachtete, schwache EGFR-Hemmwirkung dieser Subfraktion erklären. Ob in dieser Fraktion ebenfalls niedermolekulare Proanthocyanidine enthalten sind, wurde nicht geklärt. Zumindest ein dimeres Proanthocyanidin ist nicht im zuvor erwähnten „polymer hump“ zwischen 55 und 70 min des HPLC-Programms enthalten, sondern eluiert bereits nach 24,4 min (Tabelle 6) und ist somit vermutlich in CF enthalten. Dies bedeutet, dass eventuell auch weitere di- und trimere Proanthocyanidine nicht mit den polymeren Proanthocyanidinen abgetrennt wurden, da sich die Polaritäten deutlich voneinander unterscheiden. Ein weiteres Problem bestand darin, dass Proanthocyanidine des HBE aufgrund ihrer hohen strukturellen Diversität nicht quantifiziert werden konnten. Ein Vergleich der EGFR-Hemmwirkung des HBE bzw. PF mit der Wirkung von isolierten Verbindungen ist daher nur schwer zu beurteilen.

CF, die proanthocyanidinfreie Subfraktion von FF, vermittelte keine inhibierende Wirkung auf die EGFR-Aktivität im zellulären System (Abbildung 46B). Diese Beobachtung war unerwartet, da in dieser Fraktion monomere Polyphenole wie Flavonole angereichert wurden, denen neben den Proanthocyanidinen eine Beteiligung an der bioaktiven Wirkung des HBE zugeschrieben wurde. Um zu überprüfen, ob diese Verringerung der EGFR-Hemmwirkung auf antagonistische Wirkungen zwischen einzelnen Substanzen aufgrund deren Anreicherung in CF zurückzuführen ist, wurde diese Subfraktion in polare und unpolare Substanzen (CFp und CFu) aufgetrennt. Beide Subfraktionen vermittelten jedoch ebenfalls keine essentielle EGFR-

Hemmwirkung, die das Potential von FF erklären könnten.

In CF und der polaren Subfraktion wurde eine sukzessive Anreicherung von Chlorogensäure beobachtet (Tabelle 16). Da zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine klare Datenlage hinsichtlich der Wirkung von Chlorogensäure auf den EGFR im zellulären System bestand, wurde die Substanz in isolierter Form in HT29-Zellen untersucht. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Chlorogensäure die EGFR-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen induziert (Abbildung 49). Darüber hinaus war die Substanz in einem Koinkubationsansatz in der Lage, die durch Cyanidin und FF vermittelte EGFR-Hemmung zu reduzieren, wenn auch nicht signifikant (Abbildung 50). Chlorogensäure stellte somit einen HBE-Inhaltsstoff dar, der einer EGFR-Hemmwirkung entgegenwirkt und könnte durch Anreicherung in den Subfraktionen zu dem beobachteten Verlust der Bioaktivität beitragen.

Die Aktivität von RTK wird endogen durch unterschiedliche Mechanismen verringert. Die Wichtigsten stellen die Dephosphorylierung durch Proteintyrosinphosphatasen (PTP) und die Endozytose der aktiven Rezeptoren dar [Östman und Böhmer, 2001, Peschard und Park, 2007]. Eine EGFR-aktivierende Wirkung kann somit durch selektive Hemmung dieser beiden Mechanismen vermittelt werden. Eine Hemmung der Rezeptorendozytose sollte mit einer Erhöhung der endogenen Rezeptormenge einhergehen. Da nach der Aktivierung des EGFR durch Chlorogensäure kein Anstieg des Rezeptorproteins festgestellt wurde, konnte dieser Mechanismus ausgeschlossen werden.

Die zytosolische PTB-Isoform 1B konnte neben weiteren PTP als negativer Regulator des EGFR identifiziert werden [Flint *et al.*, 1997]. Muthusamy *et al.* [2010] konnten die Hemmung dieser Phosphatase durch Chlorogensäure mit einer IC_{50} von $3,82 \mu\text{g/ml}$ ($\cong 10,8 \mu\text{M}$) nachweisen. Die PTP1B-Aktivität wird somit in dem Konzentrationsbereich gehemmt, in dem in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der EGFR-Aktivität durch Chlorogensäure beobachtet wurde ($10 - 300 \mu\text{M}$). Diese Beobachtung könnte somit eine Erklärung für die EGFR-Induktion nach Chlorogensäureinkubation darstellen.

Wachstumshemmung durch Subfraktionen

Parallel zu den Untersuchungen der EGFR-Hemmwirkungen wurden die Hemmwirkung der Subfraktionen auf das Wachstum von Tumorzellen untersucht. Die Übersicht der Ergebnisse ist ebenfalls in Tabelle 19 aufgeführt. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen zur Wirkung auf die Aktivität des EGFR, vermittelte insbesondere die Anthocyanfraktion des HBE eine wachstumshemmende Wirkung (Abbildung 51A). Weiterhin konnte durch Inkubation mit den polymeren Proanthocyanidinen (PF) eine signifikante Reduktion des Tumorzellwachstums erreicht werden (Abbildung 51C).

Diese Daten stimmen mit Ergebnissen einer Studie von Yi *et al.* [2005] überein. Die Autoren dieser Studie untersuchten Subfraktionen verschiedener Kulturheidelbeerextrakte (*Vaccinium ashei ssp.*) auf deren wachstumshemmende Wirkung auf HT29-Zellen. In diesen Untersuchungen wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, die anthocyanhaltigen und tanninreichen Subfraktionen als die potentesten Substanzgemische hinsichtlich wachstumsreduzierender

Wirkung identifiziert.

Olsson *et al.* [2004] konnten dagegen für die Anthocyanfraktion aus Amerikanischen Heidelbeeren (*Vaccinium corymbosum*) keine wachstumshemmende Wirkung auf HT29-Zellen nachweisen. Weiterhin zeigten sie, dass die isolierten Anthocyane Del-3-glc, Cy-3-glc und Mv-3-glc eine sehr potente, wachstumshemmende Wirkung aufweisen, während ein Gemisch aus allen drei Substanzen das Wachstum deutlich schwächer beeinflusste. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Anthocyane untereinander antagonistische Effekte aufweisen können.

Die wachstumsreduzierende Wirkung oligomerer bzw. polymerer Proanthocyanidine wurde in verschiedenen Studien aufgezeigt. Gossé *et al.* [2005] zeigten in einer Studie mit Apfelextrakt (*Malus domestica* Antoinette), dass eine proanthocyanidinreiche Subfraktion nach einer Inkubation von neun Tagen das Wachstum von SW620-Kolonkarzinomzellen mit einem IC_{50} -Wert von 45 µg/ml inhibiert. Eine Fraktion, reich an monomeren Flavonoiden wie Quercetin, (+)-Catechin und (–)-Epicatechin, vermittelte dagegen keine wachstumshemmende Wirkung in den Zellen. In einer weiteren Studie von Schmidt *et al.* [2004] konnten die Autoren die proliferationshemmende Wirkung eines Heidelbeerextrakts (*Vaccinium angustifolium* Ait.) auf humane Prostatakarzinom- (LNCaP) und murine Hepatomzellen (Hepa1c1c7) durch Fraktionierung ebenfalls auf die enthaltenen Proanthocyanidine zurückführen. Die restlichen, nicht genauer charakterisierten Fraktionen des Beerenextrakts waren weitgehend wirkungslos.

Seeram *et al.* [2004] kamen in einer Untersuchung eines Extrakts aus Moosbeeren (*Cranberries*, *Vaccinium macrocarpon*) und Extraktsubfraktionen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Sie zeigten für den Gesamtextrakt in Konzentration von 200 µg/ml eine starke Hemmung des Wachstums von HT29-Zellen auf ~24 % (T/C). Während die anthocyan- und proanthocyanidinreichen Subfraktionen des Extrakts das Zellwachstum nicht signifikant beeinflussten, konnte durch Inkubation mit einer Fraktion der verbleibenden Polyphenole das Wachstum auf ~40 % reduziert werden.

In weiteren Studien konnte die wachstumshemmende Wirkung verschiedener flavonoider Inhaltsstoffe von Heidelbeeren gezeigt werden. Insbesondere die Flavonole Quercetin und Myricetin hemmten das Zellwachstum von HT29-Zellen im niedrigen mikromolaren Bereich [Ranelletti *et al.*, 1992, Agullo *et al.*, 1994, 1996]. Chlorogensäure zeigte in HT29-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 205 ± 53 µM ein verhältnismäßig schwach wachstumshemmendes Potential [Kern, 2006]. Die Wirkung steht somit im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Induktion der EGFR-Aktivität in HT29-Zellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in dieser Zelllinie EGFR-Aktivität und Zellwachstum nicht zwangsläufig kausal verknüpft sind. Quercetin-3-*O*-glucosid und die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (–)-Epicatechin übten nur eine sehr geringe wachstumshemmende Wirkung in dieser Zelllinie aus [Yang *et al.*, 1998, Agullo *et al.*, 1996, Fridrich *et al.*, 2007b].

In der überwiegenden Zahl der Studien konnten Anthocyane als ursächlich oder zumindest teilweise verantwortlich für die wachstumshemmenden Eigenschaften von Beerenextrakten gemacht werden. Darüber hinaus könnten Anthocyane untereinander antagonistische Effekte auszuüben, sodass komplexe Anthocyanmischungen ein schwächeres Hemmprofil aufweisen als

Einzelsubstanzen. Weiterhin konnte oligo- und polymere Proanthocyanidinen eine Beteiligung an der wachstumshemmenden Wirkung polyphenolreicher Extrakte zugeordnet werden. Einzelne monomere Flavonoide, die zwar in isolierter Form potente Wachstumsinhibitoren darstellten, spielten in Subfraktionen komplexer Extrakte eine eher untergeordnete Rolle. In den zuvor genannten Studien wurde jedoch meist ohne Zusatz von Katalase inkubiert. Da die H_2O_2 -Bildung durch Polyphenole im Zellkulturmedium erfahrungsgemäß zu experimentellen Artefakten führt [Kern *et al.*, 2007, Fridrich *et al.*, 2007b], sind die Daten nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar.

Die Daten der vorliegenden Studie hinsichtlich Wachstums- und EGFR-Hemmung korrelieren nicht direkt. Für die EGFR-hemmende Wirkung des HBE scheint der Anthocyananteil, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen isolierter Anthocyane, eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Abschnitt 4.3.3). Ein wesentlicher Beitrag zur Wachstumshemmung von HT29-Zellen wird jedoch durch den Anthocyananteil des HBE vermittelt. Wie sich schon in den Untersuchungen der Kapselsysteme andeutete, werden EGFR- bzw. Wachstumshemmung über unterschiedliche Substanzgruppen des HBE vermittelt. Während die EGFR-Hemmung insbesondere durch monomere Polyphenole des HBE vermittelt wird, scheint die Wachstumshemmung von Tumorzellen durch den Anthocyan- und den Proanthocyanidinanteil ausgelöst zu werden. EGFR- und Wachstumshemmung scheinen somit nicht, wie zu Anfang der Untersuchungen vermutet, in einem kausalen Zusammenhang zu stehen bzw. die Wachstumshemmung wird über eine späte EGFR-Hemmung (≥ 45 min, vermittelt durch Anthocyanabbauprodukte) verursacht. Die Hemmung verschiedener proliferationsassoziiierter Signalwege durch Anthocyane wurde mehrfach beschrieben. So hemmen Anthocyanidine neben dem EGFR/MAPK-Signalweg auch weitere Transduktionswege, die beispielsweise über Phosphodiesterase 4 und Proteinkinase A (PDE4/PKA) [Marko *et al.*, 2004] bzw. apoptosesignalregulierte Kinase 1 (ASK1) und JNK/p38 [Oak *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2012] vermittelt werden. Wachstumshemmung von Tumorzellen *in vitro* kann darüber hinaus über die Induktion von Apoptose vermittelt werden [Chen *et al.*, 2005, Seeram *et al.*, 2006]. Die zugrunde liegenden, proapoptotischen Mechanismen können dabei sowohl extrinsischer, FAS-vermittelter als auch intrinsischer, mitochondrialvermittelter Natur sein [Reddivari *et al.*, 2007, Martin *et al.*, 2003].

Der EGFR-Signalweg spielt möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle für die Wachstumsregulation von HT29-Zellen. Diese Beobachtungen stützen die Vermutungen, die nach Untersuchung der extraktbeladenen Kapseln aufgestellt wurden: In diesen wurde angenommen, dass die Hemmung des EGFR nicht über Anthocyane vermittelt wird, da diese vollständig aus den Kapseln freigesetzt wurden. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Zellwachstum von HT29-Zellen durch die Kapseln gehemmt wird, obwohl die EGFR-Aktivität im untersuchten Zeitrahmen nicht oder lediglich marginal beeinflusst wurde. Zusammenfassend scheinen EGFR- und Wachstumshemmung über jeweils verschiedene Inhaltsstoffe des HBE vermittelt zu werden. Alternativ wäre ein Einfluss von zeitlich verzögert gebildeten Anthocyanabbauprodukten denkbar, wobei die Wachstumsunterdrückung letztendlich durch die EGFR-Hemmung vermittelt wird.

Beeinflussung Nrf2/ARE-regulierter Gene *in vivo* und *in vitro*

Der Einfluss der Formulierung auf die Bioaktivität des HBE konnte *in vitro* nur unzureichend untersucht werden, da im Zellkulturmodell die physiologische Situation unzureichend abgebildet wird: Die Einflüsse von Verdauungsenzymen und der Mikroflora fehlen in diesem Modell vollständig. Für die Kapseln konnte somit lediglich die Aussage getroffen werden, ob die Bioaktivität des HBE im Hinblick auf die ausgewählten Endpunkte nach Verkapselung grundsätzlich erhalten bleibt oder nicht. Eine Steigerung der Bioaktivität, die auf eine verzögerte Freisetzung der Inhaltsstoffe aus Kapselsystemen und damit auf eine vergrößerte AUC zurückzuführen wäre, wurde *in vitro* nicht beobachtet. Denkbar wäre in diesem Fall jedoch auch eine *Threshold*-Konzentration, deren überschreiten für einen Effekt notwendig ist. Dieser Wirkweise würde eine Verkapselung sogar entgegenwirken. In Kurzzeituntersuchungen, in denen die verzögerte Inhaltsstofffreisetzung aus intakten Kapseln in den Versuchsaufbau einbezogen wurde, konnte lediglich eine Verringerung der Bioaktivität des HBE beobachtet werden. Dies trifft insbesondere auf die Untersuchungen hinsichtlich der EGFR-Hemmwirkung von intakten DMH und PHK zu. Weiterhin wurde angenommen, dass potentiell wirksame Inhaltsstoffe, beispielsweise Tannine, an der Kapselmatrix von MPK irreversibel gebunden vorliegen. Ein *ex vivo*-Verdau der Kapselsysteme vor der eigentlichen Zellinkubation stellte die EGFR-Hemmwirkung nicht wieder her. Der Verdau verminderte die Bioaktivität des unverkapselten Extrakts ebenfalls deutlich. Der Verlust der Bioaktivität wurde daher auf Matrixeffekte des Ileostomaausflusses zurückgeführt.

Um zu überprüfen, ob die Verkapselung von HBE eine positiv modulierende Wirkung auf die Aktivität der Inhaltsstoffe *in vivo* besitzt, wurde eine humane Interventionsstudie mit gesunden Probanden und Ileostomiepatienten mit ausgewählten Kapselsystemen durchgeführt. Als Marker für die Bioaktivität diente in dieser Arbeit die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in PBMC der Probanden, deren Modulation nach Verabreichung von Anthocyanextrakten bereits im Tiermodell gezeigt werden konnte [Hwang *et al.*, 2011a,b]. Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Weitere Parameter, die in dieser Studie von Arbeitsgruppe Richling untersucht wurden, waren die Anthocyankonzentrationen im Ileostomaausfluss sowie die Modulation von oxidativen DNA-Schäden in PBMC und des GSH-Spiegels im Blutplasma der Probanden. Da es sich um ein vergleichsweise kleines Probandenkollektiv handelte, konnte in dieser Humanstudie letztendlich nur überprüft werden, ob das gewählte Studiendesign geeignet ist, um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen. Dennoch konnten in dieser Pilotstudie bereits klare Tendenzen aufgezeigt werden (Tabelle 20).

Bereits 1 h nach Intervention erhöhte sich in den PBMC der Kontrollprobanden die Transkriptmenge von NQO1 signifikant, während gleichzeitig die Transkriptmengen der Gene Nrf2 und HO-1 signifikant vermindert wurden (Abbildung 55A). Diese frühe Modulation der Transkriptmengen spricht für eine schnelle Resorption der bioaktiven Inhaltsstoffe aus dem Extrakt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Anthocyane nach oraler Administration innerhalb kurzer Zeit in intakter, glycosidischer Form im Plasma

Tabelle 20: Einfluss von unverkapseltem und formuliertem HBE auf die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in PBMC von Probanden nach Verzehr. $\uparrow$ signifikante Induktion; $\downarrow$ signifikante Suppression; – kein Effekt; () Effekt nicht signifikant ausgeprägt. MPK: Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln; CPK: Citruspektinkapseln; HO-1: Hämoxygenase 1; NQO1: NAD(P)H:Chinonoxido-reduktase 1; Nrf2: *NF-E2 related factor-2*.

Kapsel-system	Kontroll-probanden	Ileostoma-probanden
HBE		
HO-1	$\downarrow$	–
NQO1	$\uparrow$	–
Nrf2	$\downarrow$	$\downarrow$
MPK		
HO-1	–	($\downarrow$)
NQO1	–	($\downarrow$)
Nrf2	–	–
CPK		
HO-1	($\downarrow$)	–
NQO1	($\downarrow$)	–
Nrf2	–	($\downarrow$)

nachzuweisen sind [Cao und Prior, 1999, Matsumoto *et al.*, 2001, Murkovic *et al.*, 2001, Bub *et al.*, 2001]. In den meisten dieser Untersuchung konnten Anthocyane bereits nach ~ 30 min im Plasma detektiert werden. Die maximalen Plasmakonzentrationen, abhängig von der verzehrten Anthocyanmenge, wurden in der Regel nach 1–3 h beobachtet. Die kurzen Anthocyanresorptionszeiten nach oraler Administration sprechen darüber hinaus für eine Resorption im Magen. So zeigten Cai *et al.* [2011], dass die Anthocyanaufnahme nach Applikation in den Magen deutlich höher ist, als nach Applikation in den Dünndarm (~ 20 -facher Unterschied).

Die Transkriptmodulation der Gene deckte sich zeitlich mit Untersuchungen von der Arbeitsgruppe Richling hinsichtlich der Anthocyankonzentration im Ileostomaausfluss. Bereits 1–2 h nach Verzehr wurden substanzielle Mengen des HBE im Dünndarminhalt wiedergefunden [Kropat *et al.*, 2012]. Dies zeigt, dass der HBE-Bolus den oberen GIT (Magen und Dünndarm) sehr schnell passiert. Unter anderem ist diese Beobachtung vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Probanden zu Beginn der Studie nüchtern waren. Eine schnelle Anthocyanaufnahme war somit gewährleistet und könnte den raschen Eintritt der beobachteten Transkriptionsmodulation erklären.

NQO1 ist ein FAD-abhängiges Flavoenzym, dass die Reduktion von Chinonen, Chinoniminen, Nitroaromaten oder Azofarbstoffen katalysiert [Dinkova-Kostova und Talalay, 2010]. Da diese Substanzen *in vivo* als Redoxcyclus agieren können, wird ihre Abnahme durch die Induktion von NQO1 allgemein als chemopräventiver Mechanismus angesehen [Zhang und Tang, 2007]. Das Enzym HO-1 vermittelt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im oxidativen Abbau von Häm zu Kohlenmonoxid (CO), Eisenionen (Fe^{2+}) und Biliverdin IX. Obwohl die HO-1-Expression notwendig für den Hämkatabolismus ist, konnte

eine erhöhte Expression mit einer Reihe chronischer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden [Smith *et al.*, 1994, Doi *et al.*, 1999, Otterbein und Choi, 2000]. Ein präzise abgestimmtes Gleichgewicht der Genexpression von HO-1 ist somit Voraussetzung für die protektive Wirkung auf Zellen und Gewebe [Otterbein und Choi, 2000]. Die Transkription des Gens Nrf2 wird unter anderem durch ARE-ähnliche Sequenzen seiner Promotorregion reguliert. Nrf2 unterliegt folglich eine Autoregulation, die vermutlich der Aufrechterhaltung und Verstärkung der Nrf2-Signalwirkung dient [Kwak *et al.*, 2002]. In präneoplastischen Zellen dient diese Regulation der Aufrechterhaltung des antioxidativen Schutzmechanismus. In neueren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Nrf2-Überexpression das Wachstum von Tumorzellen unterstützt und die zelluläre Resistenz gegenüber Tumorchemotherapeutika vermittelt [Homma *et al.*, 2009]. Die Herunterregulierung von HO-1 und Nrf2, die in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, könnte somit regulativ auf Neoplasien in frühen Stadien wirken. Bislang wurde jedoch nicht geklärt, ob der beobachtete Effekt der Nrf2-Transkriptverringerung einen transienten Effekt darstellt oder ob die Nrf2-Transkription nach Konsum bioaktiver HBE-Inhaltsstoffe längerfristig gesenkt wird.

Die Verkapselung des HBE hatte *in vivo*, vergleichbar mit den *in vitro*-Untersuchungen, eine deutliche Reduktion der biologischen Wirksamkeit an den ausgewählten Endpunkten zur Folge. Der hier beobachtete Effekt auf die Gentranskription ist auf einen kurzen Zeitraum von wenigen Stunden zurückzuführen. Daher kann die Wirkung vielmehr mit den *in vitro*-Daten hinsichtlich der EGFR-Hemmwirkung als mit denen der Tumorzellwachstumshemmung verglichen werden. Der Effekt des unverkapselten Extrakts auf die Gentranskription (Abbildung 55A) wurde, wie die EGFR-Hemmwirkung, durch Verkapselung signifikant verringert (Abbildung 56A und 57A). Die Gegenüberstellung in Abbildung 58 zeigt, dass insbesondere für die Gene Nrf2 und NQO1 die Modulation der Transkriptmengen nach Verzehr der Kapselsysteme deutlich schwächer ausgeprägt war als nach Verzehr des unverkapselten Extrakts. Für diese Beobachtung könnten verschiedene Ursachen verantwortlich sein:

- Bioaktive Inhaltsstoffe des HBE werden während Produktion, Transport oder Lagerung der Kapseln unter Umständen abgebaut. So herrscht in MPK ein wässriges Milieu vor. Obwohl der pH-Wert in diesen Kapseln sehr niedrig ist (pH 1,5), können in dieser Umgebung verstärkt Abbau- bzw. andere chemische Reaktionen stattfinden, die die Konzentration bioaktiver Bestandteile (neben Anthocyanen) des HBE verringern.
- Die Freisetzung bioaktiver Inhaltsstoffe, beispielsweise von Anthocyanen, erfolgt möglicherweise zu langsam, um einen Effekt auf die Gentranskription in PBMC zu vermitteln. Insbesondere für die schellackbeschichteten CPK könnte diese Freisetzung, im Vergleich zur sofortigen Verfügbarkeit der Inhaltsstoffe aus unverkapseltem HBE, zu langsam erfolgen, um im oberen GIT in ausreichender Menge resorbiert zu werden. So zeigten beispielsweise [Cai *et al.*, 2011], dass Anthocyane im Magen deutlich besser aufgenommen werden als im Dünndarm. Auch andere, bislang unaufgeklärte, bioaktive HBE-Inhaltsstoffe könnten einem ähnlichen Resorptionsmuster unterliegen.

Die Verkapselung wäre für die Aufnahme dieser Stoffe folglich kontraproduktiv.

- Bioaktive Inhaltsstoffe könnten mit Matrixbestandteilen in irreversibler Weise reagieren. Diese stünden somit nicht mehr für eine biologische Wirkung zur Verfügung. In den *in vitro*-Untersuchungen wurde dies hinsichtlich der Hemmwirkung auf den EGFR für oligo- und polymere Proanthocyanidine vermutet (Abbildung 61). Diese Substanzen werden vermutlich teilweise während der MPK-Herstellung prozessbedingt abgetrennt oder sind so stark mit dem Hüllmaterial assoziiert, dass keine Freisetzung erfolgt.

Weiterhin konnten zwischen den Kollektiven der Kontroll- und Ileostomieprobanden signifikante Unterschiede in der Modulation der untersuchten Gene beobachtet werden (Abbildungen 55A und B). Während Nrf2 in beiden Gruppen signifikant verringert wurde, konnte nach Intervention mit HBE nur in der Gruppe der Kontrollprobanden ein modulierender Effekt auf die Transkription der Gene HO-1 und NQO1 beobachtet werden. Die deutet darauf hin, dass die Transkriptionsregulation der Gene NQO1 und HO-1 einem anderen Mechanismus zugrunde liegt, als die Regulation der Nrf2-Transkription. Darüber hinaus scheint für die Regulation der Gene NQO1 und HO-1 das Vorhandensein des Kolons notwendig zu sein, da in der Gruppe der Ileostomieprobanden ausschließlich das Gen Nrf2 moduliert wurde. Diese Beobachtung könnte folgenden Ursachen zugrunde liegen:

- Bioaktive Inhaltsstoffe des HBE, die für die beobachtete Modulation der Gentranskription in PBMC eine Rolle spielen, könnten hauptsächlich im Kolon aufgenommen werden.
- Das Kolon spielt möglicherweise eine wesentliche Rolle in der Bildung bioaktiver Metabolite oder Abbauprodukte der HBE-Inhaltsstoffe. So werden Anthocyane erst durch die Mikroflora des Kolon zu Phenolcarbonsäuren und Phloroglucinolaldehyd abgebaut [Keppler und Humpf, 2005].

Aus folgenden Gründen würde diese Annahme jedoch voraussetzen, dass zumindest die Regulation der Gene NQO1 und HO-1 in PBMC nicht über intakte HBE-Inhaltsstoffe vermittelt wird:

- Die rasche und vornehmliche Aufnahme der Anthocyane über den Magen konnte zuvor gezeigt werden [Cai *et al.*, 2011]. Hinsichtlich der Funktion des Magens bestehen jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Probandenkollektiven.
- Die Beteiligung der mikrobiellen Aktivität des Kolons zur Aktivierung von HBE-Inhaltsstoffen impliziert einen Regulationsmechanismus, der auf Abbauprodukten beruht.

Um zu differenzieren, ob Anthocyane, deren intestinal gebildete Abbauprodukte oder weitere HBE-Inhaltsstoffe verantwortlich für die Regulation der untersuchten Gene sind, wurden ausgewählte Verbindungen *in vitro* hinsichtlich ihrer Nrf2-aktivierenden Wirksamkeit getestet.

Im Nrf2/Luciferase-Reporterassay in CHO-Zellen konnte Phloroglucinolaldehyd, das intestinal gebildete Abbauprodukt aller Anthocyane, als Nrf2-Induktor identifiziert werden (Abbildung 59A). Die Nrf2-Aktivität wurde durch Inkubation mit 400 μM des Abbauprodukts auf $129 \pm 16\%$ (T/C) erhöht. Für den nativen HBE konnte keine induzierende Wirkung nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die beiden Subfraktionen AF und FF keine aktivierende Wirkung, sodass antagonistische Effekte zwischen diesen beiden Fraktionen, die zu einem Wirkverlust des HBE geführt hätten, ausgeschlossen werden konnten. Auch die isolierten Substanzen Cy-3-glc und Cyanidin konnten als mögliche Aktivatoren ausgeschlossen werden. Die Phenolcarbonsäuren Gallussäure, Protocatechusäure und Syringasäure (intestinal gebildete Abbauprodukte der Anthocyanidine Delphinidin, Cyanidin bzw. Malvidin) zeigten ebenfalls keine Nrf2-induzierende Wirkung.

Um diese Ergebnisse auf Transkriptionsebene abzusichern, wurde die Wirkung von HBE, Cy-3-glc, Protocatechusäure und Phloroglucinolaldehyd auf die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene untersucht. Dafür wurden die zuvor in der Humanstudie betrachteten Gene HO-1, NQO1 und Nrf2 ausgewählt. In Analogie zum Reporterassay zeigte sich, dass Phloroglucinolaldehyd als einzige Testsubstanz in der Lage war, die Transkription der Gene HO-1 und Nrf2 zu induzieren. Die Inkubation mit 400 μM resultierte in einer Erhöhung der Transkriptmengen auf $331 \pm 52\%$ bzw. $215 \pm 23\%$ (Abbildung 60).

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass der Abbau von Anthocyanen für die Aktivierung von Nrf2/ARE-regulierten Genen eine Rolle zu spielen scheint. In beiden Assays waren jedoch Phloroglucinolaldehydkonzentrationen notwendig ($\geq 100 \mu\text{M}$), die im Blut unwahrscheinlich sind. Die Plasmaspiegel von Phloroglucinolaldehyd wurden nach Anthocyanverzehr bislang nicht untersucht. Die zu ähnlichen Anteilen gebildete Protocatechusäure erreichte in einer Humanstudie von Vitaglione *et al.* [2007] nach Verzehr von 71 mg Cy-3-glc (in Blutorangensaft) im Serum eine maximale Konzentration von 492 nM. Diese ist somit deutlich geringer als die in der vorliegenden Studie eingesetzten Phloroglucinolaldehydkonzentration. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die intestinale Aufnahmen der beiden Substanzen aufgrund unterschiedlicher chemischer Eigenschaften voneinander abweichen können.

Die Konzentration von Phloroglucinolaldehyd im Kolon sind jedoch als vergleichsweise hoch anzunehmen. Nach Verzehr des HBE wurden ~ 700 mg Anthocyane mit dem Ileostomaausfluss ausgeschieden [Kropat *et al.*, 2012]. Im gesunden Menschen würde diese Menge das Kolon erreichen, sodass dort eine durchschnittliche Konzentration von $\sim 360 \mu\text{M}$ resultieren würde (berechnet als Cy-3-glc-Äquivalente, Kolonvolumen $\sim 4\text{l}$). Im Kolon werden $\sim 5\text{--}10\%$ der Anthocyane zu PGA abgebaut [Keppler und Humpf, 2005]. Die PGA-Konzentration ($18\text{--}36 \mu\text{M}$) wäre somit deutlich niedriger, als der LOEL (Niedrigste Substanzkonzentration mit Wirkung; *Lowest observed effect level*) von $200 \mu\text{M}$ in beiden *in vitro*-Assays. Die Bolusgabe des HBE könnte im Kolon in deutlich höheren, lokalen Anthocyan- und folglich Phloroglucinolkonzentrationen resultieren. Die Konzentration der *in vitro*-Assays könnten somit durchaus eine physiologische Relevanz besitzen. Die zuvor beobachteten chemopräventiven Effekte im Darm nach Verzehr hoher Anthocyanmengen [Harris *et al.*, 2001, Cooke *et al.*, 2006, Thomasset *et al.*, 2009a] könnten möglicherweise auf der Modulation antioxidativer Gene,

vermittelt durch das intestinal gebildete Abbauprodukt Phloroglucinolaldehyd, beruhen.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen stehen im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien Nrf2-aktivierender Wirkungen von Anthocyanen. Shih *et al.* [2007] zeigten im Luciferase-Reportergenassay mit transfizierten Rattenhepatozyten (Clone 9) eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs nach 24-stündiger Inkubation mit Cyanidin bzw. Cy-3-glc (jeweils 50 μM), der eine dreistündige H_2O_2 -Behandlung (70 μM) folgte. Hwang *et al.* [2011a] berichteten ebenfalls von einer Induktion dieses Signalwegs im Luciferase-Reportergenassay mit transfizierten HepG2-Zellen nach 18-stündiger Inkubation eines anthocyanreichen Extrakts (50–200 $\mu\text{g/ml}$) aus violetten Süßkartoffeln (*Ipomoea batatas*). Die Ergebnisse dieser Studien lassen sich jedoch nicht direkt mit den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichen, da in den vorausgegangenen Studien ohne Zusatz von Katalase inkubiert wurde. Die Induktion des Nrf2-Signalwegs durch H_2O_2 ($\geq 100 \mu\text{M}$) wurde mehrfach aufgezeigt [Prester *et al.*, 1993a, Fourquet *et al.*, 2010]. Die Bildung von H_2O_2 durch Polyphenole könnte in diesen Untersuchungen folglich zu experimentellen Artefakten geführt haben [Long *et al.*, 2000, Halliwell *et al.*, 2000].

Schließlich muss beachtet werden, dass sich in der vorliegenden Untersuchung die Muster der Transkriptionsregulation zwischen PBMC der Probanden und HT29-Zellen unterscheiden: In den Blutzellen wurde eine Erhöhung der NQO1-Transkription bei gleichzeitiger Abnahme der Nrf2- und HO-1-mRNA-Level beobachtet, während *in vitro* eine Induktion der Gene NQO1 und HO-1 gemessen wurde. Da es sich dabei jedoch um prinzipiell verschiedene Zelltypen handelte müssen die Transkriptionsmuster nicht zwangsläufig korrelieren. Die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene ist ein zellspezifischer Mechanismus und kann daher in verschiedenen Geweben bzw. Zellen substanziell voneinander abweichen [Voet und Voet, 2004]. Darüber hinaus weichen die untersuchten Zeitfenster (1–8 h *in vivo*, 20 h *in vitro*) Assay-bedingt voneinander ab. Auch dies könnte zu einer Verschiebung der Transkriptionsmuster beitragen.

Phloroglucinolaldehyd stellt aufgrund seiner Carbonylgruppe eine elektrophile Verbindung dar und wäre somit in der Lage, mit Nucleophilen eine Michaeladdition einzugehen. Diese Bildung von Thiohalbacetalen verläuft spontan und wurde zuvor beschrieben [March, 2007]. Ein hypothetischer Mechanismus der Nrf2-Aktivierung wäre die Reaktion von Phloroglucinolaldehyd mit Cysteinresten von Keap1 (Abbildung 62). Dieses würde vermutlich zu einer Konformationsänderung und damit zu einer zytosolischen Akkumulation von Nrf2 führen (Abschnitt 2.2.5). Nrf2 transloziert letztendlich in den Zellkern und kann dort Phase II-Enzyme durch Bindung an deren ARE aktivieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zum derzeitigen Entwicklungsstand der Kapselsysteme die Bioaktivität des darin formulierten HBE, untersucht an verschiedenen ausgewählten *in vitro*- und *in vivo*-Parametern, nicht erhöht wird. Die Ergebnisse aus Kurzzeituntersuchungen *in vitro* (EGFR-Aktivität, 45–180 min) und *in vivo* (Transkription Nrf2/ARE-abhängiger Gene, 1–8 h) korrelieren insofern, dass nach Formulierung des HBE ein substanzieller Verlust der nativen Bioaktivität zu beobachten war. Dies ist möglicherweise auf Verluste von bioaktiven Inhaltsstoffen bei der Kapselherstellung, deren Komplexierung

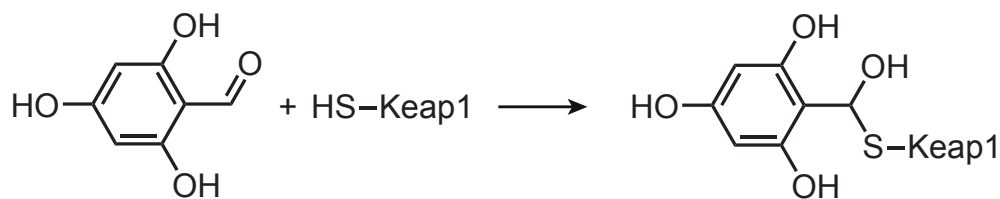


Abbildung 62: Postulierte Aktivierung von Keap1 durch Michaeladdition eines Cysteinrests mit Phloroglucinolaldehyd.

durch das Kapselmaterial und/oder die langsame Freisetzung aus den Kapseln bedingt. In der Langzeituntersuchung auf das Wachstum von Tumorzellen (72 h) hatte die Verkapselung keinen unerwünschten Einfluss. Die Formulierung in DMH hatte überdies eine Steigerung der wachstumshemmenden Wirkung zur Folge.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Parameter der EGFR- und der Wachstumshemmung über unterschiedliche Substanzklassen des HBE vermittelt werden. Während die Rezeptoraktivität hauptsächlich durch den anthocyanfreien Extraktanteil gehemmt wird, scheinen auf das Zellwachstum insbesondere Anthocyane und Proanthocyanidine Einfluss zu nehmen. Der Status der EGFR-Phosphorylierung im beobachteten Zeitfenster und die Verminderung des Tumorzellwachstums scheinen somit nicht in einem ursächlichen Zusammenhang zu stehen.

Die Transkriptionsmodulation Nrf2/ARE-regulierter Gene wurde *in vitro* nicht durch intakte Anthocyane, sondern durch das intestinal gebildete Anthocyanabbauprodukt Phloroglucinolaldehyd vermittelt. Eine Aktivierung von Keap1 und folglich des Nrf2-Signalwegs durch Phloroglucinolaldehyd ist aufgrund seiner elektrophilen Natur denkbar. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der Humanstudie unterstützt, da nur im Kollektiv der Kontrollprobanden mit intaktem Kolon eine Modulation der Gene HO-1 und NQO1 zu beobachten war. In den Ileostomieprobanden, die über keinen aktiven Kolon verfügen, wurde die Transkription dieser Gene nicht oder nur schwach moduliert.

Nach Verzehr von 10 g unverkapseltem HBE ($\cong$ 300 g frischen Wildheidelbeeren) wurden ca. 3 g des Extrakts mit dem Ileostomaausfluss ausgeschieden. Bei gesunden Probanden würde dies zu einer durchschnittlichen HBE-Konzentration von 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Kolon führen. Selbst bei Verzehr geringerer Mengen an anthocyanreichen Lebensmitteln könnten Substanzkonzentrationen, die in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu signifikanten Effekten geführt haben (100–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HBE), im GIT erreicht werden und sind somit vermutlich als physiologisch relevant einzuordnen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bioaktivität des untersuchten HBE in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Bioassays durch unterschiedliche Verkapselungsmethoden nicht verstärkt wird. Zum derzeitigen Entwicklungsstand der Kapseln kann daher keine Empfehlung einer Anwendung gegeben werden. Insbesondere Matrixeffekte scheinen die biologische Wirkung des Extrakts zu verringern. Bei der Weiterentwicklung der Kapseln müsste deswegen vor allem die Wahl des Hüllmaterials berücksichtigt werden. Während Pektinamid lediglich einen geringen Einfluss auf die Bioaktivität des HBE besaß, wurden

EGFR-Hemmwirkung und der Effekt auf die Transkription ARE/regulierter Gene durch das Molkenprotein der MPK-Matrix deutlich verringert. Pektinamidbasierte Kapselsysteme scheinen aufgrund der in dieser Studie erarbeiteten Datenlage der beste Ansatzpunkt für eine Weiterentwicklung der Mikrokapseln. Im Hinblick auf die protektive Wirkung der Inhaltsstoffe auf Darmzellen sollten magensaftresistente Coatings mit in die Entwicklung einbezogen werden, um eine vorzeitige Diffusion der Inhaltsstoffe aus den Kapseln in Lebensmittel und Magen zu unterbinden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Rahmen der DFG-AIF-Clustervorhaben „*Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen: Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostruktur und der molekularen Zusammensetzung auf die Stabilisierung und kontrollierte Freisetzung von sekundären Pflanzenstoffen und deren Auswirkung auf krebspräventive Signalparameter*“ und „*Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeereextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen*“. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Bioaktivität eines anthocyanreichen Heidelbeereextrakts (HBE) durch Verkapselung moduliert werden kann. Diese Fragestellung wurde *in vitro* im Kolonkarzinommodell und *in vivo* in einer humanen Interventionsstudie geklärt.

In die *in vitro*-Untersuchungen wurden drei HBE-beladene Kapselsysteme einbezogen: Molkenproteinbasierte Hydrogelkapseln (MPK, AG Kulozik, Technische Universität München (TUM)), pektinamidbasierte Hohlkapseln (PHK, AG Rehage, Technische Universität Dortmund) und doppel-emulsionsbasierte multidisperse Hüllkapseln (DMH, AG Schuchmann, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)). Um die *in vitro*-Versuche korrekt interpretieren zu können, wurden zunächst Beladung und Freisetungsverhalten exemplarisch für die enthaltenen Anthocyane im Zellkulturmedium mittels HPLC-DAD-Analyse ermittelt. In angesäuertem Zellkulturmedium (pH 2) konnte gezeigt werden, dass die Anthocyane des HBE aus MPK und PHK vollständig freigesetzt werden, jedoch mit unterschiedlicher Kinetik. Während die Freisetzung aus MPK rasch erfolgte ($t \leq 5$ min), benötigte dieser Prozess bei PHK ~ 60 min. Die Freisetzung aus DMH wurde von Frank [2012] bestimmt. Sie zeigte, dass innerhalb von 30 min lediglich 35 % der eingeschlossenen Anthocyane freigesetzt wurden. Im neutralen Zellkulturmedium wurde die Freisetzung vom Abbau der pH-sensitiven Anthocyane überlagert. Die Konzentration aller Anthocyane wurde im Neutralen signifikant erniedrigt. Insbesondere Delphinidinglycoside zeigten sich unter diesen Bedingungen als instabil. MPK stabilisierten Anthocyane während der Freisetzung, sodass inkubierte Zellen innerhalb von 120 min einer signifikant erhöhten Anthocyandosis im Vergleich zum unverkapselten Extrakt ausgesetzt waren. Während der Inkubation mit PHK war diese Konzentration aufgrund der langsamen Anthocyanfreisetzung signifikant niedriger.

Der native HBE wirkte sich in HT29-Zellen nach allen untersuchten Inkubationszeiten zwischen 45 und 180 min in der Western Blot Analyse hemmend auf die Aktivität des EGFR, gemessen als Rezeptorphosphorylierung in der Western Blot Analyse, aus. Nach Verkapselung des Extrakts in MPK wurde ein deutlich Verlust der EGFR-Hemmwirkung verzeichnet: Lediglich nach 120 min Inkubation konnte eine schwache Unterdrückung der Rezeptoraktivität beobachtet werden. Ein mechanischer Aufschluss dieser Kapseln konnte die Bioaktivität

des HBE hinsichtlich der EGFR-Hemmung nicht wiederherstellen. Koinkubationsversuche des HBE mit verschiedenen Proteinen zeigte eine signifikante Verringerung der EGFR-Hemmwirkung des unverkapselten Extrakts. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass aktive Wirkstoffe des HBE aus den Kapseln nicht freigesetzt oder bereits während der Produktion verloren werden. HBE aus aufgeschlossenen PHK unterdrückte dagegen die EGFR-Aktivität vergleichbar zum nativen Extrakt. Jedoch zeigte sich nach Inkubation mit intakten Kapseln, dass die kontrollierte Freisetzung der Extraktbestandteile in den untersuchten Zeitfenstern zu einer deutlichen Verringerung der EGFR-Hemmwirkung führte. HBE in DMH besaß nach 45 min Inkubation keine EGFR-Hemmwirkung in HT29-Zellen. Als Ursache wird die langsame Freisetzung aktiver Substanzen aus dem Formulierungssystem vermutet. Ein mit Ileostomaausfluss durchgeführter *ex vivo*-Verdau von MPK und PHK vor der Zellinkubation konnte die EGFR-Hemmwirkung des verkapselten Extrakts nicht wiederherstellen. Vielmehr wurde die Hemmwirkung des unverkapselten Extrakts, entgegen der Erwartung, durch den Verdau vollständig verloren. Diese Beobachtung wurde ebenfalls auf Matrixeffekte des Ileostomaausflusses zurückgeführt. So könnten aktive Bestandteile des HBE, beispielsweise Tannine, durch Proteine des Ausflusses komplexiert werden. Es muss daher in Erwägung gezogen werden, dass dieses Testsystem nicht geeignet ist, die physiologischen Prozesse im Dünndarm korrekt abzubilden.

Neben der EGFR-Hemmwirkung wurde die proliferationsinhibierende Wirkung von MPK, PHK und DMH auf HT29-Zellen nach 72 h Inkubation im SRB- bzw. Trypanblauausschlusstest untersucht. Im Gegensatz zur kurzfristigen Wirkung der EGFR-Hemmung beeinflusste die Formulierung das wachstumshemmende Potential des HBE nicht negativ. Die Wachstumshemmung von HBE in MPK und PHK war in Konzentrationen von 200 µg/ml ähnlich hoch, wie die für den unverkapselten Extrakt. In DMH wurde eine erhöhte proliferationshemmende Wirkung beobachtet. Diese könnte durch die zeitlich stark verzögerte Freisetzung der HBE-Inhaltsstoffe verursacht worden sein. Weitere Gründe könnten die verstärkte zelluläre Aufnahme über Liposomen oder die Erhöhung der Zellmembranpermeabilität durch enthaltene Emulgatoren darstellen.

Im Hinblick auf die Nutzung HBE-beladener Kapselsysteme wurde die Stabilisierung von DNA/Topoisomeraseintermediaten als anwendungslimitierender Parameter im ICE-Bioassay untersucht. Nach 60 min Inkubation wurden bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml weder für den unverkapselten HBE noch für den Extrakt in MPK, PHK und DMH adverse Effekte im Hinblick auf topoisomerasegiftende Wirkungen festgestellt.

Da sich in den vorausgegangenen Untersuchungen hinsichtlich EGFR-hemmender Wirkung abzeichnete, dass Anthocyane nicht primär für die beobachtete Wirkung verantwortlich sind, wurden isolierte Extraktbestandteile und Subfraktionen des HBE, die mittels adsorptiver Membranchromatographie und repetitiver Lösemittelextraktion aufgetrennt wurden, auf EGFR- bzw. zellwachstumshemmende Eigenschaften untersucht. Das isolierte Anthocyan Cy-3-glc unterdrückte bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml die EGFR-Aktivität in HT29- und A431-Zellen nicht. Im Gegensatz dazu konnte die Rezeptoraktivität durch das Aglycon Cyanidin in beiden Zelllinien signifikant unterdrückt werden. Die EGFR-Hemmwirkung des

Anthocyanidins war jedoch im Vergleich zu Delphinidin in vorausgegangenen Untersuchungen schwächer [Fridrich *et al.*, 2008b, Teller *et al.*, 2009a]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte die Subfraktion (AF) in der Anthocyane des HBE angereichert wurden, in HT29-Zellen keine EGFR-Hemmwirkung. Die Hemmwirkung des HBE konnte jedoch vollständig auf die anthocyanfreien Inhaltsstoffe (FF) des HBE zurückgeführt werden. Durch Auftrennung von FF konnte diese Wirkung den resultierenden Subfraktionen nicht eindeutig zugeordnet werden. Die FF-Subfraktion (PF) in der insbesondere polymere Proanthocyanidine angereichert wurden, unterdrückte die EGFR-Aktivität signifikant, jedoch in geringerem Ausmaß als FF und HBE. Die FF-Subfraktion (CF), in der monomere Polyphenole angereichert wurden, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die EGFR-Aktivität. Die niedrige Aktivität dieser Fraktion konnte partiell auf die Anreicherung von Chlorogensäure zurückgeführt werden. Der Substanz wurde zuvor eine EGFR-aktivierende Wirkung zugeordnet. Die wachstumshemmende Wirkung des HBE auf HT29-Zellen konnte auf AF und FF gleichermaßen zurückgeführt werden. Jedoch konnte durch Aufsummierung der Hemmwirkungen beider Subfraktionen die Wirkung von HBE nicht vollständig erklärt werden.

In einer humanen Interventionsstudie wurden extraktbeladene Citruspektinkapseln (CPK) und MPK vergleichend zu unverkapseltem HBE untersucht, um den Einfluss des GIT auf den Aufschluss von Formulierungssystemen zu erfassen. Fünf gesunden Probanden (Kontrollgruppe) und fünf Ileostomiepatienten wurden 10 g unverkapselter HBE oder dieselbe Menge in den Kapselsystemen verabreicht. Im anschließenden Zeitraum von 8 h wurden Transkriptmengen Nrf2/ARE-regulierter Gene in mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) mittels qRT-PCR ermittelt. Nach Verzehr des HBE konnte bei den Kontrollprobanden eine signifikante Induktion der NQO1-Gentranskription bei gleichzeitiger Verringerung der Transkriptmengen von HO-1 und Nrf2 beobachtet werden. Der Verzehr HBE-beladener Kapseln hatte keine oder deutlich schwächer ausgeprägte Effekte auf die Gentranskription in der Kontrollgruppe. In PBMC der Ileostomieprobanden wurde nach Intervention mit unverkapseltem HBE lediglich die Transkriptmenge des Gens Nrf2 im selben Ausmaß wie in der Kontrollgruppe erniedrigt. Die Transkription der Gene NQO1 und HO-1 wurde nicht beeinflusst. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass die Regulation der untersuchten Gene unabhängig voneinander geschieht. Weiterhin deuten die Daten auf die Aufnahme bioaktiver HBE-Inhaltsstoffe bzw. die Bildung aktiver Metabolite im Kolon hin. Verschiedene HBE-Leitsubstanzen und potenziell intestinal gebildete Anthocyanabbauprodukte wurden daher *in vitro* auf Nrf2-aktivierende Wirksamkeit untersucht. Während intakte Anthocyane weder Nrf2-aktivierend (Luciferase-Reportergenassay) noch induzierend auf die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene wirkte, konnte in beiden Testsystem eine Wirkung des Anthocyanabbauprodukts Phloroglucinolaldehyd aufgezeigt werden. Phloroglucinolaldehyd könnte aufgrund seiner elektrophilen Natur den Nrf2/ARE-Signalweg durch Reaktion mit Cysteinresten des Proteins Keap1 induzieren.

Abschließend ist festzuhalten, dass zum derzeitigen Entwicklungsstand der Kapselsysteme keine positiv modulierende Wirkung auf die Bioaktivität des darin formulierten HBE, untersucht an verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Parametern, nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse aus Kurzzeituntersuchungen *in vitro* und *in vivo* korrelieren in der Hinsicht, dass nach Formulierung des HBE ein essentieller Verlust der nativen Bioaktivität aufgezeigt wurde. Dies könnte möglicherweise auf Verlusten von bioaktiven Inhaltsstoffen bei der Kapselherstellung, deren Komplexierung durch das Kapselmateriale und/oder der langsamen Freisetzung aus den Kapseln beruhen. In Langzeituntersuchungen hinsichtlich des Wachstums von Tumorzellen hatte die Verkapselung keinen unerwünschten Einfluss, die Formulierung in DMH hatte überdies eine Steigerung der wachstumshemmenden Wirkung zur Folge.

Weiterhin wurde gezeigt, dass Parameter der EGFR- und der Wachstumshehmung über unterschiedliche Substanzklassen des HBE vermittelt werden. Während die Rezeptoraktivität hauptsächlich durch den anthocyanfreien Extraktanteil gehemmt wird, scheinen auf das Zellwachstum insbesondere Anthocyane und Proanthocyanidine Einfluss zu nehmen. EGFR-Hemmung im beobachteten Zeitfenster und die Verminderung des Tumorzellwachstums scheinen somit in keinem ursächlichen Zusammenhang zu stehen.

Die *in vitro*-Daten deuten darauf hin, dass die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs durch das intestinal gebildete Anthocyanabbauprodukt Phloroglucinolaldehyd vermittelt wird. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Humanstudie unterstrichen, da nur im Kollektiv der Kontrollprobanden eine Modulation der HO-1- und NQO1-Transkription aufgezeigt werden konnte. In den Ileostomieprobanden, die über keinen aktiven Kolon verfügen, wurden die Transkription dieser Gene nicht oder nur schwach moduliert. Die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs durch das Abbauprodukt wäre über eine Reaktion mit Keap1-Cysteinresten denkbar.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bioaktivität des untersuchten HBE in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Bioassays durch unterschiedliche Verkapselungsmethoden nicht verstärkt wird. Insbesondere Matrixeffekte scheinen die biologische Wirkung des Extrakts zu verringern. Bei der Weiterentwicklung der Kapseln sollte deswegen vor allem der Fokus auf die Wahl des Hüllmaterials gelegt werden.

6 Material und Methoden

6.1 Mathematische Berechnungen

Arithmetischer Mittelwert:

Die Mittelung Ergebnisse mehrerer, unabhängiger Experimente wird mit Formel 6.1 berechnet.

$$\text{Arithmetischer Mittelwert (MW): } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1} x_i}{n} \quad (6.1)$$

Standardabweichung:

Ab einer Wiederholungszahl von $n=3$ wird die Schwankungsbreite der Mittelwerte als Standardabweichung nach Formel 6.2 berechnet.

$$\text{Standardabweichung (SD): } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (6.2)$$

IC_{50} -Berechnung:

Die IC_{50} -Berechnung der Rezeptoraktivität und des Zellwachstums erfolgt mittels linearer Interpolation nach Formel 6.3.

$$IC_{50} = \frac{C_h - C_l}{A_h - A_l} \times (50 - A_l) + C_l \quad (6.3)$$

IC_{50} : InhibitorKonzentration, die eine 50%ige Hemmung zur Folge hat

A_h : höchste Aktivität unterhalb von 50 %

A_l : niedrigste Aktivität oberhalb von 50 %

C_h : Konzentration der Testsubstanz bei A_h

C_l : Konzentration der Testsubstanz bei A_l

Nalimov-Test:

Durch den Nalimov-Test kann eine Aussage gemacht werden, ob ein bestimmter Messwert x^* in eine erwartete Messreihe passt oder allgemein nicht den Erwartungen entspricht. Die Teststatistik erfolgt nach Formel 6.4.

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \times \sqrt{\frac{n}{n-1}} \quad (6.4)$$

Gilt $r^* \geq r_{crit}$ dann darf x^* mit einer statistischen Sicherheit von $1 - \alpha$ als Ausreißer angesehen werden (Tabelle 21). Die Anzahl der Freiheitsgrade f ergibt sich zu $f = n - 2$ [Lozán und Kausch, 2003].

r^* : Testgröße
 r_{crit} : kritischer Grenzwert
 x^* : Messwert
 $\bar{x}$: Mittelwert aller Messwerte
 s : Standardabweichung
 n : Anzahl der Messwerte
 f : Anzahl der Freiheitsgrade
 α : Signifikanzniveau

Tabelle 21: Kritische Grenzwerte zur Ermittlung von Ausreißern nach Nalimov ($\alpha = 0,05$).

n	r_{crit}	n	r_{crit}	n	r_{crit}
3	1,409	12	1,910	25	1,936
4	1,645	13	1,916	30	1,937
5	1,757	14	1,920	35	1,942
6	1,814	15	1,923	40	1,945
7	1,848	16	1,926	45	1,948
8	1,870	17	1,928	50	1,949
9	1,885	18	1,931	100	1,950
10	1,895	19	1,933		
11	1,903	20	1,935		

6.2 Zellkultur

6.2.1 Verwendete Zelllinien

Die Untersuchungen werden mit den humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 und der Hamstero-varienzelllinie CHO durchgeführt.

HT29:

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Kolonadenokarzinomzellen, die 1964 aus einem primären Tumor einer 44 Jahre alten Frau kaukasischen Typs isoliert wurden. Der Karyotyp ist hypertriploid mit 17,5 % polyploidem Anteil. Die Verdopplungszeit beträgt 40–60 h [DSMZ, Braunschweig]. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, mit 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat) mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S).

CHO:

Die Zelllinie CHO (abgekürzt vom englischen *Chinese hamster ovary*) wurde von Puck *et al.* [1958] etabliert. Es handelt sich um immortalisierte Zellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*). CHO-Zellen sind eines der meist genutzten Systeme für die Expression rekombinanter Proteine [Hacker *et al.*, 2009]. Die Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von ~24 h und werden unter denselben Bedingungen wie HT29-Zellen in DMEM (ohne Phenolrotindikator, 10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin) kultiviert.

6.2.2 Wechseln des Zellkulturmediums

Die verwendeten Zelllinien wachsen adhärent bzw. semiadhärent und bilden auf dem Boden der Zellkulturflasche einen Monolayer aus. Da die Nährstoffe des Zellkulturmediums von den Zellen aufgebraucht werden und abgegebene Stoffwechselprodukte im Medium akkumulieren, wird alle drei bis vier Tage ein Wechsel der Nährlösung durchgeführt. Verbrauchtes bzw. aufgrund der Stoffwechselprodukte stark angesäuertes Zellkulturmedium ist an einem Farbumschlag des darin enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot über orange nach gelb zu erkennen. Verbrauchtes Medium wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgezogen und durch 40 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

6.2.3 Passagieren der Zelllinien

Bei einer Konfluenz von ca. 80–90 % werden die Zellen passagiert, d. h. nach Verdünnen weiterkultiviert, da sich sonst Polylayer ausbilden können. Beide Zelllinien müssen dazu abtrypsiniert werden.

Durchführung:

- Abziehen des verbrauchten Zellkulturmediums mit einer Pasteurpipette.
- Waschen des Zellrasens mit ~ 10 ml warmen PBS-Puffer.
- Überschichten der Zellen mit ca. 2 ml warmer Trypsinlösung und anschließende Inkubation für ca. 2–3 min bei 37 °C.
- Lösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche durch leichtes Klopfen.
- Abstoppen der Trypsinreaktion durch Zugabe von 10 ml FKS-haltigem Medium.
- In Abhängigkeit der Zellzahl werden 0,5–2 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 40 ml frischem Medium versetzt. Der Überstand der Suspension wird zum Aussäen verwendet

Mit steigender Passagenzahl kann sich die Zellphysiologie deutlich verändern, deshalb werden die verwendeten Zellen ab einer Passagenzahl von ca. 30 verworfen und frische Aliquote in Kultur genommen [Lindl, 2000].

6.2.4 Einfrieren von Zellen

Zellen können bei -80 °C über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) wird ein Auskristallisieren des Zellwassers unterbunden [Lindl, 2000].

Durchführung:

- Abtrypsinieren der Zellen wie in Abschnitt 6.2.3 beschrieben.
- Vorlegen von 500 μ l einer FKS/DMSO-Mischung (7/3, v/v) in Kryoröhrchen.
- Aliquotieren der Zellsuspension zu 1 ml in Kryoröhrchen.
- Einfrieren der Zellen bei -20 °C für 24 h. Danach Überführung in -80 °C oder zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C).

6.2.5 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgt rasch, um die zytotoxische Wirkung des DMSO bei Raumtemperatur zu vermindern.

Durchführung:

- Auftauen der Zellstocks im Wasserbad bei 37 °C.
- Zügiges Überführen der Zellsuspension in 5 ml warmes Zellkulturmedium (20 % FKS).

- Abzentrifugieren der Zellen ($130 \times g$, 4 min, 20°C).
- Resuspension des Zellpellets in frischem Kulturmedium (20 % FKS) und Überführen in eine kleine Kulturflasche (25 cm^2).
- Kultivierung unter zellspezifischen Bedingungen für $\sim 72\text{ h}$.
- Nach erfolgreichem Anwachsen der Zellen Reduktion der FKS-Konzentration auf 10 % und Subkultivierung in größeren Kulturflaschen (175 cm^2).

6.2.6 Mykoplasmentest

Bei Mykoplasmen handelt es sich um eine der kleinsten bekannten Bakteriengattungen ($d = 0,1\text{ }\mu\text{m}$). Da sie keine Zellwand besitzen, sind sie unempfindlich gegenüber Antibiotika wie Penicillin und stellen eine Kontaminationsgefahr für Zellkulturen dar. Regelmäßiges Screening von Zellen auf Mykoplasmen verringert die Gefahr einer laborübergreifenden Kontamination.

Durchführung:

- Abtrypsinieren der Zellen wie in Abschnitt 6.2.3 beschrieben.
- Überschichten eines sterilen Objektträgers in einer 10 cm-Petrischale mit 10 ml Zellkulturmedium (10 % FKS).
- Eintropfen einer geringen Menge an Zellsuspension auf den Objektträger und anschließende Inkubation für 24 h bei zellspezifischen Bedingungen.
- Fixieren der Zellen auf dem Objektträger durch Eintauchen in kaltes Methanol (-20°C) für min. 15 min.
- Färben von Zellkernen und Zytoskelett mit DAPI/SR 101-Lösung.
- Fluoreszenzmikroskopische Auswertung: Mykoplasmen sind als kleine blaue Punkte im intra- bzw. extrazellulären Raum erkennbar [Lindl, 2000].

6.2.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl von Zellsuspensionen wird unter dem Phasenkontrastmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese besitzt Messzellen mit definierten Volumina von $0,1\text{ }\mu\text{l}$. Durch Zählen der Zellen in diesem Volumen kann auf die Zellzahl in der Suspension rückgeschlossen werden [Lindl, 2000]. Durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Vitale Zellen können den Farbstoff ausschleusen und erscheinen damit farblos, während tote Zellen blau eingefärbt ersichtlich sind.

- Abtrypsinieren der Zellen wie in Abschnitt 6.2.3 beschrieben.
- Verdünnen von $20\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension mit $180\text{ }\mu\text{l}$ Trypanblaulösung.

- Zusammenbau der gereinigten Neubauer-Zählkammer.
- Einfüllen der angefärbten Zellsuspension.
- Lichtmikroskopische Auszählen nach dem Schema in Abbildung 63.
- Der Mittelwert aus vier Quadraten wird mit dem Kammerfaktor 10 000 sowie dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert. Die errechnete Zahl entspricht der Zellzahl pro ml Suspension.

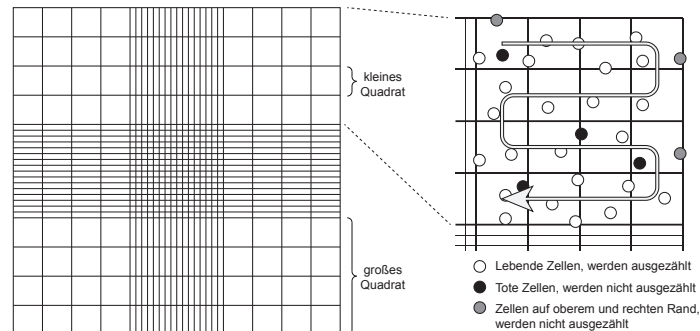


Abbildung 63: Neubauer-Zählkammer und Zählchema eines großen Quadrates [Lindl, 2000]

6.2.8 Inkubation mit Testsubstanzen bzw. Kapselsystemen

Zu untersuchende Testsubstanzen werden zunächst 100-fach konzentriert in DMSO gelöst, welches direkt vor der Zellinkubation im Kulturmedium homogenisiert wird (DMSO-Endkonzentration 1 %). Extraktbeladene Kapselsysteme werden in 15 ml-Röhrchen in entsprechender Menge vorgelegt. Kurz vor der Zellinkubation werden 5 ml Zellkulturmedium zugegeben. Nach kurzem Schütteln wird die Kapselsuspension in die Petrischale mit den Zellen überführt. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C für unterschiedliche Zeiten inkubiert.

6.2.9 Lösungen

- **DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S**
 - 50 ml FKS, hitzeinaktiviert
 - 5 ml P/S

auftauen und in 500 ml DMEM homogenisieren.
- **10 × PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)**
 - 1710 mM (100 g) NaCl
 - 100 mM (14,2 g) Na₂HPO₄
 - 34 mM (2,54 g) KCl

- 18 mM (2,45 g) KH_2PO_4

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 l auffüllen ($\text{pH} = 7,4$),
1:10 verdünnen und autoklavieren.

- **Trypsin-Lösung**

- 500 mg Trypsin
- 250 mg EDTA
- 10 ml $10 \times \text{PBS}$

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 l auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH auf 7,0–7,4 einstellen,
steril filtrieren (Porengröße $0,22 \mu\text{m}$) und zu 5 ml aliquotieren, Lagerung bei -20°C .

- **DAPI/SR101-Lösung**

- 200 mM TRIS
- 200 mM NaCl
- $8 \mu\text{M}$ 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)
- $50 \mu\text{M}$ Sulforhodamin-101 (SR101)

in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen und pH auf 7,6 einstellen.

6.3 Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, mit der die Amplifikation von DNA zeitgleich fluorometrisch quantifiziert werden kann. Sie basiert auf der Polymerasekettenreaktion (PCR). Um mRNA-Gehalte in einer Probe zu messen, wird die Gesamt-RNA isoliert und anschließend mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben.

6.3.1 Zellinkubation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden mRNA-Gehalte in humanen PBMC und HT29-Zellen gemessen. Die Isolierung von PBMC ist in Abschnitt 6.7.3 erläutert.

- Aussäen von 600 000 HT29-Zellen mit 5 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) in 6 cm-Petrischalen. Inkubation unter zellspezifischen Bedingungen für 72 h.
- Inkubation mit testsubstanzhaltigem DMEM (10 % FKS, 1 % P/S, 100 U/ml Katalase) für 20 h unter zellspezifischen Bedingungen (Abschnitt 6.2.8).

6.3.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt nach der „Single Step Methode“. Dabei werden die Zellen in guanidinisocyanathaltigem Puffer lysiert. Dieses Reagenz denaturiert effektiv Proteine, dadurch wird einerseits die Zelle komplett aufgeschlossen, auf der anderen Seite werden RNasen zerstört [Chomczynski und Sacchi, 1987]. Anschließend wird die RNA ethanolisch gefällt und über Festphasenextraktion isoliert. Hierzu bedient man sich Silikasäulen, an die vor allem RNA-Sequenzen binden, die länger als 200 nt sind [RNeasy[®] Mini Handbuch]. Die so isolierte RNA besteht hauptsächlich aus rRNA, tRNA und mRNA. Letztere macht jedoch nur einen Anteil von wenigen Prozent aus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird RNA aus humanen PBMC sowie aus HT29-Zellen isoliert. Die Protokolle unterscheiden sich daher geringfügig in Abhängigkeit der Zellart.

Durchführung:

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wird der „RNeasy[®] Mini Kit“ (Qiagen) verwendet. Die Volumina der eingesetzten Reagenzien ist von der Zellart abhängig und der Tabelle 22 zu entnehmen.

- Abzentrifugieren ($400 \times g$, 5 min, RT) der PBMC aus RNAlater-Puffer und nach Resuspendieren in 1 ml PBS-Puffer erneut Abzentrifugieren ($400 \times g$, 5 min, RT). HT29-Zellen werden mit kaltem PBS-Puffer gewaschen.
- Entfernen der Puffer-Reste mit einer Pipette und Zugabe von RLT-Puffer (Zusatz von 1 % β -Mercaptoethanol direkt vor Verwendung).

- Abschaben der HT29-Zellen mit sterilem Zellschaber und Überführen in ein Reaktionsgefäß.
- Homogenisieren beider Zelltypen durch zehnfaches Ziehen durch eine Kanüle (20 Gauge).
- Zugabe von 600 µl (PBMC) bzw. 350 µl (HT29-Zellen) Ethanol und Homogenisieren mittels Pipette.
- Auftragen von 600 µl des Zelllysats auf die Silikasäule. Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 30 sec, RT) und anschließend Verwerfen des Durchflusses. Das Zelllysate von HT29-Zellen wird komplett aufgetragen.
- Auftragen des restlichen Zelllysats von PBMC auf die Säule. Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 30 sec, RT) und anschließend Verwerfen des Durchflusses.
- Auftragen von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule. Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 30 sec, RT) und anschließendes Verwerfen des Durchflusses.
- Auftragen von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule. Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 30 sec, RT) und anschließendes Verwerfen des Durchflusses.
- Wiederholtes Auftragen von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule. Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 30 sec, RT) und anschließendes Verwerfen des Durchflusses.
- Trocknen der Säule in frischem Auffangbehälter durch Zentrifugation ($10\,000 \times g$, 2 min, RT).
- Elution der RNA mit 30 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{RNasefrei}}$ ($10\,000 \times g$, 2 min, RT).
- Weiterverarbeitung der RNA auf Eis bzw. Lagerung bei -80°C .

Der RNA-Gehalt der Proben wird fotometrisch bei $\lambda = 260\text{ nm}$ mit dem NanoDrop ND-2000 System ermittelt. Verunreinigungen durch Proteine werden über das Verhältnis der Absorptionen bei $\lambda = 260$ und 280 nm (A_{260}/A_{280}) ermittelt. Dieses sollte zwischen 1,9 und 2,3 liegen [RNeasy® Mini Handbuch]. Die Untersuchung der RNA-Integrität wird für ausgewählte Proben mit dem RNA 6000 Pico Kit von Agilent Technologies angeschlossen.

6.3.3 RNA-Integrität

Die Integrität der RNA in Proben für Transkriptionsuntersuchungen ist Voraussetzung für die Validität der Ergebnisse. Ausgewählte Proben werden daher mit dem RNA 6000 Pico Kit von Agilent Technologies überprüft. Das zugrundeliegende Analysenprinzip basiert auf einer Kapillargelelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz als Detektion. Das Vorbereiten des Elektrophoresechips und dessen Beladung erfolgt nach dem Handbuch des Kits. Die RNA-Qualität wird nach Auswertung als sogenannte RNA-Integrationsnummer (RIN) zwischen 1 und 10 angegeben. Ein RIN-Wert von 1 entspricht dabei vollständig degradierter RNA und ein Wert von 10 vollständig intakter RNA. RNA-Proben mit RIN-Werten ≤ 5 sollten nicht für Transkriptionsuntersuchungen eingesetzt werden.

Tabelle 22: Volumina der Reagenzien für die RNA-Isolierung abhängig von der verwendeten Zellart.

Reagenz	PBMC	HT29-Zellen
PBS-Puffer (Waschschritt)	1 ml	3 ml
RLT-Puffer	600 µl	350 µl
Ethanol (70 %)	600 µl	350 µl
RW1-Puffer	700 µl	700 µl
RPE-Puffer	500 µl	500 µl
H ₂ O _{RNasefrei}	30 µl	30 µl

Durchführung:

Vor der Durchführung werden alle verwendeten Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt.

- Auftragen von 550 µl Gelmatrix auf einen Spinfilter.
- Zentrifugation ($1\,500 \times g$, 10 min, RT).
- Aliquotieren der filtrierten Gelmatrix und Lagerung bei 4 °C bis zu einem Monat.
- Vortexen des Farbstoffkonzentrats für 10 s. Zugabe von 1 µl des Gelfarbstoffs zu 65 µl Gelmatrix.
- Vortexen des Gel/Farbstoffgemisches und Abzentrifugieren möglicher Feststoffe ($13\,000 \times g$, 10 min, RT).
- Beladen des Elektrophoresechips mit Gelmatrix unter Zuhilfenahme der Ladeapparatur.
- Beladen des Elektrophoresechips mit Proben (1 ng RNA) und RNA-Leiter nach Vorschrift.

Die Kapillarelektrophorese erfolgt im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Mit Hilfe der Software „2100 Expert“ werden die Daten ausgewertet.

6.3.4 Reverse Transkription

Taq-DNA-Polymerasen der PCR können ausschließlich DNA vervielfältigen, daher muss RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt mit Hilfe von viralen Enzymen, sogenannter reverser Transkriptasen.

Durchführung:

Für die reverse Transkription wird der Kit “QuantiTect[®] Reverse Transcription“ von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgt aufgrund der möglichen Kontaminationsgefahr durch RNasen auf Eis.

- Verdünnen der RNA-Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{RNasefrei}}$ auf eine RNA-Menge von 250 ng in einem Volumen von 6 μl .
- Zugabe von 1 μl gDNA Wipeout-Puffer und anschließende Inkubation bei 42 °C für 2 min.
- Zugabe von 3 μl RT-Mastermix (Tabelle 23) und anschließende Inkubation bei 42 °C für 2 min.

Tabelle 23: Pipettierschema des RT-Mastermix für einen Reaktionsansatz von 10 μl .

Reagenz	pro Reaktion
5 × RT-Puffer	4 μl
Primer Mix	1 μl
Reverse Transkriptase	1 μl

6.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der genspezifischen Vervielfältigung von DNA. Theoretisch können aus einer einzelnen DNA-Sequenz innerhalb kurzer Zeit mehrere Milliarden Kopien mit Hilfe einer hitzeresistenten DNA-Polymerase, der sog. Taq-Polymerase gebildet werden. Dieses Enzym stammt ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*.

Für die PCR werden, neben dem zu amplifizierenden DNA-Template genspezifische Primer, die Taq-DNA-Polymerase, dNTPs und ein Puffer, welcher die korrekten Bedingungen für die enzymatische Reaktion sicherstellt, benötigt. Die verwendeten PCR-Primer (Qiagen) sind so konstruiert, dass sie (wenn möglich) eine Exon/Exon-Schnittstelle überlagern. Somit können Koamplifikationen von gDNA vermieden werden [QuantiTect® Primer Assay Handbook]. Bei der verwendeten Taq-Polymerase handelt es sich um eine Hotstart-Polymerase, die zunächst durch Inkubation bei 95 °C aktiviert werden muss.

Ablauf der PCR:

Die PCR läuft generell in einer zyklischen Abfolge von drei Schritten in einem sog. Thermocycler ab. Diese Schritte werden bis zu 40 mal hintereinander wiederholt.

1. **Denaturierung:** Der PCR-Ansatz wird für ca. 15 s auf 95 °C erhitzt. Dabei werden das Template und die Primer durch Brechung der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen.
2. **Primerhybridisierung:** Die Temperatur wird für 20–30 s auf 50–60 °C erniedrigt. Bei dieser Temperatur können sich die Primer spezifisch an die entsprechenden DNA-Sequenzen anlagern. Schon in diesem Temperaturbereich kann die Taq-DNA-Polymerase an das Primer/Templatehybrid binden und mit der Verlängerung der DNA-Sequenz unter Verbrauch von dNTPs beginnen.

3. **Elongation:** Die Temperatur wird für 10–30 s auf ca. 72 °C erhöht. Bei dieser Temperatur hat die Taq-DNA-Polymerase ihre höchste Aktivität. Der komplementäre DNA-Strang wird bis zum Ende der Sequenz vervollständigt.

6.3.6 SYBR Green I

Bei der quantitativen Real-Time PCR wird die Amplifikation der DNA in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen. Dies geschieht mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (Abbildung 64). Dieser Farbstoff interkaliert in dsDNA. Der dabei gebildete Komplex absorbiert blaues ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 524 \text{ nm}$). Die Zunahme der Fluoreszenz kann in einem entsprechenden Thermocycler gemessen werden. Bei der SYBR-Green-Methode muss im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um sicherzustellen, ob die zu untersuchende Sequenz spezifisch amplifiziert wurde. Die dsDNA wird dabei langsam erhitzt; erst beim Schmelzpunkt des DNA-Fragments, welcher von der Nukleotidsequenz abhängig ist, wird der Farbstoff freigegeben und die Fluoreszenz erniedrigt [Zipper *et al.*, 2004]. Eine spezifisch abgelaufene PCR-Reaktion sollte einen einzelnen Peak in der 1. Ableitung der Schmelzkurvenfunktion aufweisen.

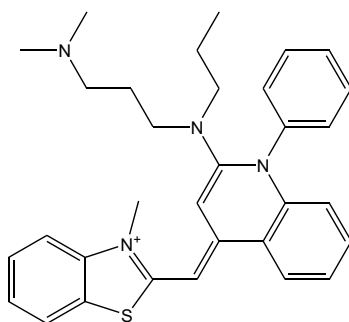


Abbildung 64: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I

6.3.7 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgt nach der $\Delta\Delta C_q$ -Methode. Die bei der qRT-PCR aufgenommenen Amplifikationskurven weisen einen Bereich mit exponentiellem Anstieg auf. In diesen Bereich wird eine Schwelle (*Threshold*) gelegt. So kann jeder Amplifikationskurve ein PCR-Zyklus-Wert („*Threshold cycle*“, C_q -Wert) zugeordnet werden, bei dem das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert überschreitet. Diese Methode liefert genauere Werte als Endpunktbestimmungen. Die Normalisierung der Daten erfolgt auf ein konstitutiv exprimiertes Gen (*Housekeeping gene*) als endogene Amplifikationskontrolle. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit werden die endogenen Kontrollgene β -Aktin und GAPDH verwendet. Die Berechnung der relativen Transkription (rT) erfolgt nach den Formeln 6.5–6.7. Voraussetzung für diese Methode ist, dass die relative Effizienz der PCR-Reaktionen der untersuchten Gene vergleichbar mit der von β -Aktin bzw. GAPDH ist.

$$\Delta C_q = C_{q\text{Gen}} - C_{q\beta\text{-Aktin}} \quad (6.5)$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q\text{Probe}} - \Delta C_{q\text{Kontrolle}} \quad (6.6)$$

$$rT = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (6.7)$$

Durchführung:

Für die Durchführung der qRT-PCR wird der Kit „QuantiTect[®] SYBR Green PCR“ von Qiagen verwendet.

- Verdünnen der cDNA-Proben mit H₂O_{RNasefrei} (1:10).
- Vorlegen von 9 µl PCR-Mastermix (Tabelle 24) pro Well einer 96 Well-PCR-Platte.
- Zupipettieren von 1 µl verdünnter cDNA-Lösung.
- Versiegeln der PCR-Platte mit Kunststoffilm.

Die Reaktion findet im Real-Time-Thermocycler (StepOnePlus von Applied Biosystems) mit folgendem Programm statt:

1. Inkubation bei 95 °C für 15 min (Aktivieren der Hotstart Taq-Polymerase).
2. Inkubation bei 94 °C für 15 s (Denaturierungsphase).
3. Inkubation bei 55 °C für 30 s (Primerhybridisierungsphase).
4. Inkubation bei 72 °C für 30 s (Elongationsphase).
5. Detektion der Fluoreszenz.
6. 39 × Wiederholen der Schritte 2–5.
7. Bestimmung der Schmelzkurven von 40–60 °C in 1 °C-Schritten.

Tabelle 24: Pipettierschema des PCR-Mastermix für einen Reaktionsansatz von 10 µl.

Reagenz	pro Reaktion
QuantiTect [®] SYBR Green Master Mix (2 ×)	5 µl
QuantiTect [®] SYBR Green Primer Assay (10 ×)	1 µl
H ₂ O _{RNasefrei}	3 µl

6.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgt mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 (Abbildung 65), der unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen bindet und dabei sein Absorptionsmaximum von $\lambda = 465 \text{ nm}$ zu 595 nm verschiebt. Gemessen wird die Änderung in der Absorption bei $\lambda = 595 \text{ nm}$. Die Farbstoffkomplexe sind nach 2 min vollständig ausgebildet und für ca. 1 h stabil. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgt anhand einer BSA-Standardgerade [Bradford, 1976].

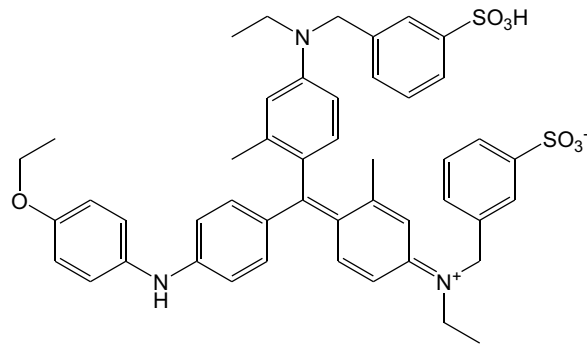


Abbildung 65: Strukturformel von Coomassie Brilliant Blau G250

Durchführung:

- Erstellen einer Verdünnungsreihe aus BSA-Stammlösung (2 mg/ml) in den Schritten 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 und 1,4 mg/ml.
- Verdünnen der Probe in den Bereich der Standardverdünnungsreihe.
- Vorlegen von 10 μl der BSA-Verdünnungsreihe, 10 μl der verdünnten Probenlösung, 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Blindwert Verdünnungsreihe) bzw. 10 μl Probenpuffer (Blindwert für Proben aus Western Blot Analyse).
- Zugabe von 1 ml Bradfordreagenz pro Reaktionsgefäß und anschließendes Vortexen.
- Überführen von $3 \times 200 \mu\text{l}$ dieser Lösungen in eine Mikrotiterplatte.
- Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ im Mikrotiterplattenlesegerät (Victor³V).

Die Werte der Triplikate werden gemittelt. Über die Gleichung der Standardgerade wird die Proteinkonzentrationen der Probenlösung bestimmt.

Lösungen

- **Bradford-Reagenz**
 - 100 mg Coomassie Brilliant Blau G250
 - 50 ml Ethanol

– 100 ml H_3PO_4 (85 %)

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1000 ml auffüllen. Die Lösung ist einen Monat vor Verwendung anzusetzen und vor Gebrauch abzufiltrieren

6.5 Western Blot Analyse zur Bestimmung der EGFR-Aktivität

Unter Western Blot Analyse versteht man die elektrophoretische Übertragung von Proteinen, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Membran mit anschließender Immunodetektion. Im der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe der Western Blot Analyse die Rezeptoraktivität des EGFR über dessen Phosphorylierungsgrad bestimmt. Dazu wird die endogene und die phosphorylierte Menge Rezeptors mittels spezifischer Antikörper ermittelt.

6.5.1 Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) wird das Protein zunächst mittels SDS (Natriumlaurylsulfat, Abbildung 66), einem Detergenz, und β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken spaltet, denaturiert. Würde das Protein nicht denaturiert, wäre die Auftrennung noch von weiteren Faktoren, wie z. B. der Proteinfaltung etc. abhängig. Das Detergenz lagert sich mit der hydrophoben Seite in einem Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1,0 g Protein an das Polypeptidrückgrat. Durch die hohe negative Ladung wird die ursprüngliche Ladung der Proteine vernachlässigbar und alle Moleküle erhalten dasselbe Masse/Ladungsverhältnis. Die Trennung erfolgt somit hauptsächlich nach der Größe des Moleküls.

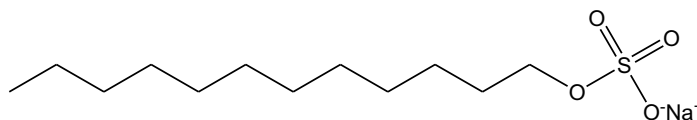


Abbildung 66: Strukturformel von Natriumlaurylsulfat (SDS)

Nach der Denaturierung wird die Proteinlösung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und in ein elektrisches Feld gebracht. Das Grundprinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung stellt die elektrophoretische Mobilität des einzelnen Proteins dar. Sie ist eine Funktion der Länge des entfalteten Proteins bzw. des Molekulargewichtes und weiterer Faktoren, wie z. B. posttranslationalen Modifikationen.

Da die Masse eines denaturierten Proteins proportional zu seinem hydrodynamischen Ionenradius ist, haben unterschiedlich große Proteine unterschiedliche Stoffgeschwindigkeiten und können so im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch das Gel und können anhand eines mitgeführten Molekulargewichtstandards identifiziert werden [Cammann, 2001].

Vorbereitung der Elektrophoresegele:

Die Auftrennung der Proteine findet mittels vertikaler, diskontinuierlicher Gelelektrophorese in einem 7%-igen (Tubulin) bzw. 12%-igen (EGFR, pEGFR) Polyacrylamid-Trenngel statt. Das Gel wird am Vortag in der Elektrophoresekammer gegossen und über Nacht, mit 1-Butanol überschichtet, bei 4 °C aufbewahrt. Die Überschichtung mit Butanol dient der

Ausbildung einer einheitlichen Gelgrenze, dem Fernhalten von Sauerstoff und als Schutz vor dem Austrocknen.

- Zusammenbau der Elektrophoresekammer (PerfectBlue Doppelsystem Twin ExW S von Peqlab) nach Vorschrift. Die Glasplatten werden vor der Montage mit Ethanol (70 %) gereinigt.
- Pipettieren der Trenngele (7 % für Tubulin und 12 % für EGFR/pEGFR).
- Zügiges Einfüllen der Gele in die Kammern und Überschichten mit 1-Butanol.
- Aushärten der Gele für ca. 45 min.
- Abziehen des 1-Butanols und zweimaliges Waschen mit H_2O_{bidest} .
- Einsetzen der Teflonkämme zur Formung der Sammelgeltaschen.
- Pipettieren der Sammelgele (3,8 % für alle Proteine).
- Zügiges Einfüllen der Sammelgele.
- Entfernen von möglichen Luftblasen durch Bewegen des Teflonkamms.
- Aushärten der Sammelgele über Nacht bei 4 °C
- Vor der Probenaufgabe Entfernen der Teflonkämme und Abziehen überschüssigen Puffers mit einer Kanüle (22 Gauge).

Probenvorbereitung:

Die Proteingewinnung für die Western Blot Analyse erfolgt auf Eis.

- Aussäen von 2×10^6 HT29-Zellen in 10 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) in 10 cm-Petrischalen. Anschließend zellspezifische Inkubation für 48 h.
- 24 h vor der Substanzinkubation wird das Kulturmedium gegen serumreduziertes DMEM (1 % FKS und 1 % P/S) ausgetauscht.
- Substanzinkubation in 5 ml serumfreiem DMEM (1 % P/S, 100 U/ml Katalase) für 45, 60, 120 bzw. 180 min. Inkubation von 1 % DMSO oder unbeladenen Kapseln (äquivalente Menge) als Negativkontrolle.
- Zugabe von EGF (100 ng/ml) 15 min vor Beendigung der Inkubation.
- Abschütten des Mediums und zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer. Restloses Entfernen des Puffers.
- Überschichten der Zellen mit 200 µl RIPA-Lysepuffer und anschließendes Abschaben.
- Zellaufschluss im Handhomogenisator (Wheaton) mit 40 Hüben eines „Tight Pistills“.

- Zentrifugation ($20\,000 \times g$, 10 min, RT).
- Bestimmung der Proteinkonzentration des Überstands nach Bradford (Abschnitt 6.4).
- Verdünnung der Proben mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf eine Proteinmenge von $720\,\mu\text{g}$ in $200\,\mu\text{l}$ Lösung.
- Versetzen mit $40\,\mu\text{l}$ $6 \times$ SDS-Probenpuffer und anschließende Inkubation für 8 min bei 96°C im Blockheizgerät.
- Auftragen von $20\,\mu\text{l}$ denaturierter Proteinlösung ($\hat{=}$ $60\,\mu\text{g}$ Protein) pro Tasche auf das vorbereitete Gel.
- Vorsichtiges Übersichten der Proteinproben mit Laufpuffer.
- Starten der Elektrophorese nach folgendem Programm:
 1. 30 min bei 120 V
 2. 90 min bei 140 V

Lösungen

- **RIPA-Lysepuffer**

- 50 mM (606 mg) TRIS
- 250 mM (1460 mg) NaCl
- 1 mM (37,2 mg) EDTA
- 1 mM (4,2 mg) NaF
- 1 % (1 ml) Igepal CA-630

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen, unmittelbar vor Gebrauch pro Milliliter versetzen mit:

- $20\,\mu\text{l}$ PIM (Proteaseinhibitor-Mix)
- $10\,\mu\text{M}$ ($5\,\mu\text{l}$) Na_3VO_4 (2 mM Lösung)
- $10\,\mu\text{M}$ ($10\,\mu\text{l}$) PMSF (1 mM Lösung in Isopropanol)

- **TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)** 18,2 g TRIS mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ml auffüllen, pH auf 8,8 einstellen.
- **TRIS-Puffer (0,5 M, pH 6,8)** 1 g TRIS mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ml auffüllen, pH auf 6,8 einstellen.
- **APS (ca. 10 %)** ein Eppendorfreaktionsgefäß zu 1/3 mit APS füllen mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auffüllen.
- **SDS (10 %)** 10 g SDS mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ml auffüllen, abfiltrieren.

- **7%-iges Trenngel**

Für ein Gel

- 3,97 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 1,92 ml TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
- 1,80 ml Acrylamidstammlösung (Rotiphorese Gel 30)
- 76,8 μl SDS (10 %)
- 38,4 μl APS (ca. 10 %)
- 3,84 μl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

kurz vor dem Gießen zusammenpipettieren und luftblasenfrei zwischen die beiden eingespannten Glasplatten füllen.

- **12%-iges Trenngel**

Für ein Gel

- 2,69 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 1,92 ml TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
- 3,08 ml Acrylamidstammlösung (Rotiphorese Gel 30)
- 76,8 μl SDS (10 %)
- 38,4 μl APS (ca. 10 %)
- 3,84 μl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

kurz vor dem Gießen zusammenpipettieren und luftblasenfrei zwischen die beiden eingespannten Glasplatten füllen.

- **3,8%-iges Sammelgel** Für ein Gel

- 1,58 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 0,66 ml TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
- 0,33 ml Acrylamidstammlösung (Rotiphorese Gel 30)
- 26,4 μl SDS (10 %)
- 26,4 μl APS (ca. 10 %)
- 2,64 μl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

kurz vor Gießen des Geles zusammenpipettieren und luftblasenfrei über das Trenngel zwischen die eingespannten Glasplatten füllen.

- **6 $\times$ SDS-Probenpuffer**

- 50 ml TRIS-Puffer (0,5 M, pH 6,8)
- 40 ml Glycerol
- 1,24 g SDS

- 160 mg Bromphenolblau

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ml auffüllen, zu 1 ml aliquotieren und im Kühlschrank aufbewahren, vor Gebrauch mit 52,6 μl β -Mercaptoethanol versetzen.

- **10 $\times$ Elektrophorese-Laufpuffer**

- 2 M (300 g) Glycin
- 250 mM (60,57 g) TRIS
- 1 % (20 g) SDS

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 2 l auffüllen, pH auf 8,3 einstellen
für Gebrauch 1:10 verdünnen

6.5.2 Proteintransfer

Da die Proteine im Polyacrylamidgel nicht immunologisch detektiert werden können, müssen sie auf eine entsprechende Matrix übertragen werden. Beim Western Blot erfolgt der Transfer elektrophoretisch im Wet-Blotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran. Das Gel und die Membran finden sich dabei in einer Art Sandwichstapelung zwischen Filterpapieren eingetaucht im Blottingpuffer. Durch Anlegen einer Spannung werden die Proteine auf die Membran übertragen. Im Anschluss an den Blot müssen die unspezifischen Bindungsstellen mit BSA oder Milchpulver abgesättigt werden [Towbin *et al.*, 1979, Burnette, 1981].

Durchführung:

- Äquilibrieren von Nitrozellulosemembran und Filterpapieren in Blottingpuffer für mehrere Stunden.
- Waschen des Trenngels mit Blottingpuffer.
- Stapelung von Filterpapier, Zellulosemembran, Trenngel und einem zweiten Filterpapier.
- Vorsichtiges Auspressen überschüssigen Puffers und Luftblasen aus dem Stapel mit einer Rolle.
- Einsetzen des Stapels in die Blottingkassette und Einhängen in die Puffergefüllte Blottingkammer.
- Anschließen des Kühlsystems und Blot bei 150 mA für 75 min.
- Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Zellulosemembran durch Inkubation in Milchpulverlösung für 1 h bei RT.

Lösungen:

- **20 × TBST-Puffer**

- 2,6 M (303,9 g) NaCl
- 400 mM (96,9 g) TRIS

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 2 l auffüllen, pH auf 7,6 einstellen,
für Gebrauch 1:20 verdünnen und mit 0,3 % Tween versetzen.

- **2 × Blottingpuffer**

- 78 mM (11,7 g) Glycin
- 96 mM (23,3 g) TRIS
- 0,074 % (1,48 g) SDS
- 800 ml Methanol

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 2 l auffüllen, für Gebrauch 1:2 verdünnen.

- **Milchpulverlösung (5 %)**

2 g Milchpulver in 40 ml TBST-Puffer lösen.

6.5.3 Immunodetektion

Die Detektion der Proteine erfolgt immunologisch. Dabei bindet zunächst ein Antikörper an das Zielprotein, der spezifisch gegen dieses gerichtet ist. Im darauf folgenden Schritt erfolgt die Bindung eines Sekundärantikörpers, der gegen den ersten gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) gebunden. Dieses Enzym oxidiert Luminol mit H_2O_2 und ruft somit eine Chemolumineszenz hervor, welche gemessen werden kann (Abbildungen 67A und B) [Leong *et al.*, 1986].

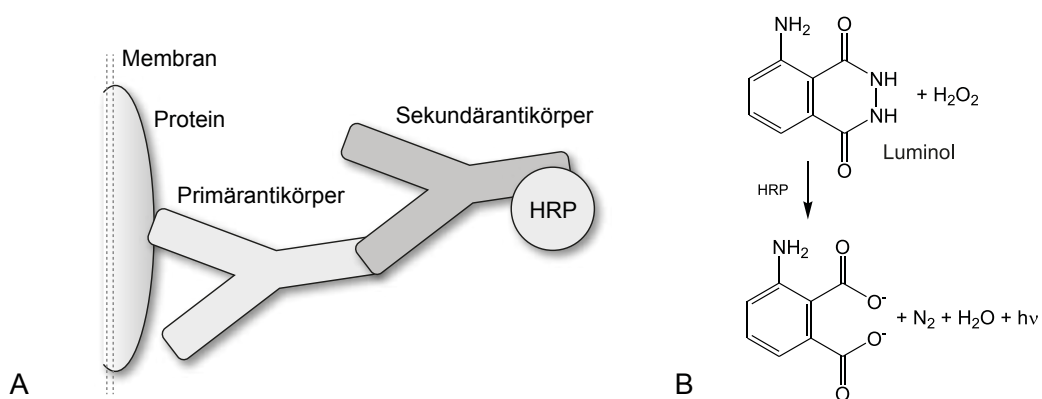


Abbildung 67: A) Modell der Antikörperbindung an das Zielprotein. B) Chemolumineszenzreaktion von Luminol, katalysiert durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish peroxidase*).

Durchführung:

- Einschweißen der Membran in Kunststoffolie.
- Befüllen der Folie mit 5 ml Primärantikörperlösung.
- Inkubation über Nacht bei 4 °C.
- Dreimaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer für je 5 min.
- Einschweißen der Membran in Kunststoffolie.
- Befüllen der Folie mit 5 ml Sekundärantikörperlösung.
- Inkubation für 1 h bei RT.
- Dreimaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer für je 5 min.
- Inkubation der Membran in 4 ml ECL-Detektionslösung für 1 min und Detektion der Chemolumineszenz mittels CCD-Kamera (LAS-4000). Quantifizierung der Proteinbanden mit der Software Multi-Gauge v2.0.

Lösungen:

- **Primärantikörperlösungen**
 - anti-EGFR (Maus): 1:1000 in Milchpulverlösung
 - anti-pEGFR (Ziege): 1:1000 in Milchpulverlösung
 - anti-Tubulin (Maus): 1:2000 in Milchpulverlösung
- **Sekundärantikörperlösungen**
 - anti-Maus HRP-konjugiert: 1:2000 in Milchpulverlösung
 - anti-Ziege HRP-konjugiert: 1:2000 in Milchpulverlösung
- **Detektionslösung (PerkinElmer, Western Lightning)**
 - 2 ml Luminollösung
 - 2 ml Wasserstoffperoxidlösungunmittelbar vor Verwendung erstellen.

6.6 HPLC-Analytik

Die Untersuchung von Anthocyanfreisetzung aus Kapselsystemen und Stabilität im Zellkulturmedium erfolgt in zwei unterschiedlichen Ansätzen. Unverkapselter HBE und extraktbeladene Kapselsysteme werden in saurem (pH 2, zellfrei) und neutralem Medium (pH 7,8, in Anwesenheit von HT29-Zellen) inkubiert und die Anthocyanfreisetzung bzw. der Anthocyanabbau mittels HPLC-DAD-Analyse erfasst.

Durchführung zellfrei:

- Ansäuern von Zellkulturmedium (DMEM) mit Ameisensäure (10 % (v/v)) auf pH 2. Ultraschallbehandlung für 10 min zur Entfernung von CO₂.
- Vermischen von unverkapseltem HBE (vorgelöst in 1 % DMSO, Endkonzentration: 200 µg/ml) bzw. Suspendieren der analogen HBE-Menge in MPK bzw. PHK in angesäuertem Zellkulturmedium.
- Inkubation der Lösung/Suspension in 10 cm-Petrischalen im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂).
- Entnahme von Aliquoten (95 µl) direkt nach Vermischen/Suspendieren (0 min) sowie nach 5, 10, 15, 30, 45, 60 und 120 min.
- Vermischen der Aliquote mit 5 µl Del-3,5-diglc-Lösung.
- Zentrifugation (20 000 × g, 10 min, 21 °C) zur Entfernung von Feststoffen.

Durchführung in Anwesenheit von Zellen:

- Aussäen von 1×10^6 Zellen in 10 cm-Petrischalen (DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S).
- Inkubation für 72 h.
- Vermischen von unverkapseltem HBE (vorgelöst in 1 % DMSO, Endkonzentration: 200 µg/ml) bzw. Suspendieren der analogen HBE-Menge in MPK bzw. PHK in Zellkulturmedium (DMEM, 1 % P/S, 100 U/ml Katalase, kein FKS).
- Austausch des Kultur- gegen Inkubationsmedium. Inkubation im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂).
- Entnahme von Aliquoten (85 µl) direkt nach Vermischen/Suspendieren (0 min) sowie nach 5, 10, 15, 30, 45, 60 und 120 min.
- Vermischen der Aliquote mit 5 µl Del-3,5-diglc-Lösung und 10 µl Ameisensäure.
- Ultraschallbehandlung für 10 min zur Entfernung von CO₂.
- Zentrifugation (20 000 × g, 10 min, 21 °C) zur Entfernung von Feststoffen.

HPLC-DAD-Analyse:

- Standardverdünnungsreihe: 0,125 – 8 µg/ml Cy-3-glc mit jeweils 4 µg/ml Del-3,5-diglc, 10 % Ameisensäure.
- Injektion von 10 µl Standard bzw. Probe.
- Gradiententrennung:
 Fließmittel A: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 87/3/10 (v/v/v)
 Fließmittel B: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 40/50/10 (v/v/v)
 Flussrate: 0,5 ml/min
 Fließmittelgradient: 0 min: 2 % B; 20 min: 14 % B; 25 min: 14 % B; 40 min: 18 % B; 45 min: 18 % B; 70 min: 90 % B; 80 min: 2 % B; 90 min: 2 % B (Abbildung 68A).
- Detektion bei $\lambda = 520$ nm.
- Berechnung der Standardgerade aus Peakflächenverhältnis $\frac{A_{\text{Cy-3-glc}}}{A_{\text{Del-3,5-diglc}}}$ (Abbildung 68B).
- Berechnung analytischer Grenzwerte über die Standardgerade nach DIN 32645 (Formeln 6.8–6.10): Nachweisgrenze: 0,224 µg/ml, Erfassungsgrenze: 0,449 µg/ml, Bestimmungsgrenze: 0,787 µg/ml.
- Berechnung der Anthocyankonzentration in Proben als Cy-3-glc-Äquivalente mit Standardgeradenfunktion $f(x) = 0,3332x - 0,0282$.

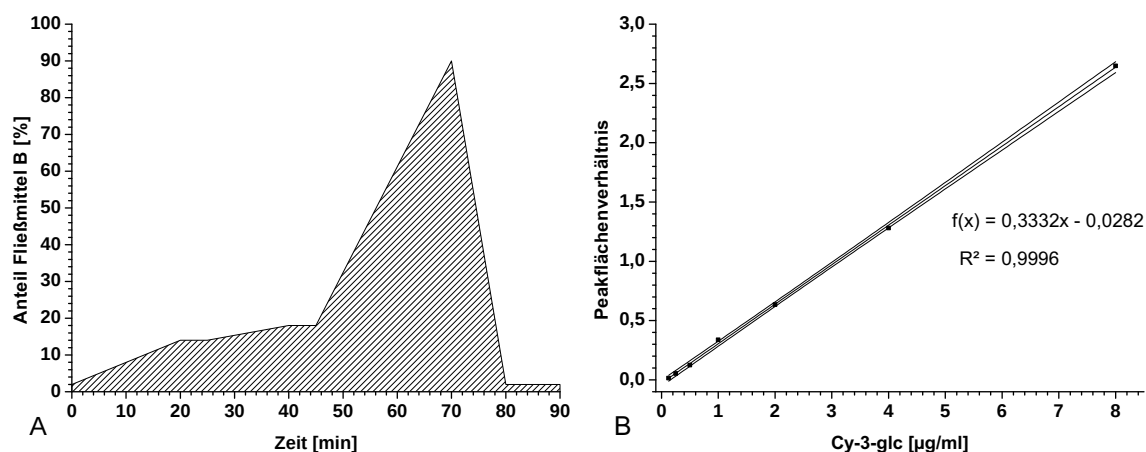


Abbildung 68: A) Gradientenprogramm: Fließmittel A: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 87/3/10 (v/v/v); Fließmittel B: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 40/50/10 (v/v/v). B) Cy-3-glc-Standardgerade zur Anthocyanquantifizierung (Konfidenzintervall: 95 %).

Berechnung analytischer Grenzwerte nach DIN 32645:

$$\text{Nachweisgrenze : } c_{NG} = s_{c_0} \times t_{f,\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{Q_c}} \quad (6.8)$$

$$\text{Erfassungsgrenze : } c_{EG} = c_{NG} + s_{c_0} \times t_{f,\beta} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{Q_c}} \quad (6.9)$$

$$\text{Bestimmungsgrenze : } c_{BG} = k \times s_{c_0} \times t_{f,\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(c_{BG} - \bar{c})^2}{Q_c}} \quad (6.10)$$

c : Konzentration

s_{c_0} : Verfahrensstandardabweichung

n : Anzahl der Kalibrationspunkte

m : Anzahl der Messungen

Q_c : Summe der Abweichungsquadrate von c_i

$\bar{c}$: Mittelwert der Kalibrationskonzentrationen

t : Quantil der t -Verteilung

α : Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art (falsch positiv)

β : Wahrscheinlichkeit für Fehler 2. Art (falsch negativ)

k : relative Ergebnisunsicherheit

6.7 Konzeption der Humanstudie

Die Interventionsstudie wurde im Rahmen des DFG-AIF-Clustervorhaben: „*Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeereextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen*“ durchgeführt und durch den Ethikausschuss der Universität Würzburg (Nr. 32/10) genehmigt. Die Studie wurde im Zeitraum vom 01. Juni bis 08. Oktober 2012 durchgeführt und gliederte sich in zwei Probandenkollektive. Beide Kollektive, fünf gesunde Probanden und fünf Ileostomiepatienten (Details in Tabelle 25) wurden vom Universitätsklinikum Würzburg rekrutiert.

Tabelle 25: Probandenkollektive der humanen Interventionsstudie. Daten erhoben in Zusammenarbeit mit Universität Kaiserslautern und Universitätsklinikum Würzburg. BMI: Body-Mass-Index.

Kollektiv	Proband	Alter [a]	Geschlecht [w/m]	BMI [kg/m ²]
Kontrollprobanden	1	43	w	26,5
	2	50	w	30,2
	3	44	w	30,2
	4	39	w	29,9
	5	29	w	20,5
Ileostomaprobanden	1	34	w	22,6
	2	42	w	24,1
	3	33	w	22,2
	4	24	w	20,7
	5	30	w	24,7

Die Probanden beider Kollektive durchliefen drei Studienabschnitte, in denen sie jeweils unverkapselten HBE sowie dieselbe Menge HBE verkapselt in MPK bzw. CPK verzehrten (Abbildung 53). Vor jeder Interventionsphase wurden die Probanden angehalten, sich 48 h polyphenolarm zu ernähren (Kein Verzehr von Obst und Gemüse, Säften, Rotwein, Bier, Grüntee, Schokolade und Vitaminpräparaten). Während den Interventionsphasen wurden von den Probanden Blut- und Urinproben sowie bei den Ileostomieprobanden Ileostomaausflussproben gesammelt.

6.7.1 Verzehr von Extrakt bzw. Kapseln und diätetischer Verlauf der Studie

10 g HBE bzw. die selbe Menge Extrakt in 144 g MPK oder 30 g CPK wurden einmalig, eingerührt in 150 g Magermilchjoghurt (Fettanteil 1,5 %), innerhalb kurzer Zeit aufgenommen. Beladene MPK konnten, aufgrund des sauren Geschmacks, nach Belieben mit Flüssigsüßstoff gesüßt werden. Im Verlauf jedes Studientages nahmen die Probanden folgende, polyphenolarme Mahlzeiten zu sich:

- 1 h nach Intervention: Ein Brötchen mit Kunsthonig.
- 5 h nach Intervention: Baguettebrötchen mit Schinken und Käse (beliebige Menge).

- 9 h nach Intervention: 500 g gekochte Hartweizennudeln mit 350 ml Sahnesoße.

Während der Interventionsphase tranken die Probanden stündlich 200 ml Wasser.

6.7.2 Probennahme

Den Probanden wurde mittels Venenpunktion Blut von einem ausgebildeten Mitarbeiter des Universitätsklinikums Würzburg in 9 ml-EDTA-Röhrchen abgenommen, das bei 37 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt wurde. Die Blutabnahme erfolgte kurz vor (0 h) sowie 1, 2, 4 und 8 h nach der Intervention. Die Urinproben wurden in fünf Probennahmeintervalle eingeteilt: 24–0 h vor Intervention, 0–2 h, 2–4 h, 4–8 h und 8–24 h nach Intervention. Die Ileostomaausflussproben wurden direkt vor (0 h) sowie 1, 2, 4, 6 und 8 h nach der Intervention gesammelt.

Urin und Ileostomaausflussproben wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und werden daher nicht weiter erörtert.

6.7.3 Isolierung von PBMC

Um das Transkriptionsprofil ausgewählter Gene in den PBMC der Probanden zu untersuchen, wird die Fraktion dieser Zellen aus Vollblut isoliert. Diese Zellfraktion enthält hauptsächlich Lymphozyten (B- und T-Zellen und NK-Zellen) und Monozyten. Die Abtrennung von den Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation. Der Dichtegradient wird unter Zuhilfenahme einer gebrauchsfertigen Ficolllösung (Histopaque) der Firma Sigma-Adrich erstellt.

Durchführung:

- Überschichten von 7 ml Ficolllösung mit 7 ml Vollblut in 15 ml-Röhrchen.
- Zentrifugation der Röhrchen bei $400 \times g$ für 25 min bei RT (Eppendorf Centrifuge 5810 R, deaktivierte Bremse). Erythrocyten und Monocyten sedimentieren in diesem Schritt durch die Ficolllösung und die PBMC sammeln sich an der Grenzschicht zwischen Interphase (Ficolllösung) und Plasma.
- Entnahme der PBMC-Schicht mittels 1 ml Kolbenhubpipette und Überführen der Zellen in 6 ml RPMI-Medium (10 % FKS, 1 % P/S, 37 °C) in 15 ml-Röhrchen.
- Zentrifugation der Röhrchen bei $250 \times g$ für 10 min bei RT (Eppendorf Centrifuge 5810 R, aktivierte Bremse).
- Abziehen des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets in 6 ml RPMI-Medium (10 % FKS, 1 % P/S, 37 °C).
- Zentrifugation der Röhrchen bei $250 \times g$ für 10 min bei RT (Eppendorf Centrifuge 5810 R, aktivierte Bremse).

- Abziehen des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml PBS-Puffer (10 % FKS, 1 % P/S, 4 °C). Überführen der Zellsuspension in 1 ml Reaktionsgefäße.
- Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei $250 \times g$ für 10 min bei RT.
- Abziehen des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml RNAlater-Puffer (Qiagen).
- Einfrieren und Lagerung der Zellen bei -80 °C .

Die Isolierung der RNA aus den PBMC erfolgt nach der Vorschrift in Abschnitt 6.3.2.

6.8 WST-1-Assay

Das Maß der Viabilität der HT29-Zellen nach Testsubstanzinkubation wird mithilfe des kommerziell erhältlichen WST-1-Assays (Roche Applied Science) ermittelt. Der Test basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen 2-(4-Iodphenyl)-5-(2,4-disulfphenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) zu Formazan durch das mitochondriale Dehydrogensasesystem lebender Zellen. Das Salz unterliegt dabei einer Farbänderung von schwach rötlich nach dunkelrot. Die Farbänderung kann bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ spektralfotometrisch erfasst werden. Die Reaktion wird nur von lebenden Zellen vermittelt und kann daher als Maß für die Viabilität einer Zellpopulation verwendet werden.

Durchführung

Die Durchführung erfolgt anhand des Handbuchs des „Cell Proliferation Reagent WST-1“-Kits von Roche Applied Science.

- Aussäen von 1 000 HT29-Zellen pro Well einer 96 Wellplatte in 100 μl DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) und anschließende Inkubation für 48 h unter zellspezifischen Bedingungen. Eine vertikale Reihe wird zur anschließenden Bestimmung der Hintergrundabsorption nicht mit Zellen belegt.
- Abziehen des Kulturmediums und Substanzinkubation in 100 μl serumfreien DMEM (1 % P/S, ohne bzw. mit 100 U/ml Katalase) in sechsfachen Replikaten. Inkubation mit Triton X (1 %) als Positivkontrolle.
- Inkubation für 1 h unter zellspezifischen Bedingungen.
- Abziehen des Inkubationsmediums und zweimaliges Waschen mit warmem PBS-Puffer.
- Vorlegen von 100 μl serumfreien DMEM in alle Wells der Platte.
- Zügige Zugabe von 10 μl WST-1 Reagenz und anschließende Inkubation von 30 min unter zellspezifischen Bedingungen.
- Schütteln der Platte für 5 min und anschließende fotometrische Bestimmung der Absorption bei einer Messwellenlänge von $\lambda_{\text{Mess}} = 450 \text{ nm}$ und einer Referenzwellenlänge von $\lambda_{\text{Ref}} = 450 \text{ nm}$ im Mikrotiterplattenlesegerät (Victor³V).

Die Absorptionswerte bei λ_{Mess} werden zunächst durch Subtraktion der Absorptionwerte bei λ_{Ref} korrigiert. Anschließend erfolgen eine Korrektur um die mittlere Absorption des Hintergrundlevels (Medium ohne Zellen) und ein Ausreißertest nach Nalimov (Formel 6.4) zwischen den Werten der sechsfachen Replikate. Die Absorptionwerte der Replikate werden gemittelt und auf die Negativkontrolle (1 % DMSO) als T/C in Prozent normiert. Mittelwerte zwischen mehreren Versuchen werden berechnet und signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle im Student's *t*-Test ermittelt.

6.9 Sulforhodamin-B-Assay

Der Sulforhodamin-B-Assay (SRB-Assay) wird eingesetzt, um die Zelldichte anhand der Proteinmenge zu bestimmen. Mit diesem Test können sowohl wachstumshemmende, als auch zytotoxische Effekte einer Substanz ermittelt werden. Gemessen wird dabei fotometrisch die Menge an zellproteingebundenem Sulforhodamin-B, einem Fluoreszenzfarbstoff, der ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ besitzt (Abbildung 69) [Skehan *et al.*, 1990].

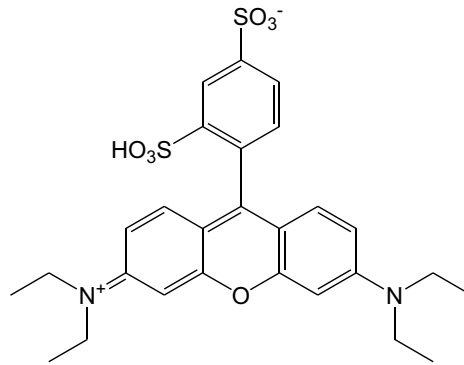


Abbildung 69: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs Sulforhodamin-B

Durchführung:

- Aussäen von 5 000 HT29-Zellen pro Well einer 24 Wellplatte in 1 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S).
- Inkubation in Quadruplikaten für 48 h unter zellspezifischen Bedingungen.
- Substanzinkubation in DMEM (10 % FKS, 1 % P/S, 100 U/ml Katalase) für 24 bzw. 72 h.
- Abstoppen des Zellwachstums mit 100 μl Trichloressigsäurelösung pro Well.
- Fixierung der Zellen für 1 h bei 4 °C.
- Abschütten des Mediums und zweimaliges Waschen der Zellen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$.
- Trocknen der Zellen über Nacht bei RT.
- Anfärben der Zellen mit 300 μl Sulforhodamin-B-Lösung pro Well. Inkubation für 1 h.
- Abschütten der Färbelösung und zweimaliges Waschen der Zellen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$.
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit Essigsäurelösung.
- Trocknen der Zellen über Nacht bei RT.
- Lösen des zellgebundenen Farbstoffs in 300 μl TRIS-Base und fotometrische Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ im Mikrotiterplattenlesegerät (Victor³V).

- Die Absorptionswerte der Quadruplikate werden um deren Blindwerte korrigiert und gemittelt. Ausreißer werden nach Nalimov (Formel 6.4) ausgeschlossen. Die gemittelten Werte werden auf die mittlere Absorption der Negativkontrolle bezogen und als T/C in Prozent berechnet. Mittelwerte zwischen mehreren Versuchen werden berechnet und signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle im Student's *t*-Test ermittelt.

Lösungen

- **Trichloressigsäurelösung (50 %, w/v)**
50 g Trichloressigsäure mit H₂O_{bidest} auf 100 ml auffüllen.
- **Essigsäurelösung (1 %, v/v)**
20 ml Essigsäure (100 %) mit H₂O_{bidest} auf 2 l auffüllen.
- **Sulforhodamin-B-Lösung (0,4 %, w/v)**
400 mg Sulforhodamin mit Essigsäurelösung auf 100 ml auffüllen.
- **TRIS-Base (10 mM)**
24,2 g TRIS mit H₂O_{bidest} auf 2 l auffüllen, mit NaOH-Lösung pH auf 10,4 einstellen.

6.10 Trypanblauausschlusstest

Die Vitalitätsfärbung mit Trypanblau (Abschnitt 6.2.7) kann genutzt werden, um das Zellwachstum einer behandelten im Vergleich zu einer unbehandelten Probe zu untersuchen.

- Aussäen von 140 000 HT29-Zellen in 5 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) in 6 cm-Petrischalen. Anschließend, zellspezifische Inkubation für 24 h.
- Substanzinkubation in 5 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S, 100 U/ml Katalase) für 72 h. Inkubation von 1 % DMSO als Negativkontrolle (Medium bei Partikelinkubation).
- Abschütten des Mediums und einmaliges Waschen mit 3 ml warmem PBS-Puffer. Restloses Entfernen des Puffers.
- Überschichten der Zellen mit 500 µl warmer Trypsinlösung für 2 min.
- Abstoppen der Trypsinreaktion durch Zugabe von 500 µl DMEM (10 % FKS, 1 % P/S).
- Vorsichtiges Lösen der Zellen mit Hilfe der Pipette und Transfer der Zellen in ein Reaktionsgefäß.
- Spülen der Petrischale mit 500 µl DMEM (10 % FKS, 1 % P/S). Vereinen der Zellsuspensionen.
- 1:10 Verdünnung mit Trypanblaulösung und Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer (Abschnitt 6.2.7). Bestimmung von jeweils vier Quadraten.

Die Lebendzellzahlen der Quadruplikate werden gemittelt. Die gemittelten Werte werden auf die Negativkontrolle bezogen und als T/C in Prozent berechnet. Mittelwerte zwischen mehreren Versuchen werden berechnet und signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle im Student's *t*-Test ermittelt.

6.11 ICE-Bioassay

Mit Hilfe des ICE-Bioassays können kovalente DNA/Topoisomeraseintermediate sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfasst werden. Somit kann zwischen katalytischen Topoisomeraseinhibitoren und Topoisomerasegiften (Abschnitt 2.3.2) unterschieden werden.

Behandelte Zellen werden dazu aufgeschlossen und anschließend die Zellproteine von der DNA mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation separiert. Der Gradient wird in Fraktionen unterteilt und diese im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Freie und DNA-gebundene Topoisomerasen werden mittels spezifischer Antikörper gegen die Topoisomeraseisoenzyme I, II α und II β detektiert.

Zellinkubation, Lyse und Ultrazentrifugation

- Aussäen von 3×10^6 HT29-Zellen in 20 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) in 15 cm-Petrischalen. Anschließend, zellspezifische Inkubation für 72 h.
- Substanzinkubation in 10 ml serumfreiem DMEM (1 % P/S, 100 U/ml Katalase) für 1 h. Inkubation von 1 % DMSO als Negativkontrolle.
- Abschütten des Mediums und zweimaliges Waschen mit 4 ml kaltem PBS-Puffer. Restloses Entfernen des Puffers.
- Überschichten der Zellen mit 6 ml Lysepuffer und anschließendes Abschaben.
- Zellaufschluss mittels Kanüle (20 G).
- Auftragen von 4 ml Zelllysats auf einen vorbereiteten CsCl-Gradienten.
- Überschichten des Zelllysats mit Mineralöl zum Luftausschluss und Austarieren der Zentrifugenröhrchen.
- Ultrazentrifugation ($100\,000 \times g$, 24 h, 20 °C).

Fraktionierung, Blotting und Detektion

- Äquilibrieren der Nitrozellulosemembran und Blottingpapiere (2 Papiere pro Membran) in 24 mM Phosphatpuffer bei 4 °C.
- Fraktionierung des CsCl-Gradienten mittels Kanüle durch Anstechen der Unterseite des Zentrifugenröhrchens in 300 μ l-Aliquote.
- Überführen von 300 μ l der Fraktionen in 300 μ l vorgelegten 25 mM Phosphatpuffer.
- Blotten von 180 μ l jeder Fraktion auf die Nitrozellulosemembran mithilfe der Slotblotapparatur (Abbildung 70).
- Äquilibrieren der Membran in $1 \times$ TBST-Puffer.

- Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Zellulosemembran durch Inkubation in Milchpulverlösung für 2,5 h bei RT.
- Einschweißen der Membran in Kunststoffolie.
- Befüllen der Folie mit 5 ml Primärantikörperlösung.
- Inkubation über Nacht bei 4 °C.
- Dreimaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer für je 5 min.
- Einschweißen der Membran in Kunststoffolie.
- Befüllen der Folie mit 5 ml Sekundärantikörperlösung.
- Inkubation für 2 h bei RT.
- Dreimaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer für je 5 min.
- Inkubation der Membran in 4 ml ECL-Detektionslösung für 1 min und Detektion der Chemolumineszenz mittels CCD-Kamera (LAS-4000).

Die Auswertung der Membranen erfolgt nicht quantitativ. Freie Topoisomerasen werden in den Fraktionen 15–20 detektiert, DNA/Topoisomeraseaddukte in den Fraktionen 5–14.

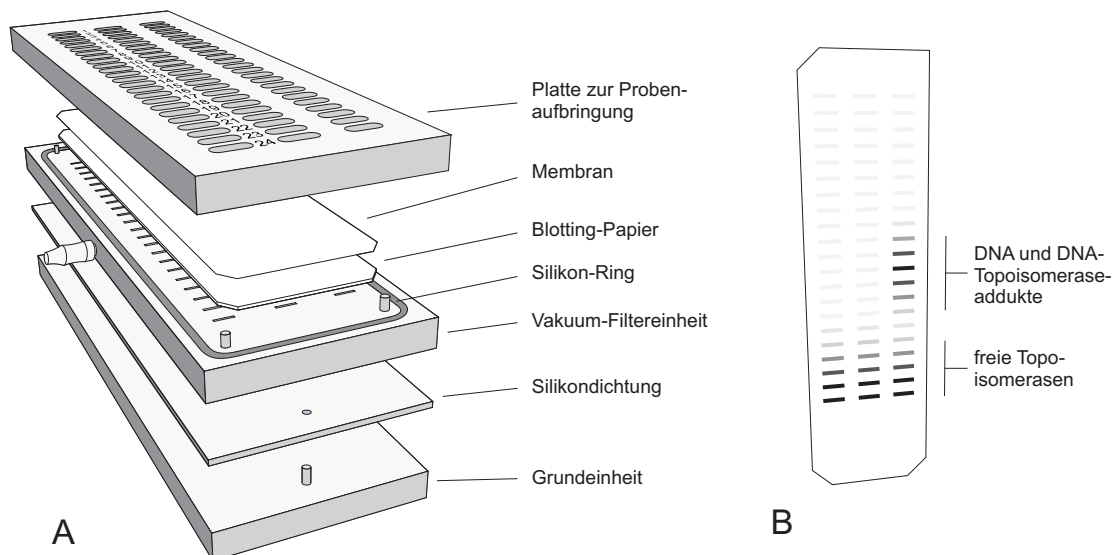


Abbildung 70: A) Slotblotapparat zur Probenaufbringung auf Nitrozellulosemembranen. B) Schematische Darstellung einer Nitrozellulosemembran nach Antikörperdetektion.

Lösungen**• TE-Puffer**

- 10 mM (2,4 g) TRIS
- 1 mM (584 mg) EDTA

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 2 l auffüllen, pH auf 8,0 einstellen.

• Cäsiumchloridgradient

- 120 g CsCl in 70 ml TE-Puffer lösen
- Für einen Gradienten verdünnen:
 1. 1850 μl CsCl-Lösung + 150 μl TE-Puffer
 2. 1600 μl CsCl-Lösung + 400 μl TE-Puffer
 3. 1100 μl CsCl-Lösung + 900 μl TE-Puffer
 4. 900 μl CsCl-Lösung + 1100 μl TE-Puffer

2,0 ml jeder Fraktion vorsichtig zu einem Gradienten übereinander schichten. Unmittelbar vor Verwendung erstellen.

• Sarkosinlysepuffer (1 %, w/v)

10 g N-Lauroylsarkosin Natriumsalz in 100 ml TE-Puffer lösen.

• Na_2HPO_4 -Lösung (1 M)

14,2 g Na_2HPO_4 in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen.

• NaH_2PO_4 -Lösung (1 M)

12,0 g NaH_2PO_4 in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen.

• Phosphat-Puffer

Na_2HPO_4 - und NaH_2PO_4 -Lösung zu gleichen Teilen mischen.

• $10 \times$ TBST-Puffer

- 1,37 M (160,1 g) NaCl
- 200 mM (48,5 g) TRIS

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 2 l auffüllen, pH auf 7,5 einstellen,
für Gebrauch 1:10 verdünnen und mit 1 % Tween versetzen.

• Milchpulverlösung (5 %, w/v)

5 g Milchpulver in 100 ml $1 \times$ TBST-Puffer lösen.

• Primärantikörperlösungen

- anti-Topoisomerase I (Maus): 1:500 in Milchpulverlösung
- anti-Topoisomerase II α (Kaninchen): 1:500 in Milchpulverlösung

- anti-Topoisomerase II β (Kaninchen): 1:500 in Milchpulverlösung
- **Sekundärantikörperlösungen**
 - anti-Maus HRP-konjugiert: 1:2000 in Milchpulverlösung
 - anti-Kaninchen HRP-konjugiert: 1:2000 in Milchpulverlösung

6.12 Nrf2-Luciferase-Reportergenassay

Reportergenassays nutzen einfach zu quantifizierende Proteine (Reporter), um das Ausmaß der Aktivierung eines bestimmten Promotors zu bestimmen. Dabei wird das Reporter-gen unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt. In der vorliegenden Arbeit wird ein Konstrukt aus einem murinen GSTA1-Promotor mit dem Gen einer *Photinus pyralis*-Luciferase, stabil transfiziert in CHO-Zellen, genutzt, um die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs zu quantifizieren. Die transfizierten Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Dirsch erhalten. Die Zellen sind neben dem Reporter-genkonstrukt stabil mit einem Expressionsvektor für das grün fluoreszierende Protein (GFP) transfiziert. Die Quantifizierung der ARE-Aktivierung durch Nrf2-Induktoren erfolgt über die luciferasekatalysierte Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin (Abbildung 71).

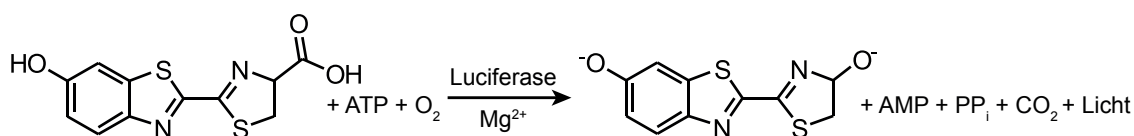


Abbildung 71: Reaktionsgleichung der luciferasekatalysierten Chemolumineszenzreaktion.

Durchführung:

- Aussäen von 60 000 transfizierten CHO-Zellen pro Well einer 96 Wellplatte in 100 µl DMEM (10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin, ohne Phenolrot) und anschließende Inkubation für 5 h unter zellspezifischen Bedingungen.
- Zugabe von 100 µl doppelkonzentrierter Testsubstanzlösung (in DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin, 200 U/ml Katalase, ohne Phenolrot) pro Well (Das ursprüngliche Kulturmedium wird nicht abgezogen). Die Inkubation erfolgt in Quadruplikaten. Testsubstanzen werden zuvor in DMSO gelöst, sodass eine Endkonzentration von 1 % resultiert. Als Positivkontrolle wird mit 100 nM CDDO-Imidazolid inkubiert.
- Inkubation für 20 h unter zellspezifischen Bedingungen.
- Abziehen des Inkubationsmediums, zweimaliges Waschen mit warmem PBS-Puffer (200 und 100 µl).
- Vollständiges Entfernen des PBS-Puffers und Lagern der Zellen für ≥ 1 h bei -80°C .
- Auftauen der Zellen und Versetzen mit 50 µl Lysepuffer pro Well.
- Schütteln der Platte für 10 min.
- Überführen von 40 µl Zelllysats aus jedem Well in Wells einer schwarzen 96 Wellplatte.
- Schütteln der Platte für 1 min.

- Messen der GFP-Fluoreszenz im Mikrotiterplattenlesegerät Tecan Genios Pro ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$).
- Automatische Zugabe von je 50 μl ATP- und Luciferinlösung pro Well durch das Plattenlesegerät.
- Messen der Chemolumineszenz im Plattenlesegerät.

Die GFP-Fluoreszenz- und Chemolumineszenzwerte der Quadruplikate werden gemittelt. Aus den Mittelwerten wird das Verhältnis Chemolumineszenz/GFP-Fluoreszenz gebildet und auf die DMSO-Kontrolle normiert (berechnet als T/C in Prozent). Die Mittelwerte zwischen mehreren Versuchen werden berechnet und signifikante Unterschiede zur DMSO-Kontrolle im Student's *t*-Test ermittelt.

Lösungen

- **Lysepuffer**
 - 9,6 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
 - 2,4 ml 5 $\times$ Reporter-Lysepuffer (Promega)
 - 12 μl Koenzym A-Lösung (270 mM, Promega)
 - 12 μl Dithiothreitol-Lösung (1 mM, Promega)
- **ATP-Lösung**
 - 5 mM ATP (Promega)
 - 20 mM Tricin
- **Luciferinlösung**
 - 1 mM Luciferin (Promega)
 - 20 mM Tricin

6.13 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acetonitril	Roth
- $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ 41,05 g/mol	
Ameisensäure 100 %	Roth
- CH_2O_2 46,03 g/mol	
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth
- $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 228,20 g/mol	
Bromphenolblau	Simigma
- $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{NaO}_5\text{S}$, 691,94 g/mol	
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth
- Fraktion V	
1-Butanol	Roth
- $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, 74,12 g/mol	
Calciumchlorid	Roth
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 147,02 g/mol	
S-(+)-Camptothecin	Sigma-Aldrich
- $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, 348,35 g/mol	
Cäsiumchlorid	Roth
- CsCl , 168,36 g/mol	
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth
- $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$, 877,0 g/mol	
Cyanidinchlorid	Extrasynthese
- $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6\text{Cl}$, 322,7 g/mol	
Cyanidin-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucosidchlorid	Extrasynthese
- $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}\text{Cl}$, 484,82 g/mol	
Cyanidin-3,5-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucosidchlorid	Extrasynthese
- $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{16}\text{Cl}$, 646,95 g/mol	
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
- Na_2HPO_4 , 141,96 g/mol	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
- $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, 78,13 g/mol	
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
- $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 372,24 g/mol	
Essigsäure 100 %	Roth
- $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, 60,05 g/mol	
Ethanol	Roth
- $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 46,07 g/mol	
Etoposid	Sigma
- $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$, 588,57 g/mol	

L-Glutamin	Gibco
- $C_5H_{10}N_2O_3$, 146,15 g/mol	
Glycerol	Roth
- $C_3H_8O_3$, 92,10 g/mol	
Glycin	Roth
- $C_2H_5NO_2$, 75,07 g/mol	
Glycerolphosphat	Sigma
- $C_3H_7Na_2O_6P$, 216,04 g/mol	
Igepal CA-630 (Nonidet P-40)	Sigma
- $(C_2H_4O)_{9-10}C_{14}H_{22}O$	
Kaliumchlorid	Roth
- KCl , 74,55 g/mol	
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën
- KH_2PO_4 , 136,09 g/mol	
N-Lauroylsarkosin Natriumsalz	Sigma
- $C_{15}H_{29}NO_3$, 271,40 g/mol	
Magnesiumchlorid	Riedel-de Haën
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$,	
β -Mercaptoethanol	Roth
- C_2H_6OS , 78,13 g/mol	
Methanol	Fluka
- CH_3OH , 32,04 g/mol	
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Roth
- $NaCl$, 58,44 g/mol	
Natriumfluorid	keine Angabe
- NaF , 41,99 g/mol	
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
- NaH_2PO_4 , 119,98 g/mol	
Natriumhydroxid	Roth
- $NaOH$, 40,00 g/mol	
Natriumorthovanadat	Sigma
- Na_3VO_4 , 183,91 g/mol	
Natriumpyrophosphat	Fluka
- $Na_2H_2P_2O_7$, 221,94 g/mol	
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth
- $C_7H_7FO_2S$, 174,2 g/mol	
<i>o</i> -Phosphorsäure	Roth
- H_3PO_4 , 98,00 g/mol	
Saccharose	Fluka
- $C_{12}H_{22}O_{11}$, 342,30 g/mol	

Salzsäure 37 %	Roth
- HCl, 36,46 g/mol	
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Roth
- C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S, 288,4 g/mol	
SRB, Sulforhodamin-B	Sigma
- C ₂₇ H ₂₉ N ₂ NaO ₇ S ₂ , 580,66 g/mol	
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth
- C ₆ H ₁₆ N ₂ , 116,2 g/mol	
Trichloressigsäure	Roth
- C ₂ HCl ₃ O ₂ , 163,39 g/mol	
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
- C ₄ H ₁₁ NO ₃ , 121,14 g/mol	
Triton-X	Roth
- C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) ₉₋₁₀ , ca. 625 g/mol	
Trypsin	Gibco
Tween-20	Sigma
- C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆ , 1227,72 g/mol	
Tyrphostin AG 1478	Sigma-Aldrich
- C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O ₂ , ca. 315,75 g/mol	
Wasser _{RNasefrei}	Qiagen
- H ₂ O, 18,02 g/mol	

6.14 gebrauchsfertige Lösungen

Produkt	Hersteller
Acrylamidstammlösung, 30 % (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Bovine Serum Albumin Standardlösung (2 mg/ml)	Pierce
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco (Invitrogen)
- [+] 4,5 g/l D-Glucose, [+] L-Glutamin, [-] Pyruvat	
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco (Invitrogen)
ECL-Lösung (Western Lightning)	Perkin-Elmer
Ficolllösung (Histopaque)	Roche
Molekulargewichtsstandard SeaBlue Plus2	Invitrogen
Pen Strep (Penicillin/Streptomycin) 5000 Units/ml Penicillin 5000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen
PIM (Proteaseinhibitor-Mix)	Roche
Reportergergen-Lysepuffer (Reporter Lysis 5X Buffer)	Promega
RNase Away	MβP Molecular Bio Products
RPMI	Gibco (Invitrogen)
Trypanblau-Lösung	Sigma

6.15 Verwendete Kits

Produkt	Hersteller
QuantiTect [®] Reverse Transcription	Qiagen
QuantiTect [®] SYBR Green PCR	Qiagen
RNeasy [®] Mini Spin Column Kit	Qiagen
WST-1-Assay	Roche

6.16 Proteine, Nukleinsäuren

Produkt	Hersteller
Antikörper	Santa Cruz
- α -Tubulin (Maus, sc-5286)	
- EGFR (Maus, sc-81449)	
- pEGFR (Ziege, sc-12351)	
- Topoisomerase I (Maus, sc-56801)	
- Topoisomerase II α (Kaninchen, sc-13058)	
- Topoisomerase II β (Kaninchen, sc-13059)	
- Ziege anti-Maus IgG-HRP-konjugiert (sc-2005)	
- Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP-konjugiert (sc-2354)	
- Maus anti-Ziege IgG-HRP-konjugiert (sc-2004)	
PCR-Primer, 10 $\times$ (QuantiTect [®] SYBR-Green Primer Assay)	Qiagen
- β -Aktin: Hs_ACTB_1_SG	
- GAPDH: Hs_GAPDH_2_SG	
- γ -GCL _h : Hs_GCLC_1_SG	
- GSTA1: Hs_GSTA1_1_SG	
- GSTP1: Hs_GSTP1_1_SG	
- GSTT1: Hs_GSTT1_2_SG	
- HO-1: Hs_HMOX1_1_SG	
- NQO1: Hs_NQO1_1_SG	
- Nrf2: Hs_NFE2L2_1_SG	

6.17 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Eppendorfreaktionsgefäße (0,2, 1,5 und 2,0 ml)	Sarstedt
Mikropipettenspitzen (2,5, 10, 100 und 1000 μ l)	Sarstedt

Mikropipettenspitzen mit Filter (2,5, 10, 100, 200 und 1000 µl)	Sarstedt
Mikrotiterplatten (24- und 96-Well-Format)	Sarstedt
Multipipettenspitzen Combitips (0,5, 5,0 und 10,0 ml)	Eppendorf
Nitrozellulosemembran, 0,2 µm Porengröße (Biotrace)	Pall Life Science
Pasteurpipetten	Roth
PCR-Platten 96-Well	Applied Biosystems
PCR-Siegel-Folien	Applied Biosystems
Blottingpapier (GB005)	Schleicher & Schuell Whatman
Zellkulturflaschen (diverse Größen)	Sarstedt
Zellkulturschalen (diverse Größen)	Sarstedt

6.18 Geräte

Gerät	Name/Modell	Hersteller
Blockheizgerät	Thriller	PEQLAB
CCD-Kamera	LAS-4000	Fujifilm
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell	Thermo Fisher
Elektrophorese-Trafo	EV231	Peqlab
Elektrophorese-Kammer	PerfectBlue Twin ExW S	PEQLAB
Fotospektrometer	ND-2000	NanoDrop Technologies
Mikrotiterplattenlesegerät	Victor ³ V Wallac 1420	PerkinElmer
Sterilwerkbank	KS18	Thermo Fisher
Thermocycler	StepOnePlus	Applied Biosystems
Überkopfschüttler	ROTO-SHAKE GENIE	Scientific Industries
Vortexer	VORTEX GENIE 2	Scientific Industries
Mikrowaage	XP26DR	Mettler Toledo
Präzisionswaage	ML6001	Mettler Toledo
Tischzentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Mikroskop	Axio Scope	Zeiss
Mikroskop	Axioscope40	Zeiss
Slot-Blot-Aparatur	Mini Fold II	Whatman

7 Literaturverzeichnis

- Abe, Y.; Odaka, M.; Inagaki, F.; Lax, I.; Schlessinger, J. und Kohda, D. Disulfide bond structure of human epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (18):11150–11157, 1998.
- Ackermann, M. *Studien zum Verhalten von Anthocyanen aus Heidelbeeren im Humanstoffwechsel – Stabilisierung und Bindung durch Proteine*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2010.
- Adams, J.; Kelso, R. und Cooley, L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biology*, 10(1):17–24, 2000.
- Afaq, F.; Syed, D.; Malik, A.; Hadi, N.; Sarfaraz, S.; Kweon, M.; Khan, N.; Zaid, M. und Mukhtar, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(1):222–232, 2006.
- Afaq, F.; Zaman, N.; Khan, N.; Syed, D.; Sarfaraz, S.; Zaid, M. und Mukhtar, H. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling pathway by delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables. *International Journal of Cancer*, 123(7):1508–1515, 2008.
- Agullo, G.; Gamet, L.; Besson, C.; Demigné, C. und Rémésy, C. Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Letters*, 87(1):55–63, 1994.
- Agullo, G.; Gamet-Payraastre, L.; Fernandez, Y.; Anciaux, N.; Demigné, C. und Rémésy, C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Letters*, 105(1):61–70, 1996.
- Alam, J.; Camhi, S. und Choi, A. Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20):11977–11984, 1995.
- Alam, J.; Wicks, C.; Stewart, D.; Gong, P.; Touchard, C.; Otterbein, S.; Choi, A.; Burow, M. und Tou, J. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36):27694–27702, 2000.

- Andersen, Ø. und Jordheim, M. The anthocyanins. In Andersen, Ø. und Markham, K., editors, *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*, pages 471–551, Boca Raton, London und New York, 2006. Taylor & Francis.
- Anjum, R. und Blenis, J. The RSK family of kinases: Emerging roles in cellular signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10):747–758, 2008.
- Arora, A. und Scholar, E. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3):971–979, 2005.
- Aruoma, O. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7):671–683, 1994.
- Asen, S.; Stewart, R. und Norris, K. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11(3):1139–1144, 1972.
- Asenstorfer, R.; Iland, P.; Tate, M. und Jones, G. Charge equilibria and pK_a of malvidin-3-glucoside by electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 318(2):291–299, 2003.
- Aura, A.; Martin-Lopez, P.; O’Leary, K.; Williamson, G.; Oksman-Caldentey, K.; Poutanen, K. und Santos-Buelga, C. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44(3):133–142, 2005.
- Austin, C.; Patel, S.; Ono, K.; Nakane, H. und Fisher, L. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochemical Journal*, 282(Pt 3):883–889, 1992.
- Ax, K. *Emulsionen und Liposomen als Trägersysteme für Carotinoide*. Shaker, 1 edition, 2004.
- Baehr, H. *Wärme- und Stoffübertragung*. Springer-Verlag, 7 edition, 2010.
- Baird, L. und Dinkova-Kostova, A. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85(4):241–272, 2011.
- Bakker, J. und Timberlake, C. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1):35–43, 1997.
- Baldwin, E. und Osheroff, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(4):363–372, 2005.
- Bandelet, O. und Osheroff, N. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II α and II β . *Biochemistry*, 46(20):6097–6108, 2007.
- Barault, L.; Veyrie, N.; Jooste, V.; Lecorre, D.; Chapusot, C.; Ferraz, J.; Lièvre, A.; Cortet, M.; Bouvier, A.; Rat, P.; Roignot, P.; Faivre, J.; Laurent-Puig, P. und Piard, F. Mutations

- in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *International Journal of Cancer*, 122(10):2255–2259, 2008.
- Bensasson, R.; Zoete, V.; Dinkova-Kostova, A. und Talalay, P. Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols. *Chemical Research in Toxicology*, 21(4):805–812, 2008.
- Benson, A.; Batzinger, R.; Ou, S.; Bueding, E.; Cha, Y. und Talalay, P. Elevation of hepatic glutathione *S*-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo[*a*]pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Research*, 38(12):4486, 1978.
- Berg, S.; Bretz, M.; Hubbermann, E. und Schwarz, K. Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108:158–165, 2012.
- Betz, M. und Kulozik, U. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *International Dairy Journal*, 2011.
- Beuckmann, C.; Fujimori, K.; Urade, Y. und Hayaishi, O. Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochemical Research*, 25(5):733–738, 2000.
- BFEL. Functional Food – Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz, 2005.
- Bhatia, N.; Agarwal, C. und Agarwal, R. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutrition and Cancer*, 39(2): 292–299, 2001.
- Blank, V. und Andrews, N. The Maf transcription factors: Regulators of differentiation. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11):437–441, 1997.
- Bobbe, G.; Peterson, J.; Gridley, G.; Hyer, M.; Dwyer, J. und Brown, L. Flavonoid consumption and esophageal cancer among black and white men in the United States. *International Journal of Cancer*, 125(5):1147–1154, 2009.
- Boeing, H.; Dietrich, T.; Hoffmann, K.; Pischon, T.; Ferrari, P.; Lahmann, P.; Boutron-Ruault, M.; Clavel-Chapelon, F.; Allen, N.; Key, T. *et al.* Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aero-digestive tract: The prospective EPIC-study. *Cancer Causes and Control*, 17(7):957–969, 2006.
- Boghossian, S. und Hawash, A. Chemoprevention in colorectal cancer – Where we stand and what we have learned from twenty year’s experience. *The Surgeon*, 10(1):43–52, 2012.
- Bones, A. und Rossiter, J. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97(1):194–208, 1996.

- Boulton, D.; Walle, U. und Walle, T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(2):243–249, 1998.
- Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2):67–87, 2001.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.
- Brownmiller, C.; Howard, L. und Prior, R. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73(5):H72–H79, 2008.
- Brunet, A.; Roux, D.; Lenormand, P.; Dowd, S.; Keyse, S. und Pouysségur, J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO Journal*, 18(3):664–674, 1999.
- Bub, A.; Watzl, B.; Heeb, D.; Rechkemmer, G. und Briviba, K. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition*, 40(3):113–120, 2001.
- Bub, A.; Watzl, B.; Blockhaus, M.; Briviba, K.; Liegibel, U.; Müller, H.; Pool-Zobel, B. und Rechkemmer, G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(2):90–98, 2003.
- Büchner, F.; Bueno-de Mesquita, H.; Linseisen, J.; Boshuizen, H.; Kiemeny, L.; Ros, M.; Overvad, K.; Hansen, L.; Tjønneland, A.; Raaschou-Nielsen, O. *et al.* Fruits and vegetables consumption and the risk of histological subtypes of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes and Control*, 21(3):357–371, 2010.
- Burey, P.; Bhandari, B.; Howes, T. und Gidley, M. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5):361–377, 2008.
- Burgess, A.; Cho, H.; Eigenbrot, C.; Ferguson, K.; Garrett, T.; Leahy, D.; Lemmon, M.; Sliwkowski, M.; Ward, C. und Yokoyama, S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell*, 12(3):541–552, 2003.
- Burnette, W. “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112:195–203, 1981.
- Cai, H.; Thomasset, S.; Berry, D.; Garcea, G.; Brown, K.; Steward, W. und Gescher, A. Determination of anthocyanins in the urine of patients with colorectal liver metastases after administration of bilberry extract. *Biomedical Chromatography*, 25(6):660–663, 2011.

- Cai, Y. und Corke, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65(7):1248–1252, 2000.
- Cammann, K. *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 1 edition, 2001.
- Cao, G. und Prior, R. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clinical Chemistry*, 45(4):574–576, 1999.
- Carey, K.; Garton, A.; Romero, M.; Kahler, J.; Thomson, S.; Ross, S.; Park, F.; Haley, J.; Gibson, N. und Sliwowski, M. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Research*, 66(16):8163–8171, 2006.
- Cartea, M. und Velasco, P. Glucosinolates in *Brassica* foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2):213–229, 2008.
- Castañeda Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M.; Rodríguez, J. und Galán-Vidal, C. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4):859–871, 2009.
- Chai, Y.; Mei, L.; Wu, G.; Lin, D. und Yao, S. Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2):228–233, 2004.
- Champagne, C. und Fustier, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2):184–190, 2007.
- Champoux, J. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1):369–413, 2001.
- Chang, C.; Hopper, N. und Sternberg, P. *Caenorhabditis elegans* SOS-1 is necessary for multiple RAS-mediated developmental signals. *The EMBO Journal*, 19(13):3283–3294, 2000.
- Chen, G.; Templeton, D.; Suttle, D. und Stacey, D. Ras stimulates DNA topoisomerase II α through MEK: A link between oncogenic signaling and a therapeutic target. *Oncogene*, 18(50):7149, 1999.
- Chen, H.; Chen, Y.; Huang, Y.; Tsai, H. und Kuo, C. 4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(6):1054–1066, Mar 2012.
- Chen, L. und Subirade, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27(26):4646–4654, 2006.

- Chen, P.; Chu, S.; Chiou, H.; Chiang, C.; Yang, S. und Hsieh, Y. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutrition and Cancer*, 53(2):232–243, 2005.
- Chen, R.; Chung, J. und Blenis, J. Regulation of pp90^{rsk} phosphorylation and S6 phosphotransferase activity in Swiss 3T3 cells by growth factor-, phorbol ester-, and cyclic AMP-mediated signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 11(4):1861–1867, 1991.
- Chen, R.; Abate, C. und Blenis, J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23):10952, 1993.
- Chen, T.; Hwang, H.; Rose, M.; Nines, R. und Stoner, G. Chemopreventive properties of black raspberries in *N*-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis: down-regulation of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, and *c-Jun*. *Cancer Research*, 66(5):2853, 2006.
- Chen, Z.; Chan, P.; Ho, K.; Fung, K. und Wang, J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79(2):157–163, 1996.
- Chiao, J.; Chung, F.; Kancharla, R.; Ahmed, T.; Mittelman, A. und Conaway, C. Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 20(3):631–636, 2002.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156–159, 1987.
- Chu, L.; Park, S.; Yamaguchi, T. und Nakao, S. Preparation of micron-sized monodispersed thermoresponsive core-shell microcapsules. *Langmuir*, 18(5):1856–1864, 2002.
- Chung, I.; Akita, R.; Vandlen, R.; Toomre, D.; Schlessinger, J. und Mellman, I. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature*, 464(7289):783–787, 2010.
- Citri, A.; Skaria, K. und Yarden, Y. The deaf and the dumb: The biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experimental Cell Research*, 284(1):54–65, 2003.
- Collins, A.; Dusinská, M.; Gedik, C. und Stětina, R. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104(Suppl 3):465, 1996.
- Constantinou, A.; Mehta, R.; Runyan, C.; Rao, K.; Vaughan, A. und Moon, R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: Structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 58(2):217–225, 1995.

- Cooke, D.; Steward, W.; Gescher, A. und Marczylo, T. Anthocyanins from fruits and vegetables—Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, 41(13):1931–1940, 2005.
- Cooke, D.; Schwarz, M.; Boocock, D.; Winterhalter, P.; Steward, W.; Gescher, A. und Marczylo, T. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc^{Min} mouse model of intestinal carcinogenesis—Relationship with tissue anthocyanin levels. *International Journal of Cancer*, 119(9):2213–2220, 2006.
- Copple, I.; Goldring, C.; Kitteringham, N. und Park, B. The Nrf2-Keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*, 246(1):24–33, 2008.
- Coughtrie, M.; Sharp, S.; Maxwell, K. und Innes, N. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chemico-Biological Interactions*, 109(1–3):3–27, 1998.
- Crozier, A.; Jaganath, I. und Clifford, M. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8):1001–1043, 2009.
- Cullinan, S.; Gordan, J.; Jin, J.; Harper, J. und Diehl, J. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: Oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19):8477–8486, 2004.
- Day, A.; Cañada, F.; Díaz, J.; Kroon, P.; Mclauchlan, R.; Faulds, C.; Plumb, G.; Morgan, M. und Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, 468(2-3):166–170, 2000.
- De Vos, P.; Faas, M.; Spasojevic, M. und Sikkema, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4):292–302, 2010.
- Deak, M.; Clifton, A.; Lucocq, J. und Alessi, D. Mitogen-and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO Journal*, 17(15):4426–4441, 1998.
- Deramaudt, B.; Braunstein, S.; Remy, P. und Abraham, N. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 68(1):121–127, 1998.
- DeYulia Jr., G.; Cárcamo, J.; Bórquez-Ojeda, O.; Shelton, C. und Golde, D. Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Science's STKE*, 102(14):5044, 2005.
- Dhillon, A.; Hagan, S.; Rath, O. und Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22):3279–3290, 2007.

- DIN ISO 9276-2 (D). Darstellung der Ergebnisse von Partikelgrößenanalysen - Teil 2: Berechnung von mittleren Partikelgrößen/-durchmessern und Momenten aus Partikelgrößenverteilungen (ISO 9276-2:2001), 2006.
- Ding, M.; Feng, R.; Wang, S.; Bowman, L.; Lu, Y.; Qian, Y.; Castranova, V.; Jiang, B. und Shi, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25): 17359–17368, 2006.
- Ding, Y.; Choi, K.; Kim, J.; Han, X.; Piao, Y.; Jeong, J.; Choe, W.; Kang, I.; Ha, J.; Forman, H. *et al.* Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *The American Journal of Pathology*, 172(6):1529–1541, 2008.
- Dinkova-Kostova, A. und Talalay, P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1):116–123, 2010.
- Dinkova-Kostova, A.; Massiah, M.; Bozak, R.; Hicks, R. und Talalay, P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6):3404, 2001.
- Dinkova-Kostova, A.; Holtzclaw, W.; Cole, R.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M. und Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18):11908, 2002.
- Dinkova-Kostova, A.; Holtzclaw, W. und Kensler, T. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chemical Research in Toxicology*, 18(12):1779–1791, Dec 2005a.
- Dinkova-Kostova, A.; Liby, K.; Stephenson, K.; Holtzclaw, W.; Gao, X.; Suh, N.; Williams, C.; Risingsong, R.; Honda, T.; Gribble, G.; Sporn, M. und Talalay, P. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12):4584–4589, 2005b.
- Doi, K.; Akaike, T.; Fujii, S.; Tanaka, S.; Ikebe, N.; Beppu, T.; Shibahara, S.; Ogawa, M. und Maeda, H. Induction of haem oxygenase-1 by nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *British Journal of Cancer*, 80(12):1945, 1999.
- Doré, S.; Takahashi, M.; Ferris, C.; Hester, L.; Guastella, D. und Snyder, S. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5):2445, 1999.

- Drake, F.; Hofmann, G.; Mong, S.; Bartu, J.; Hertzberg, R.; Johnson, R.; Mattern, M. und Mirabelli, C. *In vitro* and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer Research*, 49(10):2578, 1989.
- Dreiseitel, A.; Oosterhuis, B.; Vukman, K.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G. und Sand, P. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1. *British Journal of Pharmacology*, 158(8):1942–1950, 2009.
- Dubey, R.; Gillespie, D.; Mi, Z. und Jackson, E. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: Role of A_{2B} receptors. *Circulation*, 96(8):2656–2666, 1997.
- Duthie, S.; Jenkinson, A.; Crozier, A.; Mullen, W.; Pirie, L.; Kyle, J.; Yap, L.; Christen, P. und Duthie, G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition*, 45(2):113–122, 2006.
- Eggler, A.; Liu, G.; Pezzuto, J.; Van Breemen, R. und Mesecar, A. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29):10070, 2005.
- Eggler, A.; Small, E.; Hammink, M. und Mesecar, A. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochemical Journal*, 422:171–180, 2009.
- Egner, P.; Kensler, T.; Prestera, T.; Talalay, P.; Libby, A.; Joyner, H. und Curphey, T. Regulation of phase 2 enzyme induction by oltipraz and other dithiolethiones. *Carcinogenesis*, 15(2):177–181, 1994.
- Ernst, I.; Wagner, A.; Lipinski, S.; Skrbek, S.; Ruefer, C.; Desel, C. und Rimbach, G. Cellular uptake, stability, visualization by ‘Naturstoff reagent A’, and multidrug resistance protein 1 gene-regulatory activity of cyanidin in human keratinocytes. *Pharmacological Research*, 61(3):253–258, 2010.
- Ersus, S. und Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80(3):805–812, 2007.
- Eschbach, V. Modulation des PI3K-Signalweges durch das Anthocyanidin Delphinidin. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2009.
- Esselen, M.; Boettler, U.; Teller, N.; Hutter, M.; Ruefer, C.; Skrbek, S. und Marko, D. Anthocyanin-Rich Blackberry Extract Suppresses the DNA-Damaging Properties of Topoisomerase I and II Poisons in Colon Carcinoma Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011a.

- Esselen, M.; Fritz, J.; Hutter, M.; Teller, N.; Baechler, S.; Boettler, U.; Marczylo, T.; Gescher, A. und Marko, D. Anthocyanin-rich extracts suppress the DNA-damaging effects of topoisomerase poisons in human colon cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(S1):S143–S153, 2011b.
- Fahey, J.; Zhang, Y. und Talalay, P. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19):10367, 1997.
- Fahey, J.; Haristoy, X.; Dolan, P.; Kensler, T.; Scholtus, I.; Stephenson, K.; Talalay, P. und Lozniewski, A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[*a*]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11):7610, 2002.
- Faria, A.; Pestana, D.; Azevedo, J.; Martel, F.; de Freitas, V.; Azevedo, I.; Mateus, N. und Calhau, C. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells—putative involvement of GLUT2. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(11):1430–1437, 2009.
- Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Fraisse, D.; Lamaison, J. und Rémésy, C. Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *The Journal of Nutrition*, 132(6):1249–1253, 2002.
- Felgines, C.; Talavéra, S.; Gonthier, M.; Texier, O.; Scalbert, A.; Lamaison, J. und Rémésy, C. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *The Journal of Nutrition*, 133(5):1296–1301, 2003.
- Felgner, P.; Gadek, T.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.; Wenz, M.; Northrop, J.; Ringold, G. und Danielsen, M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21):7413, 1987.
- Fernández-Cañón, J. und Peñalva, M. Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1):329–337, 1998.
- Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G. und Kulling, S. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 45(1):7–18, 2006.
- Flint, A.; Tiganis, T.; Barford, D. und Tonks, N. Development of “substrate-trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5):1680, 1997.
- Fourquet, S.; Guerois, R.; Biard, D. und Toledano, M. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11):8463, 2010.
- Frank, K. *Formulieren von Anthocyanen in Doppelemulsionen*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2012.

- Franke, W.; Lieberei, R. und Reisdorff, C. *Nutzpflanzenkunde*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 7 edition, 2007.
- Freitas, A.; Shimizu, K.; Dias, L. und Quina, F. A computational study of substituted flavylium salts and their quinonoidal conjugate-bases: $S_0 \rightarrow S_1$ electronic transition, absolute pK_a and reduction potential calculations by DFT and semiempirical methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(8):1537–1546, 2007.
- Fridrich, D. *Einfluss von Polyphenolen auf Schlüsselemente wachstumsassoziierter Signalkaskaden in humanen Kolonkarzinomzellen*. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), 2008.
- Fridrich, D.; Kern, M.; Fritz, J.; Pahlke, G.; Köhler, N.; Winterhalter, P. und Marko, D. The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(2):192–200, 2007a.
- Fridrich, D.; Kern, M.; Pahlke, G.; Volz, N.; Will, F.; Dietrich, H. und Marko, D. Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(5):594–601, 2007b.
- Fridrich, D.; Glabasnia, A.; Fritz, J.; Esselen, M.; Pahlke, G.; Hofmann, T. und Marko, D. Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9):3010–3015, 2008a.
- Fridrich, D.; Teller, N.; Esselen, M.; Pahlke, G. und Marko, D. Comparison of delphinidin, quercetin and (–)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(7):815–822, 2008b.
- Frohlich, D.; McCabe, M.; Arnold, R. und Day, M. The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene*, 27(31):4353–4362, 2008.
- Fukuoka, M.; Yano, S.; Giaccone, G.; Tamura, T.; Nakagawa, K.; Douillard, J.; Nishiaki, Y.; Vansteenkiste, J.; Kudoh, S.; Rischin, D. *et al.* Multi-institutional randomized phase ii trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(12):2237–2246, 2003.
- Fukushima, S.; Shibata, M.; Hirose, M.; Kato, T.; Tatematsu, M. und Ito, N. Organ-specific modification of tumor development by low-dose combinations of agents in a rat wide-spectrum carcinogenesis model. *Cancer Science*, 82(7):784–792, 1991.
- Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. und Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47(7):1401–1407, 1998.

- Furukawa, M. und Xiong, Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1): 162–171, 2005.
- Gallagher, E.; Kavanagh, T. und Eaton, D. Glutathione, oxidized glutathione, and mixed disulfides in biological samples. In *Methods in Toxicology, Volume 1B: In Vitro Biological Systems*, Boca Raton, London und New York, 1994. Raven Press.
- Gao, L.; Wang, J.; Sekhar, K.; Yin, H.; Yared, N.; Schneider, S.; Sasi, S.; Dalton, T.; Anderson, M.; Chan, J.; Morrow, J. und Freeman, M. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4):2529–2537, 2007.
- Gao, X.; Deeb, D.; Liu, Y.; Arbab, A.; Divine, G.; Dulchavsky, S. und Gautam, S. Prevention of prostate cancer with oleanane synthetic triterpenoid CDDO-Me in the TRAMP mouse model of prostate cancer. *Cancers*, 3(3):3353–3369, 2011.
- Gee, J.; DuPont, M.; Day, A.; Plumb, G.; Williamson, G. und Johnson, I. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *The Journal of Nutrition*, 130(11):2765–2771, 2000.
- Gellert, M.; O’Dea, M.; Itoh, T. und Tomizawa, J. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(12):4474, 1976.
- Gerhäuser, C.; You, M.; Liu, J.; Moriarty, R.; Hawthorne, M.; Mehta, R.; Moon, R. und Pezzuto, J. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Research*, 57(2):272, 1997.
- Gille, G. und Sigler, K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica*, 40(2):131–152, 1995.
- Giusti, M. und Wrolstad, R. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3):217–225, 2003.
- González, C.; Pera, G.; Agudo, A.; Bueno-de Mesquita, H.; Ceroti, M.; Boeing, H.; Schulz, M.; Del Giudice, G.; Plebani, M.; Carneiro, F. *et al.* Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC–EURGAST). *International Journal of Cancer*, 118(10): 2559–2566, 2006.
- Gossé, F.; Guyot, S.; Roussi, S.; Lobstein, A.; Fischer, B.; Seiler, N. und Raul, F. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26(7):1291–1295, 2005.

- Goubet, I.; Le Quere, J. und Voilley, A. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5):1981–1990, 1998.
- Gouin, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7):330–347, 2004.
- Gradinaru, G.; Biliaderis, C.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. und García-Viguera, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83(3):423–436, 2003.
- Graus-Porta, D.; Beerli, R.; Daly, J. und Hynes, N. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO Journal*, 16(7):1647–1655, 1997.
- Gu, L.; Kelm, M.; Hammerstone, J.; Beecher, G.; Cunningham, D.; Vannozzi, S. und Ronald, L. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17):4852–4860, 2002.
- Gunasekaran, S.; Ko, S. und Xiao, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83(1):31–40, 2007.
- Gupta, P. und Prywes, R. ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced *c-jun* expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52):50550, 2002.
- Gupta, S.; Seth, A. und Davis, R. Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8):3216, 1993.
- Guy, P.; Platko, J.; Cantley, L.; Cerione, R. und Carraway III, K. Insect cell-expressed p180^{erbB3} possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(17):8132, 1994.
- Hacker, D.; De Jesus, M. und Wurm, F. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells—Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, 27(6):1023–1027, 2009.
- Halliwell, B.; Clement, M.; Ramalingam, J. und Long, L. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life*, 50(4-5):251–257, 2000.
- Hamdulay, S.; Wang, B.; Birdsey, G.; Ali, F.; Dumont, O.; Evans, P.; Haskard, D.; Wheeler-Jones, C. und Mason, J. Celecoxib activates PI-3K/Akt and mitochondrial redox signaling to enhance heme oxygenase-1-mediated anti-inflammatory activity in vascular endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(8):1013–1023, 2010.

- Harris, G.; Gupta, A.; Nines, R.; Kresty, L.; Habib, S.; Frankel, W.; LaPerle, K.; Gallaher, D.; Schwartz, S. und Stoner, G. Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat. *Nutrition and Cancer*, 40(2):125–133, 2001.
- Harris, R.; Chung, E. und Coffey, R. EGF receptor ligands. In Carpenter, G., editor, *The EGF Receptor Family – Biologic Mechanisms and Role in Cancer*, pages 3–14, Amsterdam, 2003. Elsevier Academic Press.
- Harrison, D.; Griendling, K.; Landmesser, U.; Hornig, B. und Drexler, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, 91(3):7–11, 2003.
- Hasegawa, R.; Tiwawech, D.; Hirose, M.; Takaba, K.; Hoshiya, T.; Shirai, T. und Ito, N. Suppression of diethylnitrosamine-initiated preneoplastic foci development in the rat liver by combined administration of four antioxidants at low doses. *Cancer Science*, 83(5):431–437, 1992.
- Hayes, J. und Pulford, D. The glutathione *S*-transferase supergene family: Regulation of *gst* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part ii. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6):521–600, 1995.
- He, J. und Giusti, M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1:163–187, 2010.
- Heidebach, T.; Först, P. und Kulozik, U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19(2):77–84, 2009.
- Heinonen, I.; Meyer, A. und Frankel, E. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10):4107–4112, 1998.
- Hellström, J.; Törrönen, A. und Mattila, P. Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17):7899–7906, 2009.
- Herranz-López, M.; Fernández-Arroyo, S.; Pérez-Sánchez, A.; Barrajón-Catalán, E.; Beltrán-Debón, R.; Menéndez, J.; Alonso-Villaverde, C.; Segura-Carretero, A.; Joven, J. und Micol, V. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine*, 19:253–261, 2012.
- Hirose, M.; Yada, H.; Hakoi, K.; Takahashi, S. und Ito, N. Modification of carcinogenesis by α -tocopherol, *t*-butylhydro-quinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 14(11):2359–2364, 1993.
- Hollman, P.; De Vries, J.; van Leeuwen, S.; Mengelers, M. und Katan, M. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6):1276–1282, 1995.

- Homma, S.; Ishii, Y.; Morishima, Y.; Yamadori, T.; Matsuno, Y.; Haraguchi, N.; Kikuchi, N.; Satoh, H.; Sakamoto, T.; Hizawa, N.; Itoh, K. und Yamamoto, M. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(10):3423–3432, 2009.
- Hong, F.; Freeman, M. und Liebler, D. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*, 18(12):1917–1926, 2005.
- Hou, D.; Kai, K.; Li, J.; Lin, S.; Terahara, N.; Wakamatsu, M.; Fujii, M.; Young, M. und Colburn, N. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: Structure–activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 25(1):29–36, 2004.
- Hou, Z.; Sang, S.; You, H.; Lee, M.; Hong, J.; Chin, K. und Yang, C. 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 Research*, 65(17):8049, 2005.
- Hsu, Y.; Chen, C.; Wu, S.; Jong, Y. und Lo, Y. Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and protects against oxidative damage via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism in NSC34 motor neuron-like cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5):415–425, Aug 2012.
- Hu, S.; Tsai, C.; Liao, C.; Liu, D. und Chen, S. Controlled rupture of magnetic polyelectrolyte microcapsules for drug delivery. *Langmuir*, 24(20):11811–11818, 2008.
- Huang, H.; Nguyen, T. und Pickett, C. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23):12475, 2000.
- Huang, H.; Nguyen, T. und Pickett, C. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):42769–42774, 2002.
- Hubbard, S. EGF receptor activation: push comes to shove. *Cell*, 125(6):1029–1031, 2006.
- Hubbermann, E.; Heins, A.; Stöckmann, H. und Schwarz, K. Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *European Food Research and Technology*, 223(1):83–90, 2006.
- Huxley, R.; Ansary-Moghaddam, A.; Clifton, P.; Czernichow, S.; Parr, C. und Woodward, M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer*, 125(1):171–180, 2009.

- Hwang, Y.; Choi, J.; Choi, J.; Chung, Y. und Jeong, H. Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9):2081, 2011a.
- Hwang, Y.; Choi, J.; Yun, H.; Han, E.; Kim, H.; Kim, J.; Park, B.; Khanal, T.; Choi, J.; Chung, Y. und Jeong, H. Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1):93–99, 2011b.
- Hynes, N. und Lane, H. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5):341–354, 2005.
- Ichiyanagi, T.; Shida, Y.; Rahman, M.; Hatano, Y.; Matsumoto, H.; Hirayama, M. und Konishi, T. Metabolic pathway of cyanidin 3-*O*- β -D-glucopyranoside in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1):145–150, 2005.
- Ichiyanagi, T.; Shida, Y.; Rahman, M.; Hatano, Y. und Konishi, T. Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18):6578–6587, 2006.
- Iida, K.; Itoh, K.; Kumagai, Y.; Oyasu, R.; Hattori, K.; Kawai, K.; Shimazui, T.; Akaza, H. und Yamamoto, M. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research*, 64(18):6424, 2004.
- Imhoff, B. und Hansen, J. *Tert*-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. *Cell Biology and Toxicology*, 26(6):541–551, 2010.
- Ip, Y. und Davis, R. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – From inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2):205–219, 1998.
- Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; Yamamoto, M. und Nabeshima, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2):313–322, 1997.
- Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. und Yamamoto, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*, 13(1):76–86, 1999.
- Itoh, K.; Mochizuki, M.; Ishii, Y.; Ishii, T.; Shibata, T.; Kawamoto, Y.; Kelly, V.; Sekizawa, K.; Uchida, K. und Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1):36–45, 2004.
- Jackman, R.; Yada, R.; Tung, M. und Speers, R. Anthocyanins as food colorants – A review. *Journal of Food Biochemistry*, 11(3):201–247, 1987.

- Jaiswal, A. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4):254–262, 2000.
- Jaiswal, A. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry*, 30(44):10647–10653, 1991.
- Jakobsson, P.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford-Hutchinson, A. und Persson, B. Common structural features of MAPEG—A widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, 8(3):689–692, 1999.
- Jensen, G.; Wu, X.; Patterson, K.; Barnes, J.; Carter, S.; Scherwitz, L.; Beaman, R.; Endres, J. und Schauss, A. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18):8326–8333, 2008.
- Jensen, P.; Sørensen, B.; Sehested, M.; Grue, P.; Demant, E. und Hansen, H. Targeting the cytotoxicity of topoisomerase II-directed epipodophyllotoxins to tumor cells in acidic environments. *Cancer Research*, 54(11):2959–2963, 1994.
- Johansson, A. und Mannervik, B. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35):33061–33065, 2001.
- Joseph, M.; Moysich, K.; Freudenheim, J.; Shields, P.; Bowman, E.; Zhang, Y.; Marshall, J. und Ambrosone, C. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione *S*-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutrition and Cancer*, 50(2):206–213, 2004.
- Juadur, A. und Winterhalter, P. Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:2427–2433, 2012.
- Juge, N.; Mithen, R. und Traka, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(9):1105–1127, 2007.
- Junttila, M.; Li, S. und Westermarck, J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal*, 22(4):954–965, 2008.
- Jura, N.; Endres, N.; Engel, K.; Deindl, S.; Das, R.; Lamers, M.; Wemmer, D.; Zhang, X. und Kuriyan, J. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, 137(7):1293–1307, 2009.
- Kähkönen, M. und Heinonen, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3):628–633, 2003.

- Kähkönen, M.; Heinämäki, J.; Ollilainen, V. und Heinonen, M. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (14):1403–1411, 2003.
- Kahle, K.; Kraus, M.; Scheppach, W.; Ackermann, M.; Ridder, F. und Richling, E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(4-5):418–423, 2006.
- Kalt, W.; Ryan, D.; Duy, J.; Ronald, L.; Ehlenfeldt, M. und Vander Kloet, S. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium section cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10):4761–4767, 2001.
- Kan, Z.; Jaiswal, B.; Stinson, J.; Janakiraman, V.; Bhatt, D.; Stern, H.; Yue, P.; Haverty, P.; Bourgon, R.; Zheng, J. *et al.* Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466(7308):869–873, 2010.
- Kang, K.; Ryu, J. und Kim, S. 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. *Molecular Pharmacology*, 58(5):1017–1025, 2000.
- Kang, K.; Cho, M.; Lee, C. und Kim, S. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt by *tert*-butylhydroquinone is responsible for antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction in H4IIE cells. *Molecular Pharmacology*, 59(5):1147–1156, 2001.
- Kang, M.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, N.; Kim, S. und Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7):2046, 2004.
- Kang, N.; Lee, K.; Kwon, J.; Hwang, M.; Rogozin, E.; Heo, Y.; Bode, A.; Lee, H. und Dong, Z. Delphinidin attenuates neoplastic transformation in JB6 Cl41 mouse epidermal cells by blocking Raf/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling. *Cancer Prevention Research*, 1(7):522–531, 2008.
- Kang, S.; Seeram, N.; Nair, M. und Bourquin, L. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc^{Min} mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 194(1):13–19, 2003.
- Karapetian, R.; Evstafieva, A.; Abaeva, I.; Chichkova, N.; Filonov, G.; Rubtsov, Y.; Sukhacheva, E.; Melnikov, S.; Schneider, U.; Wanker, E. *et al.* Nuclear oncoprotein prothymosin α is a partner of Keap1: Implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3):1089–1099, 2005.

- Karchesy, J. und Hemingway, R. Condensed tannins: (4 β →8;2 β →O→7)-linked procyanidins in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(6):966–970, 1986.
- Katoh, Y.; Iida, K.; Kang, M.; Kobayashi, A.; Mizukami, M.; Tong, K.; McMahon, M.; Hayes, J.; Itoh, K. und Yamamoto, M. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(2):342–350, 2005.
- Katsube, N.; Iwashita, K.; Tsushida, T.; Yamaki, K. und Kobori, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1):68–75, 2003.
- Kay, C. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*, 19(01):137–146, 2006.
- Kay, C. und Holub, B. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 88(04):389–397, 2002.
- Kay, C.; Mazza, G. und Holub, B. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *The Journal of Nutrition*, 135(11):2582–2588, 2005.
- Keen, J. und Jakoby, W. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 253(16):5654–5657, 1978.
- Kelloff, G.; Lippman, S.; Dannenberg, A.; Sigman, C.; Pearce, H.; Reid, B.; Szabo, E.; Jordan, V.; Spitz, M.; Mills, G. *et al.* Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer—A plan to move forward. *Clinical Cancer Research*, 12(12):3661–3697, 2006.
- Kelm, C. und Urbanek, E. Enterostomata: Indikationen - Anlagetechniken - Komplikationen. Klinikum Lüdenscheld, Chirurgie I, Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, 2004.
- Kenny, T.; Keen, C.; Jones, P.; Kung, H.; Schmitz, H. und Gershwin, M. Cocoa procyanidins inhibit proliferation and angiogenic signals in human dermal microvascular endothelial cells following stimulation by low-level H₂O₂. *Experimental Biology and Medicine*, 229(8):765–771, 2004.
- Kensler, T. und Wakabayashi, N. Nrf2: Friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*, 31(1):90–99, 2010.
- Kensler, T.; Wakabayashi, N. und Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 89–116, 2007.

- Keppler, K. und Humpf, H. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17):5195–5205, 2005.
- Kern, M. *Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen Kolonkarzinomzellen*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern, 2006.
- Kern, M.; Tjaden, Z.; Ngiewih, Y.; Puppel, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Pahlke, G. und Marko, D. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(4):317–328, 2005.
- Kern, M.; Fridrich, D.; Reichert, J.; Skrbek, S.; Nussler, A.; Hofem, S.; Vatter, S.; Pahlke, G.; Rüfer, C. und Marko, D. Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(9):1163–1172, 2007.
- Keum, Y.; Owuor, E.; Kim, B.; Hu, R. und Kong, A. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharmaceutical Research*, 20(9):1351–1356, 2003.
- Khachick, F.; Bertram, J.; Huang, M.-T.; Fahey, J. und Talalay, P. Dietary carotenoids and their metabolites as potentially useful chemoprotective agents against cancer. In Carpenter, G., editor, *Proceedings of the International Symposium on Antioxidant Food Supplements in Human Health*, pages 203–230, San Diego, London, 1999. Academic Press.
- Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24:117–191, 1976.
- Kim, D.; Heo, H.; Kim, Y.; Yang, H. und Lee, C. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26): 9921–9927, 2005a.
- Kim, J.; Ali, M.; Nandi, A.; Mukhopadhyay, P.; Choy, H.; Cao, C. und Saha, D. Correlation of HER1/EGFR expression and degree of radiosensitizing effect of the HER1/EGFR-tyrosine kinase inhibitor erlotinib. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42(6):358, 2005b.
- Kim, J.; Li, M.; Jang, J.; Na, H.; Song, N.; Lee, C.; Johnson, J. und Surh, Y. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ rescues PC12 cells from H₂O₂-induced apoptosis through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1: Potential roles of Akt and ERK1/2. *Biochemical Pharmacology*, 76(11):1577–1589, 2008.
- Kim, S.; Chung, M.; Ha, T.; Choi, H.; Jang, S.; Kim, S.; Chun, M.; Do, S.; Choo, Y. und Park, Y. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Sciences*, 90:874–882, 2012.

- Knaup, B.; Kahle, K.; Erk, T.; Valotis, A.; Scheppach, W.; Schreier, P. und Richling, E. Human intestinal hydrolysis of phenol glycosides—A study with quercetin and *p*-nitrophenol glycosides using ileostomy fluid. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(11):1423–1429, 2007.
- Kobayashi, A.; Kang, M.; Okawa, H.; Ohtsuji, M.; Zenke, Y.; Chiba, T.; Igarashi, K. und Yamamoto, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16):7130–7139, 2004.
- Kobayashi, M.; Itoh, K.; Suzuki, T.; Osanai, H.; Nishikawa, K.; Katoh, Y.; Takagi, Y. und Yamamoto, M. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes to Cells*, 7(8):807–820, 2002.
- Kondo, T.; Yoshida, K.; Nakagawa, A.; Kawai, T.; Tamura, H. und Goto, T. Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature*, 358: 515–518, 1992.
- Koushik, A.; Hunter, D.; Spiegelman, D.; Beeson, W.; Van Den Brandt, P.; Buring, J.; Calle, E.; Cho, E.; Fraser, G.; Freudenheim, J. *et al.* Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19): 1471–1483, 2007.
- Kresty, L.; Frankel, W.; Hammond, C.; Baird, M.; Mele, J.; Stoner, G. und Fromkes, J. Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized black raspberries: interim results show berries modulate markers of oxidative stress in Barrett's esophagus patients. *Nutrition and Cancer*, 54(1):148–156, 2006.
- Kris, M.; Natale, R.; Herbst, R.; Lynch Jr, T.; Prager, D.; Belani, C.; Schiller, J.; Kelly, K.; Spiridonidis, H.; Sandler, A. *et al.* Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer. *Journal of the American Medical Association*, 290(16):2149–2158, 2003.
- Kropat, C.; Mueller, D.; Boettler, U.; Zimmermann, K.; Heiss, E.; Dirsch, V.; Rogoll, D.; Melcher, R.; Richling, E. und Marko, D. Modulation of Nrf2 dependent gene transcription by bilberry anthocyanins *in vivo* – Mediated by the intestinal degradation product phloroglucinol aldehyde? *Molecular Nutrition & Food Research*, Submitted, 2012.
- Krumböck, C. Modulation des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalelemente durch chlorogensäurereiche Extrakte und ausgewählte Inhaltsstoffe. Diplomarbeit, Universität Wien, 2010.
- Kuan, C.; Wikstrand, C. und Bigner, D. EGFRvIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy. *Brain Tumor Pathology*, 17(2):71–78, 2000.

- Kuhnle, G.; Spencer, J.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Debnam, E.; Srai, S.; Rice-Evans, C. und Hahn, U. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2):507–512, 2000.
- Kumamoto, T.; Fujii, M. und Hou, D. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer Letters*, 275(1):17–26, 2009.
- Kushad, M.; Brown, A.; Kurilich, A.; Juvik, J.; Klein, B.; Wallig, M. und Jeffery, E. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4):1541–1548, 1999.
- Kwak, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M. und Kensler, T. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the Nrf2 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9):2883–2892, 2002.
- Ladner, J.; Parsons, J.; Rife, C.; Gilliland, G. und Armstrong, R. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: Structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*, 43(2):352–361, 2004.
- Lai, R.; Miller, M. und Jeffery, E. Glucoraphanin hydrolysis by microbiota in the rat cecum results in sulforaphane absorption. *Food & Function*, 1(2):161–166, 2010.
- Lamy, S.; Blanchette, M.; Michaud-Levesque, J.; Lafleur, R.; Durocher, Y.; Moghrabi, A.; Barrette, S.; Gingras, D. und Béliveau, R. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*, 27(5):989–996, 2006.
- Lamy, S.; Beaulieu, É.; Labbé, D.; Bédard, V.; Moghrabi, A.; Barrette, S.; Gingras, D. und Béliveau, R. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling. *Carcinogenesis*, 29(5):1033–1041, 2008.
- Lapidot, T.; Harel, S.; Granit, R. und Kanner, J. Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10):4297–4302, 1998.
- Lapidot, T.; Walker, M. und Kanner, J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25):7220–7225, 2002.
- Lax, I.; Burgess, W.; Bellot, F.; Ullrich, A.; Schlessinger, J. und Givol, D. Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Molecular and Cellular Biology*, 8(4):1831–1834, 1988.
- Lebet, V.; Arrigoni, E. und Amadò, R. Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fibre sources with human faecal flora. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 31(5):473–479, 1998.

- Lee, J. und Finn, C. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14):2665–2675, 2007.
- Lee, J.; Hanson, J.; Chu, W. und Johnson, J. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23):20011–20016, 2001.
- Lee, S. und Rosenberg, M. Preparation and some properties of water-insoluble, whey protein-based microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, 17(1):29–44, 2000.
- Leong, M.; Milstein, C. und Pannell, R. Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 34:1645–1650, 1986.
- Lewis, T.; Shapiro, P. und Ahn, N. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*, 74:49–139, 1998.
- Li, Y. und Jaiswal, A. Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21):15097–15104, 1992.
- Liby, K.; Royce, D.; Williams, C.; Risingsong, R.; Yore, M.; Honda, T.; Gribble, G.; Dmitrovsky, E.; Sporn, T. und Sporn, M. The synthetic triterpenoids CDDO-methyl ester and CDDO-ethyl amide prevent lung cancer induced by vinyl carbamate in A/J mice. *Cancer Research*, 67(6):2414, 2007.
- Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 4 edition, 2000.
- Ling, X.; Konopleva, M.; Zeng, Z.; Ruvolo, V.; Stephens, L.; Schober, W.; McQueen, T.; Dietrich, M.; Madden, T. und Andreeff, M. The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxoolen-1,9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling. *Cancer Research*, 67(9):4210, 2007.
- Liu, T.; Relkin, P. und Launay, B. Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. *Thermochimica Acta*, 246(2):387–403, 1994.
- Long, L.; Clement, M. und Halliwell, B. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(1):50–53, 2000.

- López-Lázaro, M.; Martin-Cordero, C.; Toro, M. und Ayuso, M. Flavonoids as DNA topoisomerase I poisons. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17(1): 25–29, 2002.
- Lörper, M.; Schulz, W.; Morel, F.; Warskulat, U. und Sies, H. Positive and negative regulatory regions in promoters of human glutathione transferase alpha genes. *Biological Chemistry*, 377(1):39–46, 1996.
- Lozán, J. und Kausch, H. *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*, volume 1. Parey Buchverlag, Berlin, 3 edition, 2003.
- Madziva, H.; Kailasapathy, K. und Phillips, M. Evaluation of alginate–pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 39(2):146–151, 2006.
- Mahéo, K.; Morel, F.; Langouët, S.; Kramer, H.; Le Ferrec, E.; Ketterer, B. und Guillouzo, A. Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione *S*-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Research*, 57(17):3649, 1997.
- Maines, M. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37(1):517–554, 1997.
- Mallery, S.; Zwick, J.; Pei, P.; Tong, M.; Larsen, P.; Shumway, B.; Lu, B.; Fields, H.; Mumper, R. und Stoner, G. Topical application of a bioadhesive black raspberry gel modulates gene expression and reduces cyclooxygenase 2 protein in human premalignant oral lesions. *Cancer Research*, 68(12):4945–4957, 2008.
- Marais, R.; Wynne, J. und Treisman, R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73(2):381, 1993.
- March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. Wiley-Interscience, 6 edition, 2007.
- Marko, D.; Puppel, N.; Tjaden, Z.; Jakobs, S. und Pahlke, G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48(4):318–325, 2004.
- Martin, D.; Rojo, A.; Salinas, M.; Diaz, R.; Gallardo, G.; Alam, J.; de Galarreta, C. und Cuadrado, A. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10):8919–8929, 2004.
- Martin, S.; Giannone, G.; Andriantsitohaina, R. und Carmen Martinez, M. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *British Journal of Pharmacology*, 139(6):1095–1102, 2003.

- Matsumoto, H.; Inaba, H.; Kishi, M.; Tominaga, S.; Hirayama, M. und Tsuda, T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3):1546–1551, 2001.
- Matsumoto, H.; Nakamura, Y.; Hirayama, M.; Yoshiki, Y. und Okubo, K. Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18):5034–5037, 2002.
- Mazza, G.; Kay, C.; Cottrell, T. und Holub, B. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26):7731–7737, 2002.
- McClements, D.; Decker, E. und Weiss, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8):R109–R124, 2007.
- McDougall, G.; Fyffe, S.; Dobson, P. und Stewart, D. Anthocyanins from red cabbage—stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9):1285–1294, 2007.
- McGhie, T. und Walton, M. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6):702–713, 2007.
- McGhie, T.; Ainge, G.; Barnett, L.; Cooney, J. und Jensen, D. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4539–4548, 2003.
- McMahon, M.; Thomas, N.; Itoh, K.; Yamamoto, M. und Hayes, J. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34):24756–24768, 2006.
- McMahon, M.; Lamont, D.; Beattie, K. und Hayes, J. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44):18838–18843, 2010.
- Meiers, S.; Kemény, M.; Weyand, U.; Gastpar, R.; von Angerer, E. und Marko, D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2):958–962, 2001.
- Michael, A. Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. *Journal für Praktische Chemie*, 35(1):349–356, 1887.
- Mink, P.; Scrafford, C.; Barraj, L.; Harnack, L.; Hong, C.; Nettleton, J. und Jacobs Jr, D. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3):895–909, 2007.

- Miyazawa, T.; Nakagawa, K.; Kudo, M.; Muraishi, K. und Someya, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3):1083–1091, 1999.
- Moi, P.; Chan, K.; Asunis, I.; Cao, A. und Kan, Y. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21):9926, 1994.
- Moinova, H. und Mulcahy, R. Up-Regulation of the human γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(3):661–668, 1999.
- Møller, P.; Loft, S.; Alftan, G. und Freese, R. Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2):119–126, 2004.
- Moodie, S. und Wolfman, A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends in Genetics*, 10(2):44–48, 1994.
- Moodie, S.; Willumsen, B.; Weber, M. und Wolfman, A. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, 260(5114):1658–1661, 1993.
- Morel, F.; Schulz, W. und Sies, H. Gene structure and regulation of expression of human glutathione *S*-transferases alpha. *Biological Chemistry*, 375(10):641, 1994.
- Motohashi, H.; O'Connor, T.; Katsuoka, F.; Engel, J. und Yamamoto, M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, 294(1):1–12, 2002.
- Moyer, R.; Hummer, K.; Finn, C.; Frei, B. und Wrolstad, R. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3):519–525, 2002.
- Mulcahy, R.; Wartman, M.; Bailey, H. und Gipp, J. Constitutive and β -naphthoflavone-induced expression of the human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11):7445–7454, 1997.
- Müllleder, U.; Murkovic, M. und Pfannhauser, W. Urinary excretion of cyanidin glycosides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53(1-3):61–66, 2002.
- Müller, D.; Schantz, M. und Richling, E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science*, 2012.

- Murkovic, M.; Mülleder, U.; Adam, U. und Pfannhauser, W. Detection of anthocyanins from elderberry juice in human urine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9): 934–937, 2001.
- Muthusamy, V.; Saravanababu, C.; Ramanathan, M.; Bharathi Raja, R.; Sudhagar, S.; Anand, S. und Lakshmi, B. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and regulation of insulin signalling markers by caffeoyl derivatives of chicory (*Cichorium intybus*) salad leaves. *British Journal of Nutrition*, 104(6):813–823, 2010.
- Nakagawa, H.; Hasumi, K.; Woo, J.; Nagai, K. und Wachi, M. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (–)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*, 25(9):1567–1574, 2004.
- Nguyen, T.; Sherratt, P.; Huang, H.; Yang, C. und Pickett, C. Increased protein stability as a Mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7):4536–4541, 2003.
- Nguyen, T.; Sherratt, P.; Nioi, P.; Yang, C. und Pickett, C. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37):32485–32492, 2005.
- Nielsen, I.; Dragsted, L.; Ravn-Haren, G.; Freese, R. und Rasmussen, S. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9):2813–2820, 2003.
- Nioi, P. und Nguyen, T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(4): 816–821, 2007.
- Nohynek, L.; Alakomi, H.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Helander, I.; Oksman-Caldentey, K. und Puupponen-Pimiä, R. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54(1):18–32, 2006.
- Nunomura, A.; Moreira, P.; Lee, H.; Zhu, X.; Castellani, R.; Smith, M. und Perry, G. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *Neurological Disorders-Drug Targets*, 6(6):411–423, 2007.
- Oak, M.; Bedoui, J.; Madeira, S.; Chalupsky, K. und Schini-Kerth, V. Delphinidin and cyanidin inhibit PDGF-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK. *British Journal of Pharmacology*, 149(3): 283–290, 2006.
- Oginsky, E.; Stein, A. und Greer, M. Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by the conversion of progoitrin to goitrin. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology*

- and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), pages 360–364. Royal Society of Medicine, 1965.
- Ogiso, H.; Ishitani, R.; Nureki, O.; Fukai, S.; Yamanaka, M.; Kim, J.; Saito, K.; Sakamoto, A.; Inoue, M.; Shirouzu, M. und Yokoyama, S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110(6):775–787, 2002.
- Ogura, T.; Tong, K.; Mio, K.; Maruyama, Y.; Kurokawa, H.; Sato, C. und Yamamoto, M. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7):2842–2847, 2010.
- Olayioye, M. A.; Neve, R. M.; Lane, H. A. und Hynes, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO Journal*, 19(13):3159–3167, 2000.
- Oliveira, E.; Watson, D. und Grant, M. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma. *Xenobiotica*, 32(4):279–287, 2002.
- Olsson, M.; Gustavsson, K.; Andersson, S.; Nilsson, Å. und Duan, R. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24):7264–7271, 2004.
- Ongusaha, P.; Kwak, J.; Zwible, A.; Macip, S.; Higashiyama, S.; Taniguchi, N.; Fang, L. und Lee, S. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Research*, 64(15):5283, 2004.
- Orive, G.; Hernández, R.; Gascón, A. und Pedraz, J. Encapsulation of cells in alginate gels. In Guisan, M., editor, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, pages 345–355, Totowa, New Jersey, 2006. Humana Press.
- Östman, A. und Böhmer, F. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends in Cell Biology*, 11(6):258–266, 2001.
- Otterbein, L. und Choi, A. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6):L1029–L1037, 2000.
- Pantelidis, G.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. und Diamantidis, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3):777–783, 2007.
- Pao, W.; Miller, V.; Politi, K.; Riely, G.; Somwar, R.; Zakowski, M.; Kris, M. und Varmus, H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Medicine*, 2(3):225–235, 2005.

- Parkin, D.; Boyd, L. und Walker, C. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British Journal of Cancer*, 105(S2):S77–S81, 2011.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U. und Mattivi, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(3):631–636, 2002.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Vanzo, A. und Mattivi, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544(1):210–213, 2003.
- Pawson, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, 116(2):191–203, 2004.
- Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A. und García-Viguera, C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8):2308–2312, 2002.
- Peschard, P. und Park, M. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene*, 26(9):1276–1285, 2007.
- Piepkorn, M. Overexpression of amphiregulin, a major autocrine growth factor for cultured human keratinocytes, in hyperproliferative skin diseases. *The American Journal of Dermatopathology*, 18(2):165, 1996.
- Pinkus, R.; Weiner, L. und Daniel, V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione *S*-transferase gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23):13422–13429, 1996.
- Poei-Langston, M. und Wrolstad, R. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. *Journal of Food Science*, 46(4):1218–1236, 1981.
- Pollenz, R. und Barbour, E. Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(16):6095–6104, 2000.
- Pommier, Y.; Pourquier, P.; Fan, Y. und Strumberg, D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1-3):83–105, 1998.
- Prester, T.; Holtzclaw, W.; Zhang, Y. und Talalay, P. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7):2965, 1993a.
- Prester, T.; Zhang, Y.; Spencer, S.; Wilczak, C. und Talalay, P. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity. *Advances in Enzyme Regulation*, 33:281–296, 1993b.

- Prior, R. und Wu, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10):1014–1028, 2006.
- Prior, R.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G. und Mainland, C. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7):2686–2693, 1998.
- Prior, R.; Lazarus, S.; Cao, G.; Muccitelli, H. und Hammerstone, J. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3):1270–1276, 2001.
- Pritzkeleit, R.; Beske, F. und Katalinic, A. Demographischer Wandel und Krebserkrankungen in der Zukunft. *Onkologie*, 33(7):19–24, 2010.
- Prochaska, H.; Bregman, H.; De Long, M. und Talalay, P. Specificity of induction of cancer protective enzymes by analogues of *tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA). *Biochemical Pharmacology*, 34(21):3909–3914, 1985a.
- Prochaska, H.; De Long, M. und Talalay, P. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: A unifying proposal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(23):8232, 1985b.
- Puck, T.; Cieciura, S. und Robinson, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation. *The Journal of Experimental Medicine*, 108(6):945–956, 1958.
- Purdom-Dickinson, S.; Sheveleva, E.; Sun, H. und Chen, Q. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Molecular Pharmacology*, 72(4):1074–1081, 2007.
- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A. und Oksman-Caldentey, K. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4):494–507, 2001.
- Rachakonda, G.; Xiong, Y.; Sekhar, K.; Stamer, S.; Liebler, D. und Freeman, M. Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. *Chemical Research in Toxicology*, 21(3):705–710, 2008.
- Rahman, M.; Ichiyanagi, T.; Komiyama, T.; Hatano, Y. und Konishi, T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; Structure-activity relationship and their synergism. *Free Radical Research*, 40(9):993, 2006.
- Ramos-Gomez, M.; Kwak, M.; Dolan, P.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Talalay, P. und Kensler, T. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6):3410, 2001.

- Ranelletti, F.; Ricci, R.; Larocca, L.; Maggiano, N.; Capelli, A.; Scambia, G.; Benedetti-Panici, P.; Mancuso, S.; Rumi, C. und Piantelli, M. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, 50(3):486–492, 1992.
- Red Brewer, M.; Choi, S.; Alvarado, D.; Moravcevic, K.; Pozzi, A.; Lemmon, M. und Carpenter, G. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Molecular Cell*, 34(6):641–651, 2009.
- Reddivari, L.; Vanamala, J.; Chintharlapalli, S.; Safe, S. und Miller Jr, J. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis*, 28(10):2227–2235, 2007.
- Rehse, K.; Rothe, M. und Kinawi, A. Untersuchungen zur Eiweißbindung durch kontinuierliche Ultrafiltration, 2. Mitt. Eiweißbindung von Warfarin. *Archiv der Pharmazie*, 314(12):1046–1052, 1981.
- Renis, M.; Calandra, L.; Scifo, C.; Tomasello, B.; Cardile, V.; Vanella, L.; Bei, R.; Fauci, L. und Galvano, F. Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins. *British Journal of Nutrition*, 100(1):27–35, 2008.
- Ribeiro, H.; Schuchmann, H.; Engel, R.; Walz, E. und Briviba, K. Encapsulation of carotenoids. In Zuidam, N. und Nedovic, V., editors, *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, pages 211–252, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010. Springer.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. und Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7):933–956, 1996.
- Riso, P.; Visioli, F.; Gardana, C.; Grande, S.; Brusamolino, A.; Galvano, F.; Galvano, G. und Porrini, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(August):941–947, 2005.
- Robert, P.; Gorena, T.; Romero, N.; Sepulveda, E.; Chavez, J. und Saenz, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7):1386–1394, 2010.
- Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2007/2008, 2012.
- Roberts Jr., W. Benefiting beverages. *Prepared Foods Network*, (8), 2009.
- Robinson, A.; Huttley, G.; Booth, H. und Board, P. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochemical Journal*, 379(Pt 3):541, 2004.

- Robinson, M. und Cobb, M. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2):180–186, 1997.
- Roos, G. und Messens, J. Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2):314–326, Jul 2011.
- Rossetto, M.; Vanzani, P.; Mattivi, F.; Lunelli, M.; Scarpa, M. und Rigo, A. Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 408(2):239–245, 2002.
- Rossi, M.; Negri, E.; Talamini, R.; Bosetti, C.; Parpinel, M.; Gnagnarella, P.; Franceschi, S.; Dal Maso, L.; Montella, M.; Giacosa, A. *et al.* Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(8):1555–1558, 2006.
- Rushmore, T. und Pickett, C. Transcriptional regulation of the rat glutathione *S*-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 265(24):14648–14653, 1990.
- Rushmore, T.; King, R.; Paulson, K. und Pickett, C. Regulation of glutathione *S*-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(10):3826, 1990.
- Rushmore, T.; Morton, M. und Pickett, C. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(18):11632–11639, 1991.
- Saito, A.; Mizushina, Y.; Ikawa, H.; Yoshida, H.; Doi, Y.; Tanaka, A. und Nakajima, N. Systematic synthesis of galloyl-substituted procyanidin B1 and B2, and their ability of DPPH radical scavenging activity and inhibitory activity of DNA polymerases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(8):2759–2771, 2005.
- Salazar, M.; Rojo, A.; Velasco, D.; de Sagarra, R. und Cuadrado, A. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(21):14841–14851, 2006.
- Salceda, J.; Fernández, X. und Roca, J. Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *The EMBO Journal*, 25(11):2575–2583, 2006.
- Sandgren, E.; Luetkeke, N.; Palmiter, R.; Brinster, R. und Lee, D. Overexpression of TGF α in transgenic mice: Induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, 61(6):1121–1135, 1990.
- Sarma, A.; Sreelakshmi, Y. und Sharma, R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*, 45(4):671–674, 1997.

- Scalbert, A. und Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8):2073S–2085S, 2000.
- Schaeffer, H. und Weber, M. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4):2435–2444, 1999.
- Schantz, M. *Biologische Wirksamkeit eines Heidelbeereextrakts (HBE)(Vaccinium myrtillus L.) im Vergleich zu verkapselten Präparaten: Antioxidative Wirksamkeit und Modulation der intestinalen Verfügbarkeit der Anthocyane*. Dissertation, Technischen Universität Kaiserslautern, 2011.
- Schmidt, B.; Howell, A.; McEniry, B.; Knight, C.; Seigler, D.; Erdman Jr, J. und Lila, M. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21):6433–6442, 2004.
- Schreiber, H.; Swink, A. und Godsey, T. The chemical mechanism for Al^{3+} complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(7):732–739, 2010.
- Seeram, N.; Momin, R.; Nair, M. und Bourquin, L. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 8(5):362–369, 2001.
- Seeram, N.; Adams, L.; Hardy, M. und Heber, D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: Antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9):2512–2517, 2004.
- Seeram, N.; Adams, L.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H. und Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25):9329–9339, 2006.
- Sehested, M. und Jensen, P. Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clercidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochemical Pharmacology*, 51(7):879–886, 1996.
- Sekhar, K.; Soltaninassab, S.; Borrelli, M.; Xu, Z.; Meredith, M.; Domann, F. und Freeman, M. Inhibition of the 26S proteasome induces expression of GLCLC, the catalytic subunit for γ -glutamylcysteine synthetase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(1):311–317, 2000.
- Semo, E.; Kesselman, E.; Danino, D. und Livney, Y. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*, 21(5):936–942, 2007.
- Sesso, H.; Gaziano, J.; Jenkins, D. und Buring, J. Strawberry intake, lipids, C-reactive protein, and the risk of cardiovascular disease in women. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(4):303–310, 2007.

- Sharma, A. und Sharma, U. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2):123–140, 1997.
- Sharma, S.; Bell, D.; Settleman, J. und Haber, D. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3):169–181, 2007.
- Shibata, T.; Kokubu, A.; Gotoh, M.; Ojima, H.; Ohta, T.; Yamamoto, M. und Hirohashi, S. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*, 135(4):1358–1368, 2008a.
- Shibata, T.; Ohta, T.; Tong, K.; Kokubu, A.; Odogawa, R.; Tsuta, K.; Asamura, H.; Yamamoto, M. und Hirohashi, S. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36):13568, 2008b.
- Shih, P.; Yeh, C. und Yen, G. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23):9427–9435, 2007.
- Shumway, B.; Kresty, L.; Larsen, P.; Zwick, J.; Lu, B.; Fields, H.; Mumper, R.; Stoner, G. und Mallery, S. Effects of a topically applied bioadhesive berry gel on loss of heterozygosity indices in premalignant oral lesions. *Clinical Cancer Research*, 14(8):2421–2430, 2008.
- Singh, A.; Misra, V.; Thimmulappa, R.; Lee, H.; Ames, S.; Hoque, M.; Herman, J.; Baylin, S.; Sidransky, D.; Gabrielson, E.; Brock, M. und Biswal, S. Dysfunctional KEAP1–NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Medicine*, 3(10):e420, 2006.
- Singh, N.; McCoy, M.; Tice, R. und Schneider, E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1):184–191, 1988.
- Singletary, K.; Stansbury, M.; Giusti, M.; van Breemen, R.; Wallig, M. und Rimando, A. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25):7280–7286, 2003.
- Singletary, K.; Jung, K. und Giusti, M. Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage. *Journal of Medicinal Food*, 10(2):244–251, 2007.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S. und Boyd, M. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82:1107–1112, Jul 1990.
- Slamon, D.; Clark, G.; Wong, S.; W.J., L.; Ullrich, A. und McGuire, W. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177–182, 1987.

- Smith, M.; Kutty, R.; Richey, P.; Yan, S.; Stern, D.; Chader, G.; Wiggert, B.; Petersen, R. und Perry, G. Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 145(1):42, 1994.
- Snyder, G.; Cennerazzo, M.; Karalis, A. und Locey, D. Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry*, 20(23):6509–6519, 1981.
- Soderstrom, M.; Mannervik, B.; Orning, L. und Hammarstrom, S. Leukotriene C4 formation catalyzed by three distinct forms of human cytosolic glutathione transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(1):265–270, 1985.
- Soloaga, A.; Thomson, S.; Wiggin, G.; Rampersaud, N.; Dyson, M.; Hazzalin, C.; Mahadevan, L. und Arthur, J. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen-and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO Journal*, 22(11):2788–2797, 2003.
- Song, J.; Takeda, M. und Morimoto, R. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nature Cell Biology*, 3(3):276–282, 2001.
- Sørensen, B.; Sinding, J.; Andersen, A.; Alsner, J.; Jensen, P. und Westergaard, O. Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence: Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *Journal of Molecular Biology*, 228(3):778–786, 1992.
- Spencer, J.; Abd El Mohsen, M. und Rice-Evans, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: Implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423(1):148–161, 2004.
- Stamos, J.; Sliwkowski, M. und Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48):46265, 2002.
- Statistisches Bundesamt. Gesundheit – Todesursachen in Deutschland, 2011.
- Stewart, D.; Killeen, E.; Naquin, R.; Alam, S. und Alam, J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4):2396–2402, 2003.
- Stoner, G.; Sardo, C.; Apseloff, G.; Mullet, D.; Wargo, W.; Pound, V.; Singh, A.; Sanders, J.; Aziz, R.; Casto, B. und Sun, X. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7-days. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45(10):1153–1164, 2005.
- Sun, Z.; Huang, Z. und Zhang, D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS ONE*, 4(8):e6588, 2009.

- Sutter, S.; Buera, M. und Elizalde, B. β -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1):45–54, 2007.
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5):1743–1754, 1998.
- Taira, S.; Ono, M. und Matsumoto, N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3):265–271, 1997.
- Talalay, P.; De Long, M. und Prochaska, H. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21):8261, 1988.
- Talavéra, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Lamaison, J. und Rémésy, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *The Journal of Nutrition*, 133(12):4178–4182, 2003.
- Talavéra, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Gil-Izquierdo, A.; Lamaison, J. und Rémésy, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10):3902–3908, 2005.
- Teller, N.; Thiele, W.; Boettler, U.; Sleeman, J. und Marko, D. Delphinidin inhibits a broad spectrum of receptor tyrosine kinases of the ErbB and VEGFR family. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(9):1075–1083, 2009a.
- Teller, N.; Thiele, W.; Marczylo, T.; Gescher, A.; Boettler, U.; Sleeman, J. und Marko, D. Suppression of the kinase activity of receptor tyrosine kinases by anthocyanin-rich mixtures extracted from bilberries and grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8):3094–3101, 2009b.
- Thomasset, S.; Berry, D.; Garcea, G.; Marczylo, T.; Steward, W. und Gescher, A. Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *International Journal of Cancer*, 120(3):451–458, 2007.
- Thomasset, S.; Berry, D.; Cai, H.; West, K.; Marczylo, T.; Marsden, D.; Brown, K.; Dennison, A.; Garcea, G.; Miller, A.; Hemingway, D.; Steward, W. und Gescher, A. Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prevention Research*, 2(7):625–633, 2009a.
- Thomasset, S.; Teller, N.; Cai, H.; Marko, D.; Berry, D.; Steward, W. und Gescher, A. Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(1):201–211, 2009b.

- Toki, T.; Itoh, J.; Kitazawa, J.; Arai, K.; Hatakeyama, K.; Akasaka, J.; Igarashi, K.; Nomura, N.; Yokoyama, M.; Yamamoto, M. und Ito, E. Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*, 14(16): 1901–1910, 1997.
- Tong, K.; Katoh, Y.; Kusunoki, H.; Itoh, K.; Tanaka, T. und Yamamoto, M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8):2887–2900, 2006.
- Tong, K.; Padmanabhan, B.; Kobayashi, A.; Shang, C.; Hirotsu, Y.; Yokoyama, S. und Yamamoto, M. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21):7511–7521, 2007.
- Torskangerpoll, K. und Andersen, Ø. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89(3):427–440, 2005.
- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:4350–4354, 1979.
- Tsuda, T.; Horio, F. und Osawa, T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-*O*- β -D-glucoside in rats. *FEBS Letters*, 449(2-3):179–182, 1999.
- Tzahar, E.; Waterman, H.; Chen, X.; Levkowitz, G.; Karunakaran, D.; Lavi, S.; Ratzkin, B. und Yarden, Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10):5276–5287, 1996.
- Tzivion, G.; Shen, Y. und Zhu, J. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene*, 20(44):6331, 2001.
- Ulisse, S.; Cinque, B.; Silvano, G.; Rucci, N.; Biordi, L.; Cifone, M. und D’Armiento, M. Erk-dependent cytosolic phospholipase A2 activity is induced by CD95 ligand cross-linking in the mouse derived Sertoli cell line TM4 and is required to trigger apoptosis in CD95 bearing cells. *Cell Death and Differentiation*, 7(10):916, 2000.
- van Duijnhoven, F.; Bueno-De-Mesquita, H.; Ferrari, P.; Jenab, M.; Boshuizen, H.; Ros, M.; Casagrande, C.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K. *et al.* Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5):1441–1452, 2009.
- van Ommen, B.; Koster, A.; Verhagen, H. und van Bladeren, P. The glutathione conjugates of *tert*-butyl hydroquinone as potent redox cycling agents and possible reactive agents underlying the toxicity of butylated hydroxyanisole. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(1):309–314, 1992.

- Veeriah, S.; Kautenburger, T.; Habermann, N.; Sauer, J.; Dietrich, H.; Will, F. und Pool-Zobel, B. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis*, 45(3):164–174, 2006.
- Veeriah, S.; Hofmann, T.; Glei, M.; Dietrich, H.; Will, F.; Schreier, P.; Knaup, B. und Pool-Zobel, B. Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8):2892–2900, 2007.
- Veitch, N. und Grayer, R. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 25(3):555–611, 2008.
- Velichkova, M. und Hasson, T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 25(11):4501–4513, 2005.
- Viljanen, K.; Kylli, P.; Kivikari, R. und Heinonen, M. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24):7419–7424, 2004.
- Viljanen, K.; Kylli, P.; Hubbermann, E.; Schwarz, K. und Heinonen, M. Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):2022–2027, 2005.
- Vinson, C.; Myakishev, M.; Acharya, A.; Mir, A.; Moll, J. und Bonovich, M. Classification of human B⁶ ZIP proteins based on dimerization properties. *Molecular and Cellular Biology*, 22(18):6321–6335, 2002.
- Vitaglione, P.; Donnarumma, G.; Napolitano, A.; Galvano, F.; Gallo, A.; Scalfi, L. und Fogliano, V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *The Journal of Nutrition*, 137(9):2043–2048, 2007.
- Voet, D. und Voet, J. G. *Biochemistry*, volume 1. WILEY, John Wiley & Sons, inc., 3 edition, 2004.
- Vvedenskaya, I. und Vorsa, N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. *Plant Science*, 167(5):1043–1054, 2004.
- Wakabayashi, N.; Dinkova-Kostova, A.; Holtzclaw, W.; Kang, M.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Kensler, T. und Talalay, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7):2040, 2004.
- Walle, T.; Walle, U. und Halushka, P. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *The Journal of Nutrition*, 131(10):2648–2652, 2001.

- Wang, H. und Joseph, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6):612–616, 1999.
- Wang, H.; Cao, G. und Ronald, L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2):304–309, 1997.
- Wang, L.; Arnold, M.; Huang, Y.; Sardo, C.; Seguin, C.; Martin, E.; Huang, T.; Riedl, K.; Schwartz, S.; Frankel, W. *et al.* Modulation of genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer in humans by black raspberries: A phase I pilot study. *Clinical Cancer Research*, 17(3):598–610, 2011.
- Wang, M.; Zhao, J.; Zhang, L.; Li, H.; Yu, J.; Ren, X. und Wang, C. Combined Erlotinib and Cetuximab overcome the acquired resistance to epidermal growth factor receptors tyrosine kinase inhibitor in non-small-cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, pages 1–9, 2012.
- Wang, X.; Sun, Z.; Villeneuve, N.; Zhang, S.; Zhao, F.; Li, Y.; Chen, W.; Yi, X.; Zheng, W.; Wondrak, G.; Wong, P. und Zhang, D. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29(6):1235–1243, 2008.
- Wang, X.; Hayes, J.; Higgins, L.; Wolf, C. und Dinkova-Kostova, A. Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chemistry & Biology*, 17(1):75–85, 2010.
- Warne, P. H.; Viciana, P. R. und Downward, J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*, 364(6435):352–355, Jul 1993.
- Was, H.; Cichon, T.; Smolarczyk, R.; Rudnicka, D.; Stopa, M.; Chevalier, C.; Leger, J.; Lackowska, B.; Grochot, A.; Bojkowska, K. *et al.* Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *The American Journal of Pathology*, 169(6):2181–2198, 2006.
- Waskiewicz, A.; Flynn, A.; Proud, C. und Cooper, J. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO Journal*, 16(8):1909–1920, 1997.
- Watzl, B.; Briviba, K. und Rechkempe, G. Anthocyane. *Ernährungsumschau*, 49(4):148–150, 2002.
- Weisel, T.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Stockis, J.; Kulling, S.; Rüfer, C.; Johannes, C. und Janzowski, C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology Journal*, 1(4):388–397, 2006.
- Wicki, A. und Hagmann, J. Diet and cancer. *Swiss Medical Weekly*, 141:w13250, 2011.

- Williams, M. und Hrazdina, G. Anthocyanins as food colorants: Effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. *Journal of Food Science*, 44(1):66–68, 1979.
- Williamson, G.; Day, A.; Plumb, G. und Couteau, D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions*, 28(2):16–21, 2000.
- Winterbourn, C. und Hampton, M. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5):549–561, 2008.
- Wu, X.; Cao, G. und Prior, R. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *The Journal of Nutrition*, 132(7):1865–1871, 2002.
- Wu, X.; Pittman III, H.; McKay, S. und Prior, R. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *The Journal of Nutrition*, 135(10):2417–2424, 2005.
- Wu, X.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S. und Ronald, L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11):4069–4075, 2006.
- Xiao, J.; Kai, G.; Yang, F.; Liu, C.; Xu, X. und Yamamoto, K. Molecular structure-affinity relationship of natural polyphenols for bovine γ -globulin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(S1):S86–S92, 2011.
- Xie, T.; Belinsky, M.; Xu, Y. und Jaiswal, A. ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 270(12):6894–6900, 1995.
- Xing, J.; Ginty, D. und Greenberg, M. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 273(5277):959–963, 1996.
- Xiong, S.; Melton, L.; Easteal, A. und Siew, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17):6201–6208, 2006.
- Xu, C.; Huang, M.; Shen, G.; Yuan, X.; Lin, W.; Khor, T.; Conney, A. und Kong, A. Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-Related Factor 2. *Cancer Research*, 66(16):8293, 2006a.
- Xu, C.; Yuan, X.; Pan, Z.; Shen, G.; Kim, J.; Yu, S.; Khor, T.; Li, W.; Ma, J. und Kong, A. Mechanism of action of isothiocyanates: The induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8):1918, 2006b.

- Xu, H.; Yu, Y.; Marciniak, D.; Rishi, A.; Sarkar, F.; Kucuk, O. und Majumdar, A. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(3):435–442, 2005.
- Yagi, K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology*, 105:328–331, 1984.
- Yang, G.; Liao, J.; Kim, K.; Yurkow, E. und Yang, C. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19(4):611–616, 1998.
- Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2):127–137, Feb 2001.
- Yeh, C. und Yen, G. Induction of apoptosis by the Anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5):1740–1749, 2005.
- Yi, W.; Fischer, J.; Krewer, G. und Akoh, C. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18):7320–7329, 2005.
- Yu, R.; Lei, W.; Mandlekar, S.; Weber, M.; Der, C.; Wu, J. und Kong, A. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39):27545–27552, 1999.
- Yu, R.; Chen, C.; Mo, Y.; Hebbar, V.; Owuor, E.; Tan, T. und Kong, A. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51):39907, 2000.
- Zafra-Stone, S.; Yasmin, T.; Bagchi, M.; Chatterjee, A.; Vinson, J. und Bagchi, D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6):675–683, 2007.
- Zhang, B. und Guan, K. Regulation of the Raf kinase by phosphorylation. *Experimental Lung Research*, 27(3):269–295, 2001.
- Zhang, D.; Lo, S.; Cross, J.; Templeton, D. und Hannink, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24):10941–10953, 2004.
- Zhang, D.; Lo, S.; Sun, Z.; Habib, G.; Lieberman, M. und Hannink, M. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34):30091, 2005.
- Zhang, J.; Hosoya, T.; Maruyama, A.; Nishikawa, K.; Maher, J.; Ohta, T.; Motohashi, H.; Fukamizu, A.; Shibahara, S.; Itoh, K. und Yamamoto, M. Nrf2 Neh5 domain is differentially

- utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *The Biochemical Journal*, 404(Pt 3): 459, 2007.
- Zhang, X.; Gureasko, J.; Shen, K.; Cole, P. und Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6):1137–1149, 2006.
- Zhang, Y. und Tang, L. Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(9):1343–1354, 2007.
- Zhang, Y.; Talalay, P.; Cho, C. und Posner, G. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6):2399, 1992.
- Zhang, Y.; Kensler, T.; Cho, C.; Posner, G. und Talalay, P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8):3147, 1994.
- Zhao, C.; Giusti, M.; Malik, M.; Moyer, M. und Magnuson, B. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20):6122–6128, 2004.
- Zhen, Y.; Caprioli, R. und Staros, J. Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*, 42(18):5478–5492, 2003.
- Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J. und Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32:e103, 2004.
- Zipper, L. und Mulcahy, R. Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(2):484–492, 2000.
- Zipper, L. und Mulcahy, R. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39):36544–36552, 2002.

8 Anhang

Abstrakt der Dissertation (Deutsch)	237
Abstract (English)	238
Ergänzende Blotbilder	241
Danksagung	243
Curriculum Vitae	247

Abstrakt der Dissertation (Deutsch)

Polyphenolen, insbesondere Anthocyanen, werden zahlreiche chemopräventive Wirkungen zugeschrieben. Neuere Entwicklungen in der Mikroverkapselung zielen darauf ab, solche Substanzen im Lebensmittel zu stabilisieren, deren unerwünschte sensorische Eigenschaften zu maskieren sowie eine kontrollierte Freisetzung im Gastrointestinaltrakt zu erreichen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Verkapselungstechniken auf biologische Eigenschaften eines polyphenolreichen Heidelbeerextrakts *in vitro* und *in vivo* untersucht. Darüber hinaus wurden Substanzgruppen, die zur biologischen Wirksamkeit des Extrakts beitragen, identifiziert.

Die biologische Wirksamkeit des Heidelbeerextrakts vor und nach Verkapselung wurde *in vitro* über Hemmung der Rezeptoraktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und des Wachstums humaner Kolonkarzinomzellen betrachtet. Als möglicher anwendungslimitierender Faktor wurde darüber hinaus der Einfluss auf die Aktivität von Topoisomerasen untersucht. Der Einfluss von Verkapselungsmethoden wurde im Rahmen einer humanen Interventionsstudie untersucht. Als ausgewählter Parameter wurde hierzu die Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene in Blutzellen von gesunden Probanden und Ileostomiepatienten herangezogen.

Im Zellkultursystem wurde eine Verringerung der EGFR-Hemmwirkung des HBE (45–180 min Inkubation) durch die Formulierung in protein-, pektin- und emulsionsbasierte Systeme beobachtet. Dabei spielen Matrixeffekte eine wesentliche Rolle sowie die langsame Freisetzung bioaktiver Inhaltsstoffe und deren partielle Verluste bei der Kapselherstellung. Durch *ex vivo*-Verdau der Kapseln mit Ileostomaausfluss konnte die EGFR-Hemmwirkung des Extrakts nicht wiederhergestellt werden. Nach Fraktionierung des Heidelbeerextrakts gelang es, die wesentliche EGFR-Hemmwirkung auf den anthocyanfreien Anteil des Extrakts, insbesondere die polymere Proanthocyanidine, zurückzuführen. Im Gegensatz zur hemmenden Wirkung auf den EGFR wurde die wachstumshemmenden Eigenschaften des Extrakts (72 h Inkubation) durch die Formulierung in die zuvor untersuchten Systeme nicht negativ beeinflusst. Das emulsionsbasierte System hatte zudem eine leichte Verstärkung der Wachstumshemmung zur Folge. Nach Fraktionierung des Heidelbeerextrakts erwiesen sich hinsichtlich der wachstumshemmenden Wirkung sowohl Anthocyane als auch polymere Proanthocyanidine als aktive Komponenten.

Weder vor noch nach Formulierung des Extrakts in die untersuchten Systeme wurde eine Stabilisierung von DNA/Topoisomeraseintermediaten im ICE-Bioassay beobachtet, sodass die Formulierung hinsichtlich dieses Parameters keine Anwendungslimitierung darstellt. *In vivo* wurde durch Formulierung in protein- und citrusspektinbasierte Systeme ebenfalls eine deutlich Verminderung der Bioaktivität des Extrakts im Beobachtungszeitraum festgestellt. Der Verzehr verkapselten Extrakts vermittelte eine deutlich schwächer ausgeprägte Wirkung auf die Transkription der Nrf2/ARE-regulierter Gene HO-1, NQO1 und Nrf2 als die Aufnahme unverkapselten Extrakts (1–8 h nach Verzehr). In Blutzellen der Ileostomiepatienten wurde lediglich die Transkription von Nrf2 moduliert. Diese Beobachtung deutet auf die

Aufnahme von aktiven Extraktbestandteilen bzw. die Bildung wirksamer Metabolite im Kolon hin. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte *in vitro* lediglich das intestinale Anthocyanabbauprodukt Phloroglucinolaldehyd, nicht jedoch der Heidelbeerextrakt, isolierte Anthocyane oder Phenolcarbonsäuren als Aktivatoren des Nrf2/ARE-Signalwegs identifiziert werden.

Auf die Bioaktivität des Extrakts, zumindest im Hinblick auf die untersuchten biologischen Endpunkte, besitzen die untersuchten Formulierungssysteme im derzeitigen Entwicklungsstadium keine positiv modulierende Wirkung. Vielmehr zeigten sich *in vitro* und *in vivo* nach Verkapselung signifikante Verluste potentiell chemopräventiver Eigenschaften. *In vitro* konnten allerdings Effekte, die unter physiologischen Bedingungen zu einem Kapselaufschluss führen (mechanisch bzw. enzymatisch) nur unzureichend abgebildet werden.

Für den unverkapselten Extrakt konnte *in vivo* letztendlich eine bemerkenswert schnelle Wirkung auf die Transkriptregulation Nrf2-regulierter Gene in Blutzellen gezeigt werden, die zudem einen aktiven Kolon voraussetzen scheint. Durch die Verkapselung wird diese Wirkung jedoch im untersuchten Zeitfenster vermindert. Diese Beobachtung müsste in einer Langzeitintervention verifiziert werden, in die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnene Erkenntnisse einfließen könnten.

Abstract (English)

Polyphenols, in particular anthocyanins, have been described as chemopreventive reagents. Microencapsulation provides a technique to stabilize these components in foodstuff, mask unpleasant characteristics such as taste or color and allow their controlled release throughout the gastrointestinal tract. Herein, the influence of formulation techniques on a bilberry extract's bioactivity was investigated *in vitro* and *in vivo*. In addition, bioactive components, responsible for the observed effects, were identified. *In vitro*, bioactive properties of the bilberry extract were investigated before and after encapsulation, using the inhibition of (1) epidermal growth factor receptor (EGFR) activity and (2) growth of colon carcinoma cells as parameters. Transcription of Nrf2/ARE-regulated genes in peripheral mononuclear blood cells (PBMC) of healthy volunteers and ileostomy patients were used as *in vivo* parameters to determine effects on the extract's bioactivity after encapsulation.

Formulation in protein, pectin and emulsion based systems led to a significant loss on the inhibitory potential towards the EGFR (45–180 min of incubation). Most probably, this observation was due to matrix interaction, slow release of active compounds or partial loss of these compounds during encapsulation. In an attempt to simulate physiologic conditions, capsules were digested *ex vivo* in ileostomy effluent prior to cell incubation. It revealed that this pretreatment leads to a significant loss of the extract's inhibitory potential toward the EGFR (non-encapsulated as well as formulated). This effect may be attributed to vast interactions of bioactive constituents with the ileostomy effluent. Non-anthocyanins, particularly polymeric proanthocyanins, were found to substantially contribute for the extract's inhibitory potential towards the receptor. Furthermore, amplifying as well as compensating effects among

particular substances were identified. Growth inhibitory effects (72 h of incubation) were not negatively affected due to formulation. Yet, the emulsion-based system had an increasing effect on the growth inhibitory potential. Anthocyanins and polymeric proanthocyanins were identified to mediate growth inhibition. The influence on topoisomerase activity was assessed to determine adverse effects due to encapsulation. No stabilization of DNA/topoisomerase intermediates was found in the ICE bioassay after incubation with free extract as well as extract loaded systems. *In vivo*, formulation of the extract led to a significant loss of bioactivity. In contrast to free extract, consumption of extract in protein or citrus pectin based systems had a significantly lower modulatory effect on transcription of the Nrf2/ARE regulated genes HO-1, NQO1 and Nrf2 in PBMC of healthy volunteers. In PBMC of ileostomy patients, transcription of HO-1 and NQO1 was not affected by consumption of free extract. This observation could be ascribed on colonic resorption of active compounds or intestinal formation of effective metabolites. Additional results of *in vitro* studies on Nrf2 activation using a reporter gene approach and qRT-PCR indicated that the intact anthocyanins are not the activating constituents but their intestinal degradation product phloroglucinol aldehyde.

The data show, that the investigated formulation systems (in their stage of development) do not positively modulate bilberry extract's bioactivity. Rather significant losses of putatively chemopreventive properties *in vitro* and *in vivo* were found due to encapsulation. Digestive processes, that would disrupt capsules under physiological conditions were not simulated properly in the *in vitro* assays. The assumed enhancement of component's bioactivity after encapsulation, for instance due to locally increased concentrations or triggered release, could be excluded under the given conditions.

Ergänzende Blotbilder

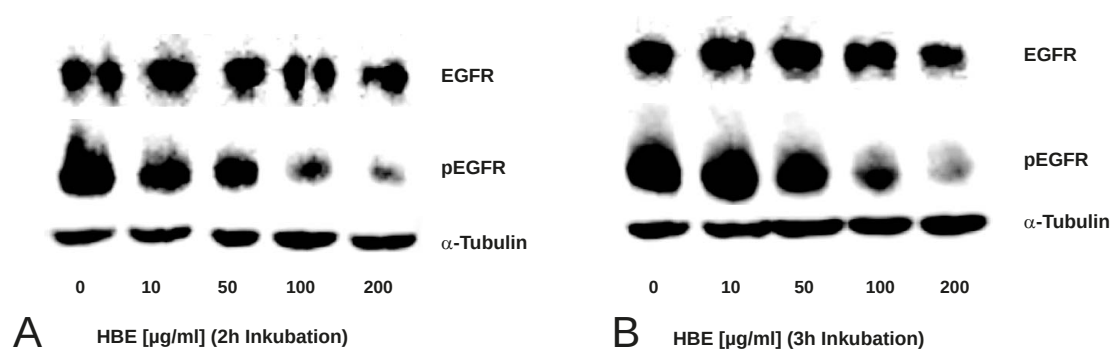


Abbildung 72: Ergänzende Blotbilder zu Abbildung 28



Abbildung 73: Ergänzende Blotbilder zu Abbildung 30



Abbildung 74: Ergänzende Blotbilder zu Abbildung 32

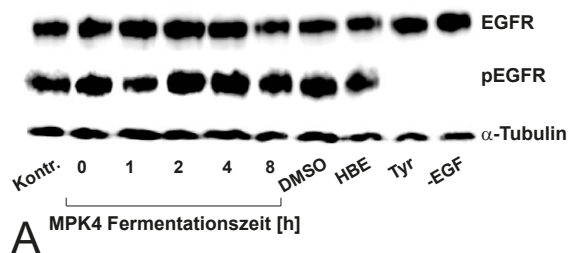


Abbildung 75: Ergänzende Blotbilder zu Abbildung 35 und 36.

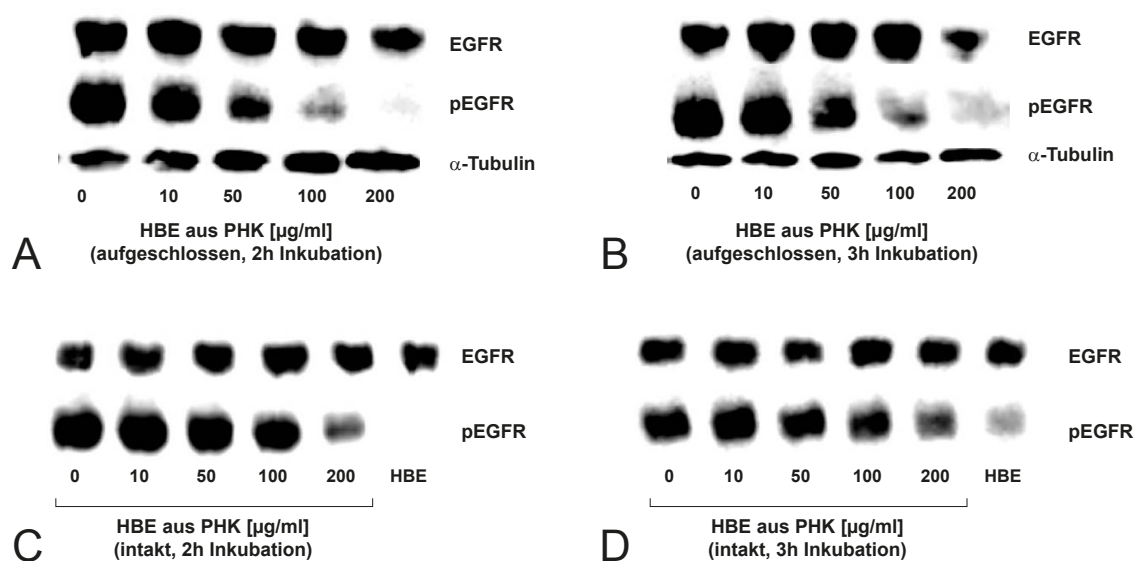


Abbildung 76: Ergänzende Blotbilder zu Abbildung 33

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei:

- Doris für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.
- Gudrun, Ute, Volker und Helge für deren wissenschaftliche Unterstützung, die zu wichtigen Ideen und Erkenntnissen beigetragen haben.
- Allen weiteren ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen aus dem AK Marko: Nicole, Diana, Melanie, Markus, Matthias, Nadine, Swantje, Simone, Anika, Christine, Liz und Eva für die angenehme Zusammenarbeit.
- Markus Schantz, Michael Betz, Sabine Leick, Andreas Juadjur, Johannes Oidtmann, Kerstin Frank, Henry Jäger, Sonja Berg, Dolores Müller und Dorothee Stübs für die tolle Zusammenarbeit in den verschiedenen Projekten.
- Meiner Diplomandin Melanie für die gute und konstruktive Zusammenarbeit.
- Jens, Gerry, Norbert, Nadine, Anna, Frederike, Nicolas und Paul für eure Freundschaft. Es tut mir leid, dass ich während meiner Schreibaarbeit so wenig Zeit für euch hatte.
- Meinen Brüdern Eckart, Marcel und Georg für den familiären Rückhalt.
- Meiner Mutter, ohne die ich nicht wäre, wo ich jetzt bin. Ich vermisse Dich.

Hiermit bestätige ich, Christopher Kropat, die vorliegende Dissertation selbstständig 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 7. November 2012

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Christopher Kropat
Adresse	Mariahilferstr. 167/14 A-1150 Wien
Telefon	0043 699 19018753
E-Mail	christopher.kropat@gmail.com
Geburtsdatum	19. April 1980
Geburtsort	Hertingen, Deutschland

Promotion

07/2009 – heute	Fortführung der Promotion Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien
07/2008 – 06/2009	Beginn der Promotion, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe (TH) Thema der Dissertation: "Modulation proliferationsassoziierter Parameter der Bioaktivität eines Heidelbeerextrakts (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.) mittels Fraktionierung bzw. Mikroformulierung"

Studium

10/2007 – 03/2008	wissenschaftliche Abschlussarbeit Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe (TH) Thema: „Wirkmechanistische Untersuchungen zur Genotoxizität von Alternariol“ (Note 1,3)
08/2005 – 04/2006	Auslandsstudium University of Notre Dame, Indiana, USA Studienrichtungen Biochemie und Chemische Verfahrenstechnik (Note 1,3)
10/2001 – 09/2007	Grund- und Hauptstudium Universität Karlsruhe (TH) in der Studienrichtung Lebensmittelchemie, Abschluss: Staatsexamen (Note 1,2)

Zivildienst

05/2000 – 06/2001	Pfleger in der Schwerstbehinderten-Betreuung Haus Engels, Hertingen
-------------------	---

schulische Ausbildung

- 09/1997 – 04/2000 **Technisches Gymnasium**
Georg-Kerschensteiner-Schule, Müllheim
Abschluss: Abitur (Note 1,9)
- 09/1997 – 04/2000 **Realschule**
Alemannen Realschule Müllheim
Abschluss: Mittlere Reife (Note 1,6)

Stipendien

- 03/2011 – 06/2011 **Forschungsstipendium**
Universität Wien
- 07/2007 – 06/2008 **Landesgraduiertenförderung**
Institut für Lebensmittelchemie, Universität Wien

Nebentätigkeiten

- 01/2010 – heute **Homepage-Administration**
Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien
Institut für Anorganische Chemie, Universität Wien
- 04/2007 – 06/2007 **Hilfswissenschaftler**
Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe
- 01/2003 – 12/2004 **Hilfswissenschaftler**
Fraunhofer ICT, Karlsruhe

Publikationen

- Markus Fehr, Simone Baechler, **Christopher Kropat**, Christian Mielke, Fritz Boege, Gudrun Pahlke und Doris Marko: Repair of DNA damage induced by the mycotoxin alternariol involves tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. Mycotoxin Research, Volume 26, Number 4 (2010), 247–256.
- **Christopher Kropat**, Dolores Mueller, Ute Boettler, Kristin Zimmermann, Elke H. Heiss, Verena M. Dirsch, Dorothee Rogoll, Ralph Melcher, Elke Richling, Doris Marko. Modulation of Nrf2 dependent gene transcription by bilberry anthocyanins *in vivo* – Mediated by the intestinal degradation product phloroglucinol aldehyde? Eingereicht bei Molecular Nutrition & Food research.

- **Christopher Kropat**, Melanie Andrea Brunner, Christine Krumboeck, Nicole Teller, Verena Eschbach, Andreas Juadjur, Peter Winterhalter, Doris Marko. Identification of proliferation-associated bioactive constituents from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.). Zur Überarbeitung bei den Coautoren.
- **Christopher Kropat**, Michael Betz, Ulrich Kulozik, Sabine Leick, Heinz Rehage, Markus Schantz, Elke Richling, Ute Boettler, Nicole Teller, Doris Marko. Effect of microformulation on the bioactivity of an anthocyanin-rich bilberry pomace extract (*Vaccinium myrtillus* L.) *in vitro*. Zur Überarbeitung bei den Coautoren.

Vorträge

- Cluster-Projekt: Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, 3. Projekttreffen, Bonn 24.09.2009: Präsentation des Forschungsfortschritts
- Cluster-Projekt: Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, 4. Projekttreffen, Bonn 21.04.2010: Präsentation des Forschungsfortschritts
- Cluster-Projekt: Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, 5. Projekttreffen, Bonn 18.01.2011: Präsentation des Forschungsfortschritts
- Cluster-Projekt: Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen, Abschluss-symposium, Karlsruhe 09.11.2011: Präsentation der Gesamtergebnisse
- Lebensmittelchemikertage GÖCh, Linz 2012: **Christopher Kropat**, Melanie Brunner, Doris Marko, Andreas Juadjur, Peter Winterhalter, Sabine Leick, Heinz Rehage, Michael Betz, Ulrich Kulozik: „Einfluss unterschiedlicher Verkapselungstechniken auf Stabilität und biologische Wirksamkeit von Heidelbeertresterextrakt *in vitro*“

Posterbeiträge

- Lebensmittelchemikertage GÖCh, Linz 2012: **Christopher Kropat**, Nicole Teller, Michael Betz, Ulrich Kulozik, Sabine Leick, Heinz Rehage, Doris Marko: „Einfluss unterschiedlicher Verkapselungstechniken auf die biologische Wirksamkeit von Heidelbeerextrakt *in vitro*“
- ASTOX 2009, Wien: **Christopher Kropat**, Markus Fehr, Gudrun Pahlke, Simone Bächler, Melanie Esselen, Doris Marko: „Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) modulates the DNA damaging properties of the mycotoxin alternariol“
- 30. Mycotoxin Workshop, Utrecht, Netherlands, 28.04-30.04. 2008. Markus Fehr, Ute Böttler, Nadine Volz, **Christopher Kropat**, Gudrun Pahlke, Melanie Esselen, Doris Marko: „Induction of oxidative stress by *Alternaria* toxins“

- GDCh-Jahrestagung Chemie 2008 in Kaiserslautern, 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag 08.09.-10.09.2008. Ute Böttler, Markus Fehr, Gudrun Pahlke, Nadine Volz, **Christopher Kropat**, Melanie Esselen, Simone Bächler, Doris Marko: „Induktion von oxidativem Stress durch das Mykotoxin Alternariol“
- Lebensmittelchemikertag 2008 Kaiserslautern: **Christopher Kropat**, Markus Fehr, Gudrun Pahlke und Doris Marko - „Bedeutung der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 bei der Reduktion Alternariol-induzierter DNA-Schäden“

Weiter- und Fortbildungen

06/2012	wissenschaftliches Schreiben, Wien
06/2012	InDesign Fortsetzung, Wien
05/2012	InDesign Einführung, Wien
01/2012	Illustrator Einführung, Wien
12/2011	Lebensmitteltoxikologie, DGPT, Kaiserslautern
11/2011	Auftreten vor Publikum, Wien
10/2011	Stimme, Sprache und Präsenz, Wien
09/2011	PCR für Fortgeschrittene, Biorad, Wien
03/2011	Immuntoxikologie I, DGPT, Berlin
02/2010	Zelltoxikologie, DGPT, München
10/2009	Versuchstierkunde I, DGPT, Erfurt
02/2009	Organtoxikologie I, DGPT, Erfurt

Sprachkenntnisse

Englisch	C1
Französisch	A1

EDV-Kenntnisse

MS Office	sehr gut
ChemOffice	gut
Latex	gut
CorelDraw	sehr gut
Adobe Creative Suite	gut

Führerschein

Klassen B, BE, C1
und C1E

Interessen

Fotografie

Grafik & Design

Laufsport

Wintersport

Fitness

Wien, den 7. November 2012