



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäure- und
Glukoseaufnahme von Enterozyten *in vitro*“

verfasst von

Barbara Friedl Bakk. rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza

Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. Veronika Somoza für die Möglichkeit, den praktischen Teil der Masterarbeit am Institut für Ernährungsphysiologie und physiologische Chemie durchzuführen, bedanken. Ich schätze die Arbeiten des Instituts sehr und habe mich über die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des spannenden Themas sehr gefreut.

Besonderer Dank gilt vor allem Barbara Lieder, die mich geduldig eingeschult und mich während der gesamten Phase mit zahlreichen inspirierenden Ratschlägen, Motivation und liebevoller Unterstützung betreut hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei den übrigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Claudia Habersack, Christina Hochkogler, Wiebke Hoffmann, Ann-Katrin Holik, Kathrin Liszt, Mark Pignitter, Katharina Schüller, Verena Stöger und Jessika Walker für die warmherzige Kollegialität und Hilfsbereitschaft bedanken.

Herzlicher Dank gebührt meiner Familie, die mich auf den gesamten Ausbildungsweg fürsorglich unterstützt und stets an mich geglaubt hat.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund, der mich mit Optimismus, Verständnis und Frohsinn während des Studiums begleitet hat.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Literaturübersicht.....	1
1.1 Hypertriglyzeridämie	1
1.2 Flavonoide	3
1.2.1 Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Flavonoide.....	7
1.2.2 Flavonoide und deren Wirkung auf den Lipidstoffwechsel.....	9
1.3 Metabolismus der Fette und Kohlenhydrate	12
1.3.1 Das Dünndarmepithel.....	12
1.3.2 Fettstoffwechsel im Verdauungstrakt.....	13
1.3.3 Intestinale Fettsäureaufnahme	14
1.3.4 Fettstoffwechsel in den Enterozyten.....	24
1.4 Intestinale Glukoseaufnahme	25
1.5 Das Fettgewebe und die periphere Fettsäureaufnahme	27
2 Problemstellung.....	29
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Verwendete Materialien und Geräte	31
3.2 Medien.....	34
3.3 Puffer und Lösungen	34
3.4 Primer	37

3.5 Zellkultur	37
3.5.1 Die Caco-2 Zelllinie	38
3.5.2 Die 3T3-L1 Zelllinie	38
3.5.3 Kultivierung.....	40
3.6 Methoden.....	43
3.6.1 Bestimmung der Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten und 3T3 - L1 Adipozyten mit QBT Fatty Acid Uptake Assay Kit.....	43
3.6.2 Bestimmung der Glukoseaufnahme in Caco-2 Enterozyten mit 2-NBDG Fluoreszenzfarbstoff.....	45
3.6.3 RNA-Isolierung mit Caco-2 Enterozyten.....	46
3.6.4 cDNA-Synthese – Reverse Transkription.....	48
3.6.5 Bestimmung der Genexpression mit quantitativer Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion	50
3.6.6 Messung der metabolischen Aktivität mittels MTT-Methode in Caco-2 und 3T3-L1 Zellen.....	53
3.6.7 Statistik.....	54
4 Ergebnisse	56
4.1 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die metabolische Aktivität der Caco-2 Enterozyten.....	56
4.2 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten	57
4.3 Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression ausgewählter Fettsäuretransporter und Gene des Fettstoffwechsel in Caco-2 Enterozyten	60
4.4 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Glukoseaufnahme in Caco-2 Enterozyten	67

4.5 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die metabolische Aktivität der 3T3-L1 Adipozyten.....	70
4.6 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten.....	72
5 Diskussion	75
6 Schlussbetrachtung	98
7 Zusammenfassung	101
8 Abstract	102
9 Literaturverzeichnis.....	103
10Anhang	116
Lebenslauf	130

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Verbindungsklassen der Flavonoide und deren Vorkommen	4
Tab. 2 Gewebeverteilung der Fettsäure-Transportproteine	20
Tab. 3 Volumina für Zellkulturmaterialien.....	42
Tab. 4 benötigte Zufuhrmengen von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz, Hesperetin und Sterubin um die intestinale Fettsäureaufnahme zu modulieren.....	95
Tab. 5 Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Enterozyten	116
Tab. 6 Glukoseaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Enterozyten	118
Tab. 7 Genexpression von <i>CD36</i> nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten.....	120
Tab. 8 Genexpression von <i>IFABP</i> nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten.....	121
Tab. 9 Genexpression von <i>FATP2</i> nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten.....	122
Tab. 10 Genexpression von <i>FATP4</i> nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten.....	123
Tab. 11 Genexpression von <i>PPARα</i> nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten.....	124
Tab. 12 Genexpression von <i>PPARγ</i> nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten.....	125
Tab. 13 Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in 3T3-L1 Adipozyten.....	126
Tab. 14 Metabolische Aktivität nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in 3T3-L1 Adipozyten.....	128
Tab. 15 Metabolische Aktivität nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Zellen.....	129

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Strukturformeln wichtiger Flavonoidaglyka	5
Abb. 2 Absorption der Fettsäuren in Enterozyten	16
Abb. 3 Caco-2 Epithelzellen.....	38
Abb. 4 3T3-L1 Präadipozyten	39
Abb. 5 Differenzierte 3T3-L1 Adipozyten	39
Abb. 6 Metabolische Aktivität nach 90-minütiger Inkubation mit 1 bis 100 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen.....	56
Abb. 7 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 100 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	57
Abb. 8 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 100 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen.....	59
Abb. 9 Genexpression von CD36 nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	61
Abb. 10 Genexpression von IFABP nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	62
Abb. 11 Genexpression von FATP 2 nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	63
Abb. 12 Genexpression von FATP 4 nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	64
Abb. 13 Genexpression von PPARα nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	65

Abb. 14 Genexpression von PPAR γ nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten	66
Abb. 15 Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation und 30-minütiger Inkubation nach Zugabe des 2-NBDG-Farbstoffes mit 0,01 bis 100 μ M Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen	68
Abb. 16 Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation und 30-minütiger Inkubation nach Zugabe des 2-NBDG-Farbstoffes mit 0,001 bis 100 μ M Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen	69
Abb. 17 Metabolische Aktivität nach 90-minütiger Inkubation mit 0,1 bis 10 μ M Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in 3T3-L1-Adipozyten	71
Abb. 18 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 10 μ M Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in 3T3-L1 Adipozyten	72
Abb. 19 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in 3T3-L1 Adipozyten	74
Abb. 20 Strukturformeln von Homoeriodictyol, dessen Natriumsalz, Eriodictyol, Hesperetin, Sterubin und Phloretin	77
Abb. 21 Überblick der analysierter Mechanismen zur Veränderung der intestinalen Fettsäureresorption nach Inkubation mit Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten.	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-NBDG	<u>2</u> -(N-(7- <u>N</u> itro <u>b</u> enz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2- <u>D</u> eoxy <u>g</u> lukose
ACS	<u>A</u> cy <u>l</u> - <u>C</u> oenzym A <u>S</u> ynthetase
ANOVA	Varianzanalyse (<u>A</u> nalysis of <u>V</u> ariance)
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (<u>a</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve)
bidest.	<u>b</u> ide <u>s</u> tilliert
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Cav-1	<u>C</u> aveolin- <u>1</u>
CD36	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation <u>36</u>
CE	<u>C</u> holesterolester
Ch	<u>C</u> holesterol
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agles <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
dNTP	<u>D</u> esoxynukleosid <u>t</u> riphosphate
ED	<u>E</u> riodictyol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (<u>E</u> thylened <u>a</u> minet <u>e</u> tetraacetic <u>A</u> cid)
EGCG	<u>E</u> pigallo <u>c</u> atechingallat
FABP _c	zytosolisches Fettsäure Bindungsprotein (<u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>b</u> inding <u>p</u> rotein)
FABP _{pm}	<u>p</u> lasma <u>m</u> embran-ständiges Fettsäure-Bindungsprotein (<u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>b</u> inding <u>p</u> rotein)
FATP 1-6	Fettsäure-Transportprotein 1-6 (<u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>t</u> ransport <u>p</u> rotein)
FBS	Fetales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
FS	<u>F</u> ettsäure
FSCoA	aktivierte Fettsäure, Fettsäure-Coenzym A
GLUT	<u>G</u> lukose <u>t</u> ransporter
HBSS	<u>H</u> anks <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution
HDL	<u>H</u> ohe <u>D</u> ichte <u>L</u> ipoprotein, <u>h</u> igh <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
HED	<u>H</u> omo <u>e</u> riodictyol

Hesp	<u>H</u> esperetin
HPRT-1	<u>H</u> ypoxanthin <u>P</u> hosphoribosyltransferase 1
IFABP	<u>I</u> ntestinales <u>F</u> ettsäure- <u>B</u> indungsprotein
KG	<u>K</u> örpergewicht
KO	<u>K</u> nockout
LFABP	Leber- <u>F</u> ettsäure- <u>B</u> indungsprotein
MTP	<u>m</u> ikrosomales <u>T</u> riglyzerid <u>T</u> ransferprotein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	<u>M</u> ittelwert
n	Stichprobenumfang, biologische Replikate
NaHED	<u>H</u> omoeriodictyol- <u>N</u> atriumsalz
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PBS	Phosphatpuffer (<i><u>P</u>hosphate <u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>)
PenStrep	<u>P</u> enicillin- <u>S</u> treptomycin Lösung
PhI	<u>P</u> hloretin
PPAR	<u>P</u> eroxisom <u>P</u> roliferator <u>a</u> ktivierte <u>R</u> ezeptoren
PL	<u>P</u> hospholipid
rpm	Umdrehungen pro Minute, (<i><u>r</u>ounds <u>p</u>er <u>m</u>inute</i>)
RT	<u>R</u> aumtemperatur
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> olymerase <u>K</u> ettenreaktion
SD	Standardabweichung (<i><u>S</u>tandard <u>D</u>eviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i><u>S</u>tandard <u>E</u>rror of the <u>M</u>ean</i>)
SGLT1	Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (<i><u>s</u>odium dependent <u>g</u>lucose transporter 1</i>)
Ster	<u>S</u> terubin
T	<u>T</u> emperatur
TG	<u>T</u> riglyzeride
tr	<u>T</u> echnische <u>R</u> eplikate
VLDL	Sehr geringe Dichte Lipoprotein, (<i><u>v</u>ery <u>l</u>ow <u>d</u>ensity <u>l</u>ipoprotein</i>)
xg	Zentrifugalbeschleunigung

1 LITERATURÜBERSICHT

1.1 Hypertriglyzeridämie

Übergewicht und Adipositas resultieren aus einer längerfristigen Imbalance zwischen Energiezufuhr und –verbrauch. Diese Imbalance geht meist mit einer vermehrten Energieaufnahme und einem bewegungsarmen Lebensstil einher [WHO, 2000]. In der europäischen Region sind bereits 58,3 % der erwachsenen Männer, 51,2 % der Frauen und jedes dritte 11-jährige Kind übergewichtig oder adipös [WHO, 2014]. Übergewicht tritt typischerweise gemeinsam mit einem gestörten Fettstoffwechsel auf. Dieser und weitere Symptome sind zwei wesentliche Faktoren für das metabolische Syndrom. Letzteres wird nach Definition des *National Heart, Lung and Blood Institute* durch das Vorliegen von drei der folgenden fünf Parameter bestimmt: abdominelle Adipositas (Bauchumfang > 102 cm für Männer, > 88 cm für Frauen), erhöhte Nüchterntriglyzeride (≥ 150 mg/dL), verringertes *high density lipoprotein* (HDL)-Cholesterol (< 40 mg/dL bei Männern bzw. < 50 mg/dL bei Frauen), erhöhter Blutdruck und erhöhter Nüchternblutzucker (≥ 100 mg/dL) [FRITSCHKE und JOOST, 2010]. Die Diagnose des metabolischen Syndroms ist unter anderem mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Krankheiten assoziiert. Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhter Triglyzeridkonzentration im Blut und kardiovaskulären Erkrankungen [AUSTIN et al., 1998], [SARWAR et al., 2007]. Die *American Heart Association* empfiehlt die Aufrechterhaltung normaler Triglyzeridwerte (< 150 mg/dL) im Blut, um kardiovaskuläre Erkrankungen zu vermeiden [MOSCA et al., 2011].

Allgemein betrachtet entsteht Hypertriglyzeridämie entweder durch eine vermehrte Synthese von Lipoproteinen und Triglyzeriden in Leber und peripheren Geweben und / oder durch einen verminderten Abbau triglyzeridreicher Lipoproteine aus dem Blut. Hypertriglyzeridämie hat viele Ursachen. Zum einen resultiert diese Stoffwechselstörung aus genetischen Defekten, wie z.B. Mutationen am Gen der Lipoproteinlipase (Enzym, zur Spaltung von Triglyzeriden in Lipoproteinen im Plasma) oder dessen Mangel, zum anderen führen kalorienreiche Mahlzeiten ebenfalls zu erhöhten

Plasmatriglyzeriden. Sekundäre Hypertriglyzeridämie tritt als Nebenerscheinung bei bestimmten Krankheiten, wie Diabetes mellitus Typ 2 auf oder nach Einnahme einiger Medikamente [ZIMMERMANN und WEBER, 2010].

Pathophysiologie

Triglyzeride werden im Plasma in Form von Lipoproteinen transportiert. Zu den triglyzeridreichen Lipoproteinen zählen Chylomikronen und *very low density lipoprotein* (VLDL). Erstes wird in den intestinalen Zellen gebildet und enthält hauptsächlich Nahrungsfett. Nach Hydrolyse der Triglyzeride durch endothelständige Lipoproteinlipasen verbleiben sogenannte Chylomikronen *Remnants* im Blut. Werden diese Partikel nicht aus dem Blut entfernt, können sie zur Bildung von atherogenen Schaumzellen beitragen [BOTHAM et al., 2007].

VLDL wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und führt endogene Lipide durch das Blut. Aufgrund der Triglyzeridhydrolyse in diesen Transportpartikeln werden VLDL zu kleineren und dichteren Lipoproteinen geformt. Dabei entsteht unter anderem *low density lipoprotein* (LDL), welches anfälliger für oxidative Modifikationen ist und dadurch zur Entstehung von Schaumzellen führen kann [MILLER et al., 2011].

Mechanismen zur Verringerung erhöhter Plasmatriglyzeride

Neben der alimentären Einschränkung von gesättigten Fettsäuren, Cholesterol, niedermolekularen Kohlenhydraten und Alkohol gehört die körperliche Aktivität ebenfalls zu den therapeutischen Maßnahmen um Triglyzeride im Plasma zu reduzieren. Durch Bewegung wird die β -Oxidation in Muskeln gesteigert und es werden mehr Fettsäuren als Energiesubstrat verbraucht. Hingegen bevorzugt die Leber Glukose und Ethanol als Energiesubstrat, was dazu führt, dass Fettsäuren vermehrt zu Triglyzeriden verestert werden. Daher sollte bei Hypertriglyzeridämie auf Alkohol und leicht resorbierbare Kohlenhydrate verzichtet werden [ZIMMERMANN und WEBER, 2010] [MILLER et al., 2011].

Bestimmte Faktoren im Verdauungstrakt können dazu beitragen, dass die Absorption von Lipiden erschwert wird. Dazu zählen unter anderem die

Inhibierung bestimmte Enzyme bei der Fettverdauung. So hemmt z.B. Orlistat die gastrointestinale Lipase und reduziert dadurch die Lipolyse. Auf diese Weise wird die intestinale Fettabsorption gehemmt und vermehrt Lipide mit dem Fäzes ausgeschieden [TAN et al., 2002].

Der direkte Transport von Fettsäuren in Enterozyten und die Synthese von Chylomikronen in diesen Zellen könnte ebenfalls dazu beitragen, die Triglyzeridkonzentration im Plasma zu reduzieren.

Der Lipidmetabolismus in der Leber beeinflusst die Plasmalipide ebenfalls. So könnte die Synthese von Triglyzeriden oder Lipoproteinen in diesem Organ verringert werden. Die Wirkstoffklasse der Fibrate kommt bei Hypertriglyzeridämie zum Einsatz und wirkt als Agonist von PPAR α (Funktion von PPAR α ist detaillierter in Kap. 1.3.3 beschrieben). Durch Aktivierung von PPAR α wird die Fettsäureaufnahme in die Leber gesteigert und die β -Oxidation zugleich gefördert. Die Expression der Lipoproteinlipase wird infolge einer PPAR α Aktivierung erhöht und der Triglyzeridabbau in Lipoproteinen dadurch gesteigert [WANG et al., 2013], [SHAH et al., 2011].

1.2 Flavonoide

In den letzten Jahrzehnten rückten pflanzliche Sekundärstoffe immer mehr in das öffentliche Interesse, da bekannt wurde, dass diese Verbindungen zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen zeigen. Polyphenole sind eine heterogene Gruppe innerhalb der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und kommen meist in Obst und Gemüse, aber auch im Kaffee, Tee und Nüssen vor. Flavonoide stellen die am häufigsten vorkommenden Polyphenole in der Humanernährung dar. Sie werden anhand der Anzahl und Stellung der Hydroxylgruppen, der Oxidationsstufe am Flavan (2-Phenylchroman)-Grundgerüst und dem Polymerisierungsgrad in Unterklassen eingeteilt. Die Gliederung der Verbindungsklassen der Flavonoide, sowie deren Vorkommen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Flavan, das Grundgerüst der Flavonoide, besteht aus drei Kohlenstoffringen. Zwei davon sind aromatisch (A und B) und einer O-heterozyklisch (C) [WATZL und RECHKEMMER, 2001].

Die Strukturen, der wichtigsten Flavonoide sind in Abbildung 1 gezeigt.

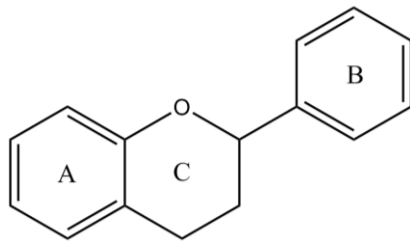
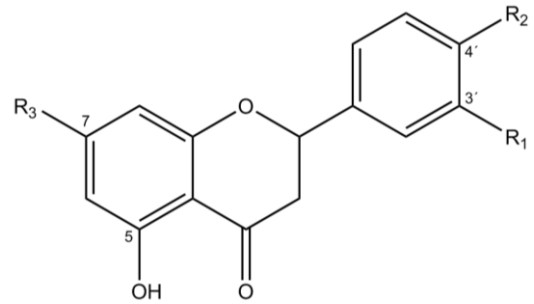
Tab. 1 Verbindungsklassen der Flavonoide und deren Vorkommen [mod nach. Watzl und Rechkemmer, 2001]

Verbindung	Beispiel	Vorkommen
Flavanone	Hesperetin	Orange
	Eriodictyol	Zitrone
	Naringenin	Grapefruit
Flavone	Apigenin, Luteolin	Sellerie, Paprika
Flavonole	Quercetin	Zwiebel, Apfel, Grünkohl
Flavanole	Catechin, Epigallocatechingallat (EGCG)	Apfel, grüner Tee
Anthocyane	Malvidin	Weintrauben
Isoflavone	Genistein, Daidzein	Sojabohne

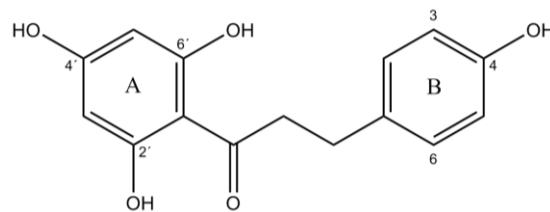
In der Natur kommen Flavonoide als Glykoside gebunden vor, mit Ausnahme der Catechine, die als Aglykone, gebunden an Gallussäure, vorliegen.

Die tägliche Aufnahme von Flavonoiden liegt bei gemischter Kost bei etwa 50 bis 200 mg pro Tag [DGE, 2010]. Bei obst- und gemüsereicher Ernährungsweise kann die tägliche Zufuhrmenge auf etwa ein Gramm pro Tag erhöht werden [SCALBERT und WILLIAMSON, 2000].

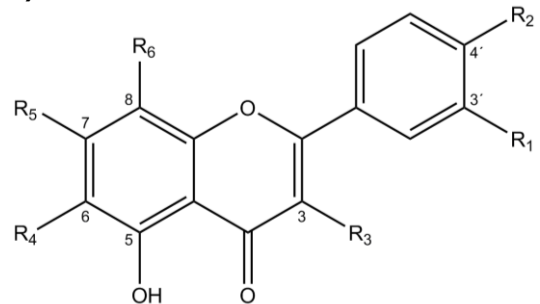
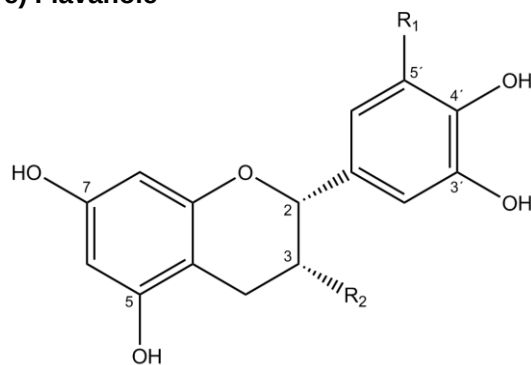
Aus epidemiologischen und Fall-Kontroll Studien geht hervor, dass Flavonoide das Risiko für bestimmte Krebsarten und Herz-Kreislaufkrankungen senken. Sie wirken antioxidativ, antithrombotisch, blutdrucksenkend, chemopräventiv oder entzündungshemmend [WATZL und RECHKEMMER, 2001], [DGE, 2010], [HERTOG et al., 1993]. Neuere Studien zeigen darüber hinaus eine mögliche Wirkung beim Einsatz gegen das metabolische Syndrom [MEYDANI und HASAN, 2010].

a) Flavan Grundgerüst**b) Flavanone**

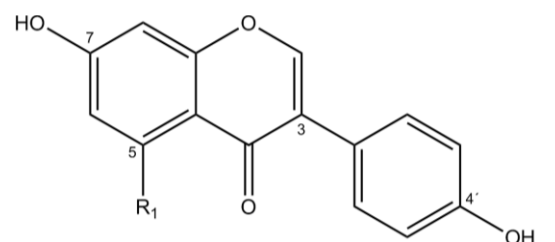
Hesp	R ₁ =OH	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH
ED	R ₁ =OH	R ₂ =OH	R ₃ =OH
Ster	R ₁ =OH	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃
HED	R ₁ =OCH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OH

c) Dihydrochalkon

Phloretin

d) FlavonoleQuercetin R₁=OH, R₂=OH, R₃=OH,
R₄=H, R₅=OH, R₆=H**e) Flavanole**

(-)-Epicatechin	R ₁ =H	R ₂ =OH
(-)-Epigallocatechin	R ₁ =OH	R ₂ =OH
(-)-Epigallocatechingallat	R ₁ =OH	R ₂ =Galloyl

f) Isoflavone

R ₁ =OH	Genistein
R ₂ =H	Daidzein

Abb. 1 Strukturformeln wichtiger Flavonoidaglyka [mod. nach WILLITS et al., 2004, WATZL und RECHKEMMER, 2001] Abkürzungen: Hesp (Hesperetin), ED (Eriodictyol), Ster (Sterubin), HED (Homoeriodictyol)

Wichtige Flavanone und deren Vorkommen

Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol sowie Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz gehören zur Gruppe der Flavanone und unterscheiden sich durch ihre Substituenten am A oder B Ring (siehe Abb. 1 b). Phloretin zählt zu den Dihydrochalkonen, die statt des C-Rings eine offene C-Brücke tragen [EFSA, 2010]. Eriodictyol (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanon) ist das Aglykon von Eriocitrin (Eriodictyol-7-O-Rutinosid) und kommt natürlich vor allem als Glykosid gebunden in der Zitrone vor. Die Menge an Eriocitrin in der Zitronenschale beträgt etwa 30 % [MIYAKE et al., 2006].

Hesperetin (3',5,7-Trihydroxy-4'-Methoxyflavanon), das Aglykon von Hesperidin (Hesperetin-7-O-Rutinosid), ist das häufigste Flavanon in der Orange. Die Konzentration von Hesperidin im Orangensaft liegt zwischen 36 und 528 mg / L [EFSA, 2010].

Phloretin (2',4,4',6'-Tetrahydroxydihydrochalon), das Aglykon von Phlorizin (Phloretin-2'-O-Glukosid), ist hauptsächlich in Äpfeln als Glukosid vorhanden. In der Apfelschale liegt der Gehalt bei etwa 80-420 mg Phlorizin / kg Schale und im Apfelsaft bei 3 bis 223 mg Phlorizin / L. In geringen Mengen ist Phlorizin ebenso in Erdbeeren (2 bis 5 mg / kg Frischobst) enthalten [EFSA, 2010].

Homoeriodictyol (4',5,7-Trihydroxy-3'-Methoxyflavanon) sowie dessen Natriumsalz und Sterubin (3',4',5-Trihydroxy-7-Methoxyflavanon) kommen in der Pflanze Herba Santa (*Eriodictyon californicum* (H.&T.) Torr., *Hydrophyllaceae*) vor. Hesperetin und in geringem Ausmaß auch Eriodictyol, sind ebenfalls in Herba Santa enthalten [LEY et al., 2005]. Die Verbindungen, Eriodictyol, Homoeriodictyol, Homoeriodictyol-Natriumsalz, Sterubin und Phloretin zeigen bittermaskierende Eigenschaften. Hesperetin und Phloretin verstärken darüber hinaus den süßen Geschmack [LEY et al., 2005], [LEY et al., 2010], [LEY et al., 2007].

1.2.1 Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Flavonoide

Um das bioaktive Potential der Flavanone im Organismus zu gewährleisten, ist es wichtig zu wissen, wie diese Verbindungen absorbiert, metabolisiert, verteilt und wieder ausgeschieden werden.

In Früchten kommen Flavanone hauptsächlich als Glykoside vor, in der Pflanze *Herba Santa* jedoch auch als Aglykone [LEY et al., 2005].

Nach oraler Aufnahme kommen Flavonoide zunächst mit dem Speichel in Kontakt. Flavonoidglykoside werden bereits dort in Abhängigkeit der vorhandenen Bakterien und der Aufenthaltsdauer hydrolysiert [KAHLE et al., 2011]. Die im Darm vorhandenen β -Glykosidasen spalten die übrigen Flavonoidglykoside in deren Aglykone und Zuckerreste. Zu dieser Enzymklasse gehört unter anderen die Laktase-Phlorizin-Hydrolase als membranständiges Enzym an der luminalen Seite der intestinalen Mukosa. Primär ist dieses Enzym in seiner Funktion als Laktase für die Spaltung von Milchzucker verantwortlich, trägt aber auch eine aktive Seite, um β -Glykoside zu hydrolysieren [DAY et al., 2000]. Im Kolon leisten β -Glykosidasen der intestinalen Mikrobiota einen großen Beitrag zur Deglykosylierung der Flavonoide [MIYAKE et al., 2006]. Die Absorptionsgeschwindigkeit der Flavonoide wird durch den Zuckerrest beeinträchtigt. So werden Aglykone im Vergleich zu Monosaccharidglykosiden schneller resorbiert. Wiederum gelangen Monosaccharidglykoside früher als Disaccharidglykoside ins Plasma [MIYAKE et al., 2006], [NIELSEN et al., 2006]. Es ist noch nicht geklärt, ob nur Aglykone oder auch Flavonoidglykoside absorbiert werden [EFSA, 2010], [MIYAKE et al., 2006]. Flavonoidaglykone gelangen über passive Diffusion in Enterozyten. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Phlorizin oder Quercetinglukoside über den natriumabhängigen Glukose-Cotransporter SGLT1 in die Zelle gelangen [WALLE und WALLE, 2003], [WATZL und RECHKEMMER, 2001]. Dabei konkurriert der Zuckerteil der Flavonide um die Bindungsstelle am SGLT1 [WIMMER et al., 2007]. In den Enterozyten spalten intrazelluläre β -Glykosidasen Flavanonglykoside in Aglykone, die über Phase II Enzyme mit Glucuronsäure oder Sulfuronsäure konjugiert werden. In dieser Form liegen sie ebenfalls im Plasma vor [MIYAKE et al., 2006]. Eine Verminderung der Bioverfügbarkeit stellen die an der

apikalen und basolateralen Membran der Enterozyten positionierten Adenosin-Triphosphat-(ATP)-bindende-Kassette (ABC) Transporter dar. Diese führen bestimmte Flavanonkonjugate wieder zurück in das Darmlumen [BRAND et al., 2008].

Nach Absorption finden einige Metabolisierungen in der Leber und im Darm statt. Dazu gehören neben Glucuronidierung und Sulfatierung auch De- und Hydroxylierungen oder Methylierungen [EFSA, 2010]. Die ausgeschiedenen Flavanone können über den Enterohepatischen-Kreislauf wieder absorbiert werden. Die vorhandene Mikrobiota im Darm metabolisiert Flavanone, die nicht resorbiert wurden, durch strukturelle Veränderungen, wie Spaltung des C-Ringes, zu Zimtsäure- und Phenolsäurederivaten. Diese Abbauprodukte können wiederum ins Plasma gelangen [EFSA, 2010]. Die Konzentration der Flavanone im Plasma ist dennoch relativ gering. Nach oraler Verabreichung von Eriodictyol (7,67 mg / kg Körpergewicht (KG)) wurden als Plasmametabolite Eriodictyol, Homoeriodictyol und Hesperetin als Glucuron- und Sulfuronkonjugate identifiziert. Die maximale Plasmakonzentration wurde bereits nach einer Stunde gemessen und betrug für Hesperetin sowie Homoeriodictyol weniger als 5 µM und für Eriodictyol zwischen 5 und 10 µM [MIYAKE et al., 2006]. In einer anderen Humanstudie wurde nach oraler Verabreichung von 135 mg Hesperetin (1,95 mg / kg KG) in verkapselter Form eine durchschnittliche maximale Plasmakonzentration von 2,74 µM (825,78 ng / mL) gemessen [KANAZE et al., 2007].

Die Ausscheidung der Flavanone erfolgt über Urin, Galle und Fäzes. Im Urin wurden sowohl Glucuron- und Sulfonsäurekonjugate als auch andere polare Metabolite nachgewiesen. Nach oraler Verabreichung von 1,95 mg Hesperetin / kg KG wurden 3,26 % davon im Urin als Konjugate detektiert [EFSA, 2010], [KANAZE et al., 2007].

1.2.2 Flavonoide und deren Wirkung auf den Lipidstoffwechsel

Epidemiologische Studien zeigen bei älteren Männern eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von Flavonoiden und der Mortalität an koronaren Herzerkrankungen [HERTOG et al., 1993]. In der iranischen Bevölkerung sinkt bei Konsum von flavonoidreichen Lebensmitteln das Risiko, Symptome des metabolischen Syndroms zu entwickeln [SOHRAB et al., 2013].

Epigallocatechingallat (EGCG), das quantitativ wichtigste Flavonoid aus grünem Tee, beeinflusst den Lipidmetabolismus über mehrere Mechanismen *in vitro* sowie *in vivo*. In einer Studie konsumierten normalgewichtige Männer innerhalb 24 Stunden entweder Placebos, 150 mg Koffein oder Grünteeextrakt, der 270 mg Epigallocatechingallat und 150 mg Koffein enthielt. Im Vergleich zum Placebo sank der respiratorische Quotient und der Substratverbrauch veränderte sich in dieser Zeit zugunsten der Lipidoxidation (von 0,88 auf 0,85) in der Grünteeextrakt-Gruppe [DULLOO et al., 1999]. Der respiratorische Quotient liegt je nach oxidierten Substanz zwischen 1,00 (reine Kohlenhydratoxidation) und 0,70 (reine Lipidoxidation) und wird zur Messung veränderter Substratoxidation herangezogen. Ein Absinken des respiratorischen Quotienten weist auf eine Verschiebung der Substratoxidation zugunsten des Fettsäureverbrauchs. So könnte Epigallocatechingallat gemeinsam mit Koffein zu vermehrter Fettoxidation beitragen. Anders als in der Studie von Dulloo et al., 1999 zeigten Boschmann und Thielecke et al., 2007 in einer Pilotstudie mit übergewichtigen Männern, dass der respiratorische Quotient in der postprandialen Phase zwei Tage nach Gabe von 300 mg Epigallocatechingallat pro Tag, im Vergleich zur Placebogruppe von 0,91 auf 0,84 sank [BOSCHMANN und THIELECKE, 2007]. Das Resultat von Boschmann und Thielecke zeigt, dass der Verzehr von Epigallocatechingallat allein die postprandiale Lipidoxidation ebenfalls steigern könnte [BOSCHMANN und THIELECKE, 2007]. In einem Tierversuch mit Mäusen zeigten Friedrich et al. 2012, dass 24 Stunden nach Zugabe von 1 % Epigallocatechingallat (1,67 g/kg Körpergewicht) zu fettreichem Futter, oral verabreichte Lipide vermehrt oxidiert wurden [FRIEDRICH et al. 2012].

Epigallocatechingallat verhindert darüber hinaus die Absorption von Lipiden. So zeigten Cha et al., 2012, dass Epigallocatechingallat ($IC_{50}=1,8 \pm 0,57 \mu M$) die pankreatische Lipase während einer künstlichen Verdauung *in vitro* hemmt [CHA et al., 2012]. In der Studie von Friedrich et al., 2012 wurde die Lipidabsorption nach acht Tagen durch Zugabe von 0,5 % Epigallocatechingallat (0,83 g/kg Körpergewicht) zu fettreichem Futter im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls vermindert. Diese verminderte Absorption äußerte sich durch erhöhte Ausscheidung oral verabreichter Lipide und wirkte sich ebenfalls positiv auf die Triglyzeridkonzentration im Plasma aus. Denn nach viertägiger Verabreichung von 1 % Epigallocatechingallat (1,67 g/kg KG) zu fettreichem Futter sank die Triglyzeridkonzentration im Plasma der Mäuse signifikant zur Kontrollgruppe ohne Epigallocatechingallat. Ein weiterer positiver Effekt der Zugabe von 0,83 g/kg KG Epigallocatechingallat zu fettreichem Futter in der Studie von Friedrich et al., 2012 war eine verringerte Einlagerung von Nahrungslipiden in viszerale Fettgewebe und anderen peripheren Geweben [FRIEDRICH et al., 2012]. Diese Studien zeigen wiederum, dass Epigallocatechingallat über mehrere Mechanismen die Plasmalipide positiv beeinflussen kann.

Neben dem Flavanol Epigallocatechingallat zeigte auch das Flavanon Hesperetin Verbesserungen auf die Blutlipidwerte. In einem Tierversuch an Ratten sanken die Triglyzerid- und Cholesterollevele nach fünfwöchiger Supplementierung mit 0,02 % (5 mg/kg Körpergewicht) Hesperetin zu cholesterolreichen (1 %) Futter. Das *high density lipoprotein* (HDL)-Cholesterol / Gesamt-Cholesterol Verhältnis wurde nach Verabreichung von Hesperetin erhöht, was bedeutet, dass der Rücktransport von Cholesterol und Triglyzeriden aus den peripheren Geweben zur Leber gesteigert wird. Zugleich verringerte sich die Aktivität der hepatischen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), einem Schlüsselenzym bei der Cholesterolsynthese, und der Acyl-Coenzym-A:Cholesterol-Acyltransferase (ACAT), welche Cholesterol oder Fettsäuren verestert. Die Inhibierung dieser Enzyme könnte eine Möglichkeit darstellen, Blutfettwerte zu reduzieren [KIM et al., 2003]. Denn bei verringerter

Menge an Cholesterolester in Hepatozyten oder Enterozyten, wird der Aufbau von Lipoproteinen beeinträchtigt und könnte so die Konzentration an Triglyzeriden im Blut reduzieren [KIM et al., 2003]. In einer Humanstudie wurde der Triglyzeridstatus nach 24-wöchiger oraler Verabreichung von 500 mg α -Glykosylhesperidin (Hesperetin-7-Rutinoglukosid) pro Tag um 34 % in der Hypertriglyzerid-Gruppe reduziert [MIWA et al., 2005]. Die Studien von Kim et al., 2003 und Miwa et al., 2005 zeigen, dass auch das Flavanon Hesperetin den Fettstoffwechsel positiv beeinflussen kann.

1.3 Metabolismus der Fette und Kohlenhydrate

1.3.1 Das Dünndarmepithel

Den Hauptort für die Absorption von Nährstoffen stellt der sechs Meter lange Dünndarm dar, wobei der größte Teil der Nährstoffe im Duodenum und Jejunum absorbiert wird. Durch die Ausbildung von Kerkringfalten und Zotten im Gewebe des Dünndarms und Mikrovilli an den Enterozyten vergrößert sich die Oberfläche für die Stoffaufnahme auf etwa 200 m². In den Krypten befinden sich undifferenzierte pluripotente Stammzellen, die am Weg zur Zottenspitze zu Enterozyten reifen. Sie entwickeln für die Resorption wichtige Enzyme (z.B. Disaccharidasen) und Transportsysteme. Die Lebensdauer der Enterozyten ist auf etwa drei bis fünf Tage begrenzt. Danach werden die Zellen an der Zottenspitze wieder abgestoßen [VAUPEL, 2005].

Die Schleimhaut des Dünndarms besteht aus einer Epithelschicht, einer Bindegewebsschicht, sowie einer dünnen Muskelschicht, wobei in den Zotten nur die beiden erstgenannten Gewebsschichten vorkommen. Die überwiegenden Zellen des Darmepithels stellen die Enterozyten dar, die mit Mikrovilli an der apikalen Membranseite zur Resorption dienen. Weiters kommen mukusbildende Becherzellen, Panethzellen und enteroendokrine Zellen vor. Eine hohe Durchblutung der Schleimhaut sorgt für eine rasche Weiterleitung der resorbierten Stoffe, während der Resorptionsphase [VAUPEL, 2005].

Das Darmepithel benötigt verschiedene Adhäsionskomplexe, um benachbarte Zellen miteinander zu verknüpfen und die Polarität aufrechtzuerhalten. Hierzu dienen sogenannte *tight junctions*, *adherence junctions* und Desmosomen. *Tight junctions* sind apikal an der lateralen Seite des Interstitiums lokalisiert und regulieren den parazellulären Transport. Weiters stellen sie eine Barriere für Proteine und verschiedene Moleküle dar. *Tight junctions* können dennoch Kanäle für Elektrolyte oder Wasser bilden, deren Durchlässigkeit mit Länge des Verdauungskanal in Richtung distal abnimmt [VEREECKE et al., 2011].

1.3.2 Fettstoffwechsel im Verdauungstrakt

Obwohl in der durchschnittlichen österreichischen Kost eines Erwachsenen die tägliche Gesamtenergieaufnahme den Richtwerten entspricht, liegt der Anteil an Lipiden um etwa 6 % über dem empfohlenen Anteil. Darüber hinaus ist der Anteil der ungesättigten Fettsäuren zu niedrig und jener der gesättigten zu hoch [ELMADFA et al., 2012].

Essentielle Fettsäuren spielen im gesamten Stoffwechsel eine wichtige Rolle. Abgesehen von deren Bedeutung als Energiesubstrat, tragen sie als Bestandteil von Plasmamembranen zur Aufrechterhaltung des Zellmilieus und der Membranfluidität bei und dienen als Vorläufer für Gewebshormone. Weiters sind Fettsäuren an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt. Die Transkription bestimmter Proteine sowie posttranslationale Veränderungen kann durch Fettsäuren ebenfalls beeinflusst werden [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007], [SANDOVAL et al., 2008].

Die mit der Nahrung zugeführten Lipide bestehen zu 95 % aus Triglyzeriden, die hauptsächlich aus langkettigen Fettsäuren (über 16 Kohlenstoffatome) bestehen. Der Rest setzt sich aus etwa 4,5 % Phospholipiden (meist Lecithin) und 0,5 % Sterolen (hauptsächlich Cholesterol) zusammen [WANG et al., 2013].

Die Fettverdauung beginnt im Mund mit dem Enzym Zungengrundlipase und setzt sich im Magen durch die gastrische Lipase fort. Beide Enzyme spalten primär mittelkettige Triglyzeride. Im Magen werden Nahrungsfette zu kleinen Lipidtröpfchen (Durchmesser unter 500 nm) emulgiert und an das Duodenum weitergegeben, wo der Nahrungsbrei mit Galle und Pankreassekreten verdünnt wird [WANG et al., 2013]. Die Pankreaslipase ist zusammen mit der Colipase im Wesentlichen für die Fettsplaltung verantwortlich. In Abhängigkeit von Gallensäuren hydrolysiert dieses Enzym Triglyzeride zu Di- bzw. Monoglyceriden und freien Fettsäuren (FFS). Zusätzlich spalten verschiedene Enzyme Fettsäuren von Monoglyceriden, Phospholipiden und Cholesterolestern ab. Dabei werden die Fettpartikel immer kleiner. Ein wichtiger Schritt für den Transport durch das wässrige Lumen des Gastrointestinaltrakts ist die Bildung von Mizellen (Durchmesser zwischen vier und acht nm). Durch die Anwesenheit

von Gallensäuren dispergieren hydrophobe Verbindungen wie Fettsäuren, fettlösliche Vitamine, Acylglyceride und Cholesterol (Ch) gemeinsam mit hydrophilen Substanzen wie Glycerin, Phospholipiden (PL) zu negativ geladenen Mizellen. In dieser Form werden die Lipide bis zwischen die Mikrovilli der Enterozyten transportiert [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007], [WANG et al., 2013].

1.3.3 Intestinale Fettsäureaufnahme

Mizellen erleichtern den Transport durch die *unstirred water layer* und den Mukus an der intestinalen Membran. Diese schaffen eine saure Umgebung, was zur Dissoziation der Mizellen führt. Die Mizellen spalten sich in ihre Komponenten auf und die Substrate werden einzeln resorbiert [NIOT et al., 2009]. Der zellbiologische Aufnahmeprozess von Fettsäuren ist bislang nicht vollständig geklärt. Eine Zusammenfassung der Absorption von Fettsäuren ist in Abbildung 2 vereinfacht dargestellt. Aufgrund des hydrophoben Charakters dürfte der Durchtritt durch die Membran für fettlösliche Verbindungen problemlos funktionieren. Vielmehr erschwert der Weg zur Membran und durch das wässrige Zytosol die Fettsäureaufnahme. Hierfür wurden einige Proteine identifiziert, die diesen Transport erleichtern. In der wissenschaftlichen Literatur werden zwei Transfermöglichkeiten durch die Zellmembran diskutiert: erleichterter Transport mit Proteinen und passive Diffusion [NIOT et al., 2009].

Passive Diffusion

Fettsäuren können entlang des Konzentrationsgradienten durch die amphiphile Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran diffundieren. Der Prozess teilt sich in drei aufeinander folgende Schritte: Zunächst adsorbiert die Fettsäure an die äußere Phospholipid-Doppelschicht. In protonierter Form dreht sich die Fettsäure in einem als „Flipflop“ bezeichneten „Seitenwechsel“ um 180° auf die innere Schicht der Membran. Anschließend gibt die Fettsäure das Proton wieder ab, wodurch sie ins Zellinnere entlassen wird. Die Effizienz des Wechsels wird durch die Krümmung der Zellmembran (an der Mikrovilli), die Ionisierung bzw. Protonierung der Carboxylgruppe (ionisierte Fettsäuren

diffundieren langsamer) und der Sättigung der Fettsäure (ungesättigte Fettsäuren transferieren schneller) beeinflusst. Die Permeabilität durch die Phospholipid-Bilayer von langkettigen Fettsäuren ist größer als die von Wasser, Glukose und anderen kleinen Nichtelektrolyten [HAMILTON, 2007], [NIOT et al., 2009], [SCHWENK et al., 2010].

Eine weitere Möglichkeit, Stoffe zu resorbieren, stellt der parazelluläre Transport dar. Über diesen Mechanismus werden Nährstoffe zwischen den Zellen resorbiert und gelangen über den Interzellularraum ins Blut. Die Proteinkomplexe der *tight junctions* und Desmosomen bilden einen Schlussleistenkomplex, wodurch die Zellen aneinander haften und dabei die Permeabilität und die epitheliale Barrierefunktion regulieren. Diese Permeabilität ist für Moleküle unter 600 kDa begrenzt [MENARD et al., 2010]. Bisher wurden einige Verbindungen identifiziert, die die Barrierefunktion verändern können. Zu diesen zählen unter anderem das Flavanol Quercetin, [AMASHEH et al., 2008], oder bestimmte Peptide und Cyclodextrine [DELI, 2009].

Aktiver Transport

Der aktive Transport ist durch einen Membranübergang entgegen des Konzentrationsgefälles gekennzeichnet und benötigt Energie. Dazu sind bestimmte Carrierproteine nötig, die die Absorption spezifischer Verbindungen ermöglichen. Einige Transportproteine beeinflussen auf diese Weise die Fettsäureaufnahme. Nach ihrer Lokalisation werden diese Transporter in membrangebundene oder -assoziierte und zytosolische Proteine eingeteilt. Zu ersteren gehören CD36 (*cluster of differentiation* 36 oder Fettsäuretranslokase, FAT), Plasmamembran-gebundene-Fettsäure-Bindungsproteine (FABP_{pm}) und Caveoline. Zur Gruppe der zytosolischen Proteine zählen die intrazellulären FABP (FABP_c) und die Familie der Fettsäure-Transportproteine (FATP 1-6) [WANG et al., 2005], [SCHWENK et al., 2010].

Derzeit sind mehrere Theorien über den Mechanismus der Fettsäureaufnahme über Fettsäuretransporter bekannt:

- a) Die Proteine gelten als Sensoren für Fettsäuren (CD36 und/oder FABP_{pm}) und Fettsäuren diffundieren anschließend ohne deren Hilfe durch erleichterte Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle. Auf der inneren Domäne der Transmembranproteine können z.B. zytosolische FABP für den Transport durch das Zytosol oder Enzyme, wie die Acyl-CoA Synthetase gebunden sein [SCHWENK et al., 2010], [WANG et al., 2013].
- b) Die Fettsäuretransporter (FATP und / oder CD36) führen Fettsäuren aktiv durch die Membran [SCHWENK et al., 2010].

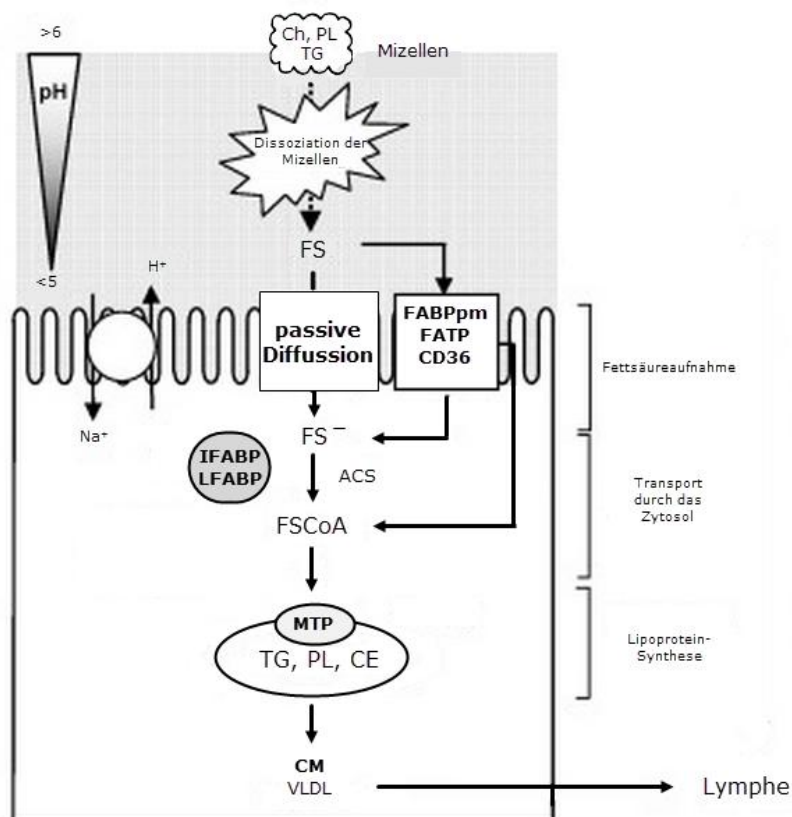


Abb. 2 Absorption der Fettsäuren in Enterozyten [mod. nach NIOT et al., 2009]

Mizellen dissoziieren in saurer Umgebung und FS gelangen durch passive Diffusion oder aktiv über Fettsäuretransporter in die Enterozyten. Für den Transport durch das Zellinnere binden FS an I-FABP oder L-FABP. ACS aktivieren FS bevor sie zu TG resynthetisiert werden. Vor der Abgabe an die Lymphe werden FSCoA gemeinsam mit TG, PL und CE mithilfe bestimmter Proteine (u.a. MTP) zu Chylomikronen oder VLDL verpackt. Einzelheiten siehe Text.

Abkürzungen: ACS (Acyl-Coenzym A Synthetasen), CE (Cholesterolester), Ch (Cholesterol), FABP_{pm} (plasmamembranständiges Fettsäure-Bindungsprotein), I- bzw. L-FABP (Dünndarm- bzw. Leber-FABP) FAT/CD36 (Fettsäuretranslokase / cluster of differentiation 36), FATP (Fettsäure-Transportproteine), FS (Fettsäuren), FSCoA (aktivierte Fettsäure), MTP (mikrosomales Triglycerid-Transferprotein), PL (Phospholipid), VLDL (very low density lipoprotein)

CD36 / Fettsäuretranslokase

Die Fettsäuretranslokase (FAT) wurde erstmals in Adipozyten der Ratte identifiziert und ist homolog zum humanen *Cluster of differentiation* (CD) 36.

CD36 ist ein 88 kDa großes Glykoprotein, das einer rezeptorähnlichen Struktur gleicht und mindestens zwei verschiedene Bindungsstellen enthält. Als Mitglied der Scavenger-Rezeptoren Klasse B bindet es nicht nur oxidiertes *low density lipoprotein* (oxLDL) sondern mit hoher Affinität auch langkettige Fettsäuren [MARTIN et al., 2011].

In Säugetieren kommt CD36 vor allem in Adipozyten, Skelett- und Herzmuskelzellen und Enterozyten vor [STAHL et al., 1999]. Es ist an der apikalen und basolateralen Membran gebunden und in intrazellulären Vesikeln, wie den Liposomen [MARTIN et al., 2011] oder im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat lokalisiert [PERETTI et al., 2007]. Die Translokation von CD36 aus den intrazellulären Kompartimenten zur Membran steigert die Fettsäureaufnahme in Muskelzellen [SCHWENK et al., 2010]. Da das Protein eine hohe Affinität zu hydrophoben Substanzen zeigt, ist es naheliegend, dass CD36 eine Rolle bei der Fettsäureaufnahme spielt. Der genaue Mechanismus ist derzeit nicht ausreichend geklärt. Während Sandoval et al., 2008 geringe Expressionen des *CD36* Gens in Caco-2 Enterozyten zeigten [SANDOVAL et al., 2008], wurde das selbe Gen in einer neueren Arbeit von Riedel et al., 2014 in Caco-2 Zellen höher exprimiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch verschiedene Differenzierungsbedingungen verursacht worden sein [RIEDEL et al., 2014]. Poirier et al., 1996 zeigten hohe Expressionen von CD36 in Enterozyten aus Jejunum [POIRIER et al., 1996]. Dieser Darmabschnitt gilt als Hauptort der Fettabsorption. CD36 ist vermehrt in den Darmzotten und kaum in den Krypten exprimiert. Weiters wurde in einem Tierversuch an Ratten erkannt, dass die Expression von CD36 im Dünndarm stieg, wenn der Fettgehalt der Nahrung erhöht wurde [POIRIER et al., 1996]. CD36 könnte bei der intestinalen Lipoproteinproduktion in Enterozyten ebenfalls eine Rolle spielen. Denn in der Darmmukosa von CD36–Knockout (KO)-Mäusen war die Synthese von Triglyzeriden aus Fettsäuren aus der Nahrung, sowie die Sekretion von Lipiden in die Lymphe vermindert [DROVER et al.,

2005]. Darüber hinaus war die Fettsäure- und Cholesterolaufnahme in isolierten Enterozyten aus CD36-KO-Mäusen im Vergleich zu nicht-genveränderten Mäusen um 50 % bzw. 60 % reduziert [NASSIR et al., 2007].

Bekannte Polymorphismen am humanen *CD36* Gen (Typ-I-Defizit) betreffen Thrombozyten und Monozyten und gehen mit postprandialer Hyperlipidämie, erhöhten Werten von Apolipoprotein B48, Chylomikronen und geringeren nüchtern HDL-Cholesterol-Werten einher. Ebenso stellen sich höhere Plasmaglukosewerte und leicht erhöhter Blutdruck ein. So könnte ein *CD36* Defizit einen möglichen Risikofaktor für die Entstehung des metabolischen Syndroms darstellen [YAMASHITA et al., 2007].

Fettsäure-Bindungsproteine

Fettsäure-Bindungsproteine (FABP) gehören zur Multigenfamilie der intrazellulären Lipid-Bindungsproteine mit mehr als 20 Mitgliedern (Retinol-Bindungsproteine und zelluläre Retinsäure-Bindungsproteine). Sie wurden 1972 erstmals in stoffwechselaktiven Geweben, wie der Darmmukosa oder der Leber identifiziert [OCKNER et al., 1972].

In Säugetieren wurden neun verschiedene *FABP* kodierende Gene entdeckt. Die Verteilung der FABP ist gewebespezifisch, daher erfolgt die Einteilung der einzelnen Proteine nach ihrem Vorkommen bzw. ihrer ersten Entdeckung. So gibt es u.a. Leber- (LFABP, FABP-1), Dünndarm- (IFABP, FABP-2), Herz- (HFABP, FABP-3) oder Adipozyten- (AFABP, FABP-4) Subtypen. Diese Proteine weisen untereinander eine ähnliche Faltung auf und ihre Größe beträgt etwa 14-15 kDa [STORCH und THUMSER, 2010].

Die exakte Rolle der FABP bei der zellulären Fettsäureaufnahme ist noch nicht klar dargelegt. Jedoch haben die Proteine innerhalb der Zelle viele Aufgaben. Aufgenommene Fettsäuren binden intrazellulär an FABP [NIOT et al., 2009]. Hauptsächlich verknüpfen sich FABP mit einer langkettigen, ungesättigten Fettsäure, während LFABP zwei Fettsäuren gleichzeitig oder andere hydrophobe Moleküle transportieren kann [STORCH und THUMSER, 2010]. IFABP ist in der Lage, auch lipophile Medikamente (wie z.B. verschiedene Fibrate), zu binden [VELKOV, 2009].

Allgemein stellen FABPs intrazelluläre Transporter für Fettsäuren dar. FABP transferieren Fettsäuren zu Mitochondrien oder Liposomen. In Mitochondrien werden Fettsäuren oxidiert und in den Liposomen gespeichert. Einige Vertreter der FABPs können ihre Liganden bis in den Zellkern zu Transkriptionsfaktoren bringen. Auf diese Weise verfügen diese Transporter über regulatorische Eigenschaften für lipidresponsive Gene [STORCH und THUMSER, 2010], [FALOMIR-LOCKHART et al., 2011].

Enterozyten exprimieren IFABP und LFABP, eine Eigenschaft die speziell diese Zellen aufweisen. Im distalen Dünndarm wird zusätzlich das Gallensäure-Bindungsprotein (ILFABP, FABP-6) ausgeprägt [STORCH und THUMSER, 2010]. FABPs sind im Dünndarm ähnlich verteilt wie CD36. So zeigten Poirer et al., 1996, dass nach Verabreichung von fettreichem Futter vermehrt IFABP und LFABP in der Mukosa des Duodenums von Ratten exprimiert wurden [POIRIER et al., 1996].

Zu den Aufgaben von LFABP in Enterozyten zählen: Transfer von Fettsäuren aus der Nahrung und dem Blutkreislauf in Richtung β -Oxidation, Einbau von Monoacylglyceriden in Triglyzeride und Beteiligung an der Synthese und Freisetzung von Prächylomikronen aus dem endoplasmatischen Retikulum [STORCH und THUMSER, 2010], [LAGAKOS et al., 2011].

IFABP steuert hingegen die Verarbeitung von Fettsäuren aus dem Darmlumen zur Veresterung in Triglyzeride. Bei Verlust des *IFABP* Gens wurden Fettsäuren vermehrt in Phospholipide verestert. Durch die Ausschaltung von *IFABP* stieg die Expression von *CD36* in der intestinalen Mukosa, was durch einen kompensatorischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Fettsäureaufnahme ausgelöst worden sein könnte [LAGAKOS et al., 2011].

Fettsäure-Transportproteine

Die Fettsäure-Transportproteine (*fatty acid transport protein*, FATP), sind eine Proteinfamilie, die aus sechs Mitgliedern besteht. Ursprünglich in Adipozyten der Maus identifiziert, sind sie sowohl bei Säugetieren als auch bei Invertebraten weit verbreitet [SANDOVAL et al., 2008]. FATP werden in Geweben mit hohem Fettsäurestoffwechsel wie Fettgewebe, Leber, Herz und

Dünndarm exprimiert und sind an der zellulären Fettsäureaufnahme beteiligt [STAHL et al., 1999]. Die einzelnen Mitglieder unterscheiden sich durch ihre Expressionsmuster, Verteilung und intrazelluläre Lokalisation [BLACK et al., 2009]. Sie weisen eine Fettsäure-Bindungsdomäne und ATP-Bindungsdomäne auf, eine Eigenschaft die jener von Acyl-Coenzym A Synthetasen (ACS) ähnlich ist [BLACK et al., 2009]. Zurzeit steht zur Diskussion, ob FATP alleine, oder über vektorielle Acylierung die Fettsäureaufnahme fördern. Die vektorielle Acylierung verbindet den Transport der Fettsäuren durch die Plasmamembran mit deren Aktivierung. Aktivierte Fettsäuren (Acyl-CoA oder FS-CoA) werden anschließend entweder in Lipide eingebaut oder in der β -Oxidation in Energie umgewandelt [BLACK et al., 2009]. Tabelle 2 gibt die Mitglieder der FATP-Familie, deren Verteilung und ACS Aktivität wider.

Tab. 2 Gewebeverteilung der Fettsäure-Transportproteine [mod. nach BLACK et al., 2009, SANDOVAL et al., 2008, KAZANTZIS und STAHL, 2012] Abkürzungen: FATP (Fettsäure-Bindungsproteine, ACS (Acyl-Coenzym A Synthetasen)

FATP-Typ	ACS-Aktivität	FATP Vorkommen im Gewebe
FATP1	+	Muskel, Fettgewebe, Herz, Hirn
FATP2	+	Leber, Niere, Dünndarm
FATP3	-	Leber, Testes, Lunge, Pankreas, Endothelzellen
FATP4	+	Herz, Leber, Gehirn, Nieren, Haut, Endothelzellen, Dünndarm
FATP5	-	Leber
FATP6	+	Herz

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, zählen zu den intestinalen FATP die Typen FATP2 und FATP4. FATP2 wurde als ACS nachgewiesen und aktiviert hauptsächlich langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Innerhalb der Zelle ist FATP2 in den Mitochondrien, Peroxisomen und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. FATP2 ist dafür verantwortlich, langkettige Fettsäuren in die Zellen zu transportieren und in Phospholipide zu verestern [MELTON et al., 2013]. So könnte FATP2 verhindern, dass Fettsäuren direkt an die Lymphe

abgegeben werden. Jedoch wurde die Studie von Melton et al., 2013 mit Nierenzellen (HEK293) durchgeführt und benötigt eine Validierung in intestinalen Zellen.

In verschiedenen Zelllinien (u.a. auch Caco-2 Enterozyten) wurde gezeigt, dass FATP4 im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und nicht direkt am Transport von Fettsäuren durch die Membranen beteiligt ist. Vielmehr reguliert FATP4 den Fettsäuretransport über die Acyl-CoA Synthetase-Aktivität [MILGER et al., 2006]. Dagegen zeigten Stahl et al., 1999, dass FATP4 an der apikalen Seite von reifen Enterozyten im Dünndarm, vor allem im Jejunum, exprimiert wird. FATP4 gilt als der überwiegende Transporter für langkettige Fettsäuren im Dünndarm [STAHL et al., 1999]. Neuere Studien zeigen, dass FATP2 in Caco-2 Enterozyten auf genetischer und Proteinebene vermehrt vorhanden ist [SANDOVAL et al., 2008]. *In vitro* Studien demonstrierten, dass die Expression von FATP4 direkt proportional zur zellulären Fettsäureaufnahme einhergeht [STAHL et al., 1999]. Tierversuche zeigten, dass FATP4-KO-Mäuse, im Vergleich zu nicht-gentechnisch veränderten Mäusen, Fettsäuren und Cholesterol gleichermaßen resorbieren. Der Lipid- und Fettsäuregehalt in Enterozyten dieser FATP4-KO-Mäuse stieg nach fettreicher Nahrung dagegen an [SHIM et al., 2009]. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass FATP4 an der Weiterverarbeitung von Fettsäuren zu Triglyzeriden involviert sein könnte. Weiters zeigten Milger et al., 2006, dass FATP4 am endoplasmatischen Retikulum exprimiert wurde, wo die Veresterung zu Triglyzeriden stattfindet. Über die ACS-Aktivität von FATP4 könnte der Transporter Fettsäuren aktivieren und in die Triglyzeridsynthese einschleusen [MILGER et al., 2006].

Caveolin-1 ist ein weiteres Protein, das sich an der Resorption von Fettsäuren in Enterozyten beteiligt [SIDDIQI et al., 2013]. Als Bestandteil von Caveolae in *lipid rafts* (Cholesterol-Sphingomyelin reiche Abschnitte von Zellmembranen), bindet Caveolin-1 Fettsäuren und fördert so deren zelluläre Aufnahme. Andere Proteine, wie CD36, die an der Fettsäureaufnahme involviert sind, befinden sich ebenfalls in den Caveolae. Die genaue Rolle von Caveolin-1 bei der intestinalen Fettsäureaufnahme ist noch nicht geklärt, es ist aber möglich, dass es in

Kombination mit anderen Fettsäuretransportern die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle über Endozytose fördert. Dieser Aufnahmemechanismus stellt ebenso eine Alternative zu FABP als Transportmittel durch das Zytosol dar [SIDDIQI et al., 2013].

Der Sterol-Transporter NPC1L1 an der apikalen Membran gewährleistet nicht nur die Aufnahme von Cholesterol über Endozytose, sondern fügt über diesen Weg ebenso gesättigte Fettsäuren in die Zelle ein [LABONTE et al., 2008].

Die Transkription der Gene dieser Proteine wird hauptsächlich durch interne Signale vermittelt, dabei spielen die nuklearen Rezeptoren Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPAR) eine wichtige Rolle.

Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptoren

PPARs gehören zu den nuklearen Rezeptoren oder liganden-aktivierten Rezeptoren. Diese sind Transkriptionsfaktoren, die 1) durch spezielle Liganden aktiviert werden und 2) an der Desoxyribonukleinsäure (DNA) an spezifische *response elements* in der Promotorregion der Zielgene binden und so deren Expression regulieren [DESVERGNE et al., 2006].

PPARs werden mit geringer Affinität von Lipiden aktiviert und regulieren die Expression einiger Gene im Fett- und Glukosestoffwechsel. PPARs werden in die Subtypen PPAR α , PPAR β und PPAR γ eingeteilt. Von Letzteren sind zwei Isoformen, PPAR γ 1 und PPAR γ 2, bekannt [DESVERGNE et al., 2006].

Wirkmechanismus

PPARs weisen vereinfacht eine N-terminale Region (enthält die Transaktivierungsdomäne), eine DNA-, sowie eine Liganden- bindenden Domäne und ein C-terminales Ende auf. Die DNA-bindende Domäne enthält zwei Zinkfinger, die für nukleare Rezeptoren typisch sind [DESVERGNE et al., 2006].

PPARs gehen mit den Retinoidrezeptor X (RXR) einen heterodimeren Komplex ein. Dieser ist an spezifische Regionen, den Peroxisom Proliferator *response elements* (PPRE), an der Promotorregion der Zielgene gebunden. *Response*

elements sind durch eine spezifische Basensequenz gekennzeichnet. Binden Liganden an PPARs, rekrutieren diese in weiterer Folge Cofaktor-Proteine. Cofaktor-Proteine sind vom Isotyp abhängig und lösen die Transkription der Zielgene aus [DESVERGNE et al., 2006].

Als Liganden binden vor allem ungesättigte Fettsäuren und einige Eicosanoide aus dem Arachidonsäure- und Linolsäure-Stoffwechselweg an PPARs. Zu den wichtigsten Gruppen der synthetischen PPARs-Liganden zählen Fibrate, die an PPAR α binden und Thiazolidinedione, die PPAR γ aktivieren [WANG et al., 2013].

Verteilung von PPARs in den Geweben und deren Wirkung

PPAR α wurde als erstes PPARs-Mitglied im Jahr 1990 entdeckt [ISSEMAN und GREEN, 1990]. Es kommt vor allem in Zellen vor, in denen vermehrt β -Oxidation stattfindet. Dazu gehören u.a. Hepatozyten, Enterozyten und Muskelzellen. Aktiviertes PPAR α stimuliert die Expression der Fettsäuretransporter FATP und CD36 im Darm. Gleichzeitig wird durch Aktivierung einiger Gene die Fettsäureoxidation gefördert und die Inkorporation von Fettsäuren in Lipoproteine vermindert [DESVERGNE et al., 2006]. Die Aktivierung von PPAR α in Enterozyten verringerte die Cholesterolveresterung durch verminderte Expression von ACAT2 [COLIN et al., 2013]. Die Veresterung von Cholesterol mit Fettsäuren ist für deren Transport in Enterozyten wichtig. Daher könnte eine Inhibierung von ACAT2 die Cholesterol- und Fettsäureresorption verringern [WANG, 2013]. Andererseits reguliert PPAR α die Transkription von *Apolipoprotein A1* und *A2*. Diese Proteine werden für die Bildung und Sekretion des *high density Lipoproteins* (HDL) benötigt [COLIN et al., 2013], [SHAH et al., 2010], was dazu beitragen kann, überschüssiges Cholesterol und Triglyzeride aus den peripheren Geweben zur Leber zu bringen. Darüber hinaus reguliert PPAR α die Expression der Lipoproteinlipase in der Leber und induziert dadurch den Abbau von VLDL aus dem Blut. Auf diese Weise könnte eine Aktivierung von PPAR α dazu beitragen, erhöhte Blutlipide zu reduzieren [SHAH et al., 2010], [KIMURA et al., 2011], [WANG et al., 2005].

Das *PPAR γ* Gen kodiert für beide *PPAR γ* Isoformen, jedoch verteilen sie sich in unterschiedlichen Geweben. *PPAR γ 1* wird vor allem im Fettgewebe exprimiert, ist aber auch in Darm, Milz und Skelettmuskeln vorhanden, während *PPAR γ 2* nur im weißen und braunen Fettgewebe exprimiert wird. Die Zielgene der Isoformen sind dieselben. Zu den wichtigsten Aufgaben von *PPAR γ* gehören die Transkription von Genen, die an der Aufrechterhaltung der Glukose- und Lipidhomöostase beteiligt sind. *PPAR γ* induziert die Differenzierung zu Adipozyten und löst die Transkription von Proteinen aus, die an der Lipidaufnahme in verschiedenen Zellen beteiligt sind. Dazu gehören FABP, ACS, CD36 oder die Lipoproteinlipase [DESVERGNE et al., 2006]. In Adipozyten spielt *PPAR γ* eine Rolle bei der Expression der Glukosetransporter GLUT 1 und 4 [NUGENT et al., 2001]. In dieser Weise verbessert der nukleare Rezeptor die Insulinsensitivität und die Blutfettwerte, indem mehr Fettsäuren und Glukose aus dem Blut von peripheren Zellen aufgenommen werden [HUANG et al., 2005].

1.3.4 Fettstoffwechsel in den Enterozyten

In Enterozyten werden Triglyzeride gemeinsam mit anderen Lipiden, fettlöslichen Vitaminen und Apolipoproteinen zu Chylomikronen verpackt und in die Lymphe abgegeben [WANG et al., 2013]. Dieser Vorgang findet im rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat statt. Die wichtigsten Schritte werden kurz erläutert.

Die Enterozyten nehmen sowohl apikal als auch basolateral Fettsäuren auf. Einerseits werden freie Fettsäuren aus dem Blutkreislauf in diesen Zellen zu Phospholipiden eingebaut oder oxidiert, andererseits werden resorbierte Fettsäuren und Monogylzeride aus dem Darmlumen zu Triglyzeriden verestert. [PERETTI et al., 2007], [LAGAKOS et al., 2011]. Zunächst erfolgt die Veresterung von Fettsäuren mit Monoglycerid zu Diglycerid. Die Acyl-CoA-Diglycerid-Acyltransferasen (DGAT) 1 und 2 sind für die finale Veresterung zu Triglyzeriden verantwortlich. Bei Abwesenheit von Monoglyceriden erfolgt die Formierung der Triglyzeride über den α -Glycerolphosphat-Weg: Die

Glycerokinase phosphoryliert Glycerin zu α -Glycerolphosphat oder es wird aus einem Metabolit der Glykolyse, Dihydroxyaceton, synthetisiert [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007]. Nach dessen Acylierung entsteht zunächst Phosphatidsäure. Über Hydrolasen können daraus wieder Diglyzeride entstehen [WANG et al., 2013]. Das mikrosomale Triglyzerid-Transferprotein (MTP) transferiert neutrale Lipide (Triglyzeride, Cholesterolester (CE) und Phospholipide) durch die Membran des glatten und rauen endoplasmatischen Retikulums (siehe Abb. 2). Das MTP ist essentiell für die Formierung von Apolipoproteinen, indem es unter anderem Lipide mit Apolipoprotein B48 verbindet [NIOT et al., 2009]. Die Prächylomikronen Transfer Vehikel (PCTV) bringen Prächylomikronen zum Golgi-Apparat und involvieren das Leber-Fettsäure-Bindungsprotein (LFABP). Im Golgi-Apparat reifen Chylomikronen durch zahlreiche posttranslationale Veränderungen heran. Enterozyten sezernieren neben Chylomikronen ebenso die Lipoproteine *very low density lipoprotein* (VLDL) und geringe Mengen HDL [NIOT et al., 2009]. Bei einem Überangebot an Triglyzeriden werden diese in Lipidtröpfchen im Zytosol gespeichert. Hydrolytische Enzyme können diese wieder freisetzen. Fettsäuren verlassen die Zelle und gelangen direkt ins Blut [NIOT et al., 2009].

1.4 Intestinale Glukoseaufnahme

Vor der Resorption müssen die mit der Nahrung zugeführten komplexen Kohlenhydrate vorerst in kleinere Einheiten abgebaut werden. Polysaccharide (z.B. Stärke, Glykogen) werden durch α -Amylasen aus dem Speichel und Pankreas in niedermolekulare Kohlenhydrate gespalten. Spezifische membranständige Disaccharidasen an den Mikrovilli der Enterozyten hydrolysieren verbliebene Poly-, Oligo- oder Disaccharide zu resorbierfähigen Monosacchariden (Glukose, Fruktose, Galaktose) [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007]. Glukose kann die Lipiddoppelschicht nicht alleine passieren, daher ist ein protein-vermittelter Transport nötig. Im Prinzip gibt es den sekundär aktiven, natriumabhängigen Glukose Cotransporter (sodium dependent glucose transporter, SGLT) und spezifische Glukosetransporter (GLUT), die als Carrier zur erleichterten Diffusion dienen [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007]. Die GLUT

Enzymfamilie zählt im gesamten Säugetierorganismus zu den wichtigsten zellulären Transportern von Monosacchariden. Es gibt derzeit etwa 13 Unterklassen mit unterschiedlichen Affinitäten zu verschiedenen Einfachzuckern mit gewebespezifischer Verteilung [CURA und CARRUTHERS, 2012].

An der apikalen Seite der Enterozyten transportiert SGLT1 Glukose gleichzeitig mit zwei Molekülen Natrium sekundär aktiv entlang des Natrium-Gradienten in die Zelle. Eine niedrige intrazelluläre Natriumkonzentration treibt das Enzym an und bleibt durch die basolaterale Natrium / Kalium-ATPase aufrechterhalten. Wenn die Glukosekonzentration im Lumen geringer ist als im Blut, kann SGLT1 Glukose entgegen des Konzentrationsgradienten transportieren, wodurch Glukose intrazellulär akkumulieren kann [KELLETT et al., 2008].

Laut aktuellem Wissensstand ist SGLT1 bei hoher luminaler Glukosekonzentration (über 30 mM) gesättigt und fördert sodann die Translokation von GLUT 2 aus zellulären Vesikeln an die apikale Membran [KELLETT et al., 2008]. Überdies ist GLUT 2 an der basolateralen Membranseite für den Export von Glukose aus der Zelle in die Zirkulation verantwortlich [KELLETT et al., 2008]. Insulinresistenz und andere nahrungsinduzierte Komponenten, wie künstliche Süßstoffe, tragen zu einer permanenten Positionierung von GLUT 2 an der apikalen Membran bei [KELLETT et al., 2008]. Süßstoffe sind Zusatzstoffe, die dazu dienen, Saccharose bei Aufrechterhaltung des süßen Geschmacks aus Lebensmitteln teilweise zu ersetzen [KELLETT et al., 2008]. In den letzten Jahren wurde bekannt, dass Enterozyten ebenfalls Komponenten der Geschmacksrezeptoren (T1R2 + T1R3), die den süßen Geschmack auslösen, besitzen [MACE et al., 2007]. Süßstoffe und Einfachzucker binden an diese Geschmacksrezeptoren und können dadurch die Expression von GLUT 2 an der apikalen Membran auch bei geringeren Glukosekonzentrationen (20 mM) fördern. Über diesen Mechanismus steigt die Glukoseresorption ebenfalls durch kalorienfreie Süßstoffe, wie Sucralose [MACE et al., 2007].

1.5 Das Fettgewebe und die periphere Fettsäureaufnahme

Das Fettgewebe wird über den gesamten Körper verteilt, so sind Adipozyten im subkutanen Bindegewebe als Hauptbestandteil vorhanden. Als viszerales Fett oder Baufett umgibt es Organe und kleidet Körperhöhlen aus. Neben den Hauptaufgaben als Depot für Energiereserven, Wärmeisolierung und mechanischen Schutz in Nervenbahnen und Muskelbändern, hat das Fettgewebe derzeit vielmehr die Funktion eines endokrinen Organs [COELHO et al., 2013]. Das Fettgewebe synthetisiert und sezerniert Hormone und andere bioaktive Substanzen, wie Entzündungsmarker und spielt auf diese Weise im Organismus eine regulierende Rolle auf den Metabolismus. So kontrolliert das Fettgewebshormon Leptin Hunger und Sättigung, indem es das Gehirn über den Füllungsstatus des Fettgewebes informiert. Wiederum spielen Entzündungsmarker, die ebenfalls vom Fettgewebe in großen Mengen sezerniert werden, wie *Tumor nekrosis factor α* oder andere Adipokine, eine Rolle bei der Entstehung des metabolischen Syndroms [COELHO et al., 2013]. Lipide werden auf deren Weg durch den Körper in Form von Lipoproteinen (Chylomikronen, VLDL, u.a.) transportiert. Fettsäuren werden an Albumin gebunden durch das Blut befördert. Lipoproteine werden von Adipozyten nicht internalisiert, daher ist es nötig Lipoproteine zu dissoziieren, um die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen zu ermöglichen. Die Lipoproteinlipase der Adipozyten gelangt bis in die Kapillaren, wo sie Triglyzeride von Chylomikronen und VLDL hydrolisieren. [THOMPSON et al., 2010]. Der Mechanismus des Transports von Fettsäuren durch die Membran erfolgt, wie in den intestinalen Zellen, durch passive Diffusion und einem protein-vermittelten Prozess. Zu den Fettsäuretransportern zählen FABP_{pm}, CD36, Caveolin-1 und FATP 4 und -1, sowie die assoziierte ACS 1 [THOMPSON et al., 2010].

Im Fettgewebe finden sämtliche Lipidstoffwechselwege statt. Hierzu gehören die anabolen Prozesse wie Lipogenese (Denovo-Fettsäuresynthese und Triglyzeridsynthese) und der Fettsäureabbau in der Lipolyse und β -Oxidation [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007]. In den Adipozyten überwiegt die Triglyzeridsynthese. In diesem Prozess werden, zur Speicherung von Energie, Triglyzeride verestert und in Lipidtröpfchen gespeichert. Der Aufbau der

Triglyzeride erfolgt in ähnlicher Weise, wie in Enterozyten unter Regulation verschiedener Enzyme (siehe Kap.1.3.4). Für die Triglyzeridsynthese benötigt das Fettgewebe α -Glycerolphosphat. Das Enzym Glycerokinase, um Glycerol aus der Lipolyse zu verwerten, fehlt jedoch in den Adipozyten. Daher ist die Triglyzeridsynthese auf Glukose angewiesen. Aus Glykolysemetaboliten oder über Glukoneogenese kann α -Glycerolphosphat aufgebaut werden [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007].

2 PROBLEMSTELLUNG

Hypertriglyzeridämie, abdominelle Adipositas und Insulinresistenz stellen unter anderem Parameter für das metabolische Syndrom dar. Diese Fettstoffwechselstörung erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten. Die Aufrechterhaltung einer normalen Triglyzeridkonzentration im Plasma könnte dazu beitragen, dieses Krankheitsbild zu vermeiden [MASCA et al., 2011].

Gelangen weniger Nahrungsfette nach intestinaler Absorption in das Blut, sinkt die Menge der Triglyzeride im Plasma und das Lipidprofil kann dadurch verbessert werden. Eine andere Möglichkeit, Triglyzeride im Plasma zu reduzieren, stellt eine vermehrte Aufnahme von Lipiden in periphere Zellen dar. Ergebnisse aus Tier- und Humanstudien weisen darauf hin, dass sich die Aufnahme von Flavonoiden über mehrere Mechanismen positiv auf die Blutlipide auswirken kann. Wie in Kapitel 1.2.2 detaillierter beschrieben, führte in einem Tierversuch die Verabreichung von 1,67 g Epigallocatechingallat / kg Körpergewicht zusätzlich zu fettreichem Futter nach 24 Stunden zu einer Steigerung der Lipidoxidation. Nach achttägiger Aufnahme von 0,83 g Epigallocatechingallat / kg Körpergewicht gemeinsam mit fettreichem Futter verringerte sich die Absorption von Nahrungsfett und der Gehalt an Nahrungslipiden im Blut ebenfalls [FRIEDRICH et al., 2012].

Aufgrund der Ergebnisse von Friedrich et al., 2012 sollte in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, ob die zu Epigallocatechingallat strukturell verwandten Flavanone die Blutlipide reduzieren können. Eine Möglichkeit den Fettgehalt im Blut zu senken, stellt ein verminderter Transport von Fettsäuren aus der Nahrung in Enterozyten dar und wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht. Über den Einfluss von Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in intestinalen und peripheren Zellen ist in der wissenschaftlichen Literatur noch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, aus einer Reihe von natürlichen Flavanonen mögliche Verbindungen zu identifizieren, die die intestinale Fettsäureaufnahme verringern könnten. In weiterer Hinsicht sollte ein Substanzvergleich Auskunft darüber geben, welche strukturellen Faktoren hierfür verantwortlich sind. Dazu

wurden fünf Flavanonaglykone (Hesperetin, Eriodictyol, Sterubin und Homoeriodictyol), wobei eins davon ein Flavanonsalz (Homoeriodictyol-Natriumsalz) darstellte, und ein Dihydrochalkon (Phloretin) hinsichtlich deren Wirkung auf die Fettsäureaufnahme in Enterozyten *in vitro* untersucht. Diese Verbindungen wurden ebenfalls auf eine Veränderung der intestinalen Glukoseaufnahme getestet, sodass erkannt wird, ob die Absorption anderer Nährstoffe verändert wurde. Um zu erforschen, welcher molekularer Mechanismus der intestinalen Fettsäureaufnahme beeinflusst wurde, wurden die einflussreichsten Verbindungen aus dem Substanzvergleich auf das Genexpressionslevel bestimmter Fettsäuretransporter analysiert. In weiterer Folge wurde die Wirkung der Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in Adipozyten getestet. Eine gesteigerte Fettsäureaufnahme in periphere Zellen, wie den Fettzellen, trägt dazu bei, Lipide schneller aus dem Blut zu entfernen. Dieser Ansatz würde einen zweiten Mechanismus darlegen, wie Flavanone den Gehalt der Blutlipide verringern könnten. Für diese Untersuchungen wurden die etablierten Zellmodelle Caco-2 als Enterozyten und 3T3-L1 als *in vitro* Modell für Adipozyten verwendet.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

Chemikalien	Hersteller
2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)	Life Technologies
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma Aldrich
Dexamethason	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,5 %	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich
Eriodictyol	Symrise AG
Ethanol 96 %, vergällt	Carl Roth
Ethanol, unvergällt	VWR
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
Fettsäurefreies Rinderserumalbumin	Sigma Aldrich
Formaldehyd, 36 %	Sigma Aldrich
Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich
Hepes Puffer	Sigma Aldrich
Hesperetin	Symrise AG
Homoeriodictyol	Symrise AG
Homoeriodictyol-Natriumsalz	Symrise AG
Humanes Insulin, steril, 100 mg/dl	Sigma Aldrich
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich
Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep)	Sigma Aldrich
Phloretin	Symrise AG
Sterubin (Reinheit 93,2 %)	Symrise AG
Thiazolyl Blue Tetrazolium (MTT Formazan)	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung, 0,5 g Trypsin (Schwein) und 0,2 g EDTA/L	Sigma Aldrich

Kit	Hersteller
Fast SYBR [®] Green Mastermix	Applied Biosystems
QBT Fatty Acid Uptake Assay Kit	Molecular Devices, QBT
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
PeqGoldTotal RNA Kit	Peqlab

Verbrauchsmaterial	Hersteller
3T3-L1 Zellen	ATCC (American Type Culture Collection)
Caco-2 Zellen	ATCC
Einmalinjektionskanülen	Braun
Einmalspritzen (2 mL, 5 mL, 10 mL)	Braun
Reaktionsgefäße RNase frei, 1,5 mL	Starlab
Falcon Tube (15mL, 50mL)	Starlab
Kryoröhrchen mit Innengewinde, Dichtung, 2 mL	Carl Roth
Multisafe Seal Tubes, 1,5 mL	Carl Roth
Pasteur Pipetten	Carl Roth
PD-Tips (5 mL, 10 mL)	Brand
Pipettenspitzen (2,5, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL)	StarLab Group
Plattenfolie	Sigma Aldrich
RNase Away	Molecular Bioproduct
Spritzenfilter (Membranfilter, Porengröße 0,22 µm) 3mm, 25mm	GE Water & Process
Zellkulturflaschen (T-175, T-75)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Well)	Greiner bio-one, Cellstar
Zentrifugenröhrchen 13 mL	Sarsted

Geräte und Software	Hersteller
8-Kanal-Pipette (100µL)	Eppendorf Research Plus
Autoklav 3870 ML	Tuttnauer
DNA-Platte, NanoQuant TM Platte	Tecan

Inkubator	Binder, Inkubator CO ₂ Binder C150
Kolbenhubpipette 2,5µL, 10µL, 20µL, 100µL, 200µL, 1000µL, 5mL)	Eppendorf Research
Lab dancer S 40	VWR
Lichtmikroskop invert., IT400 Trino	VWR
Magnetrührer VMS-C4	VWR
Mehrfachdispenser	Brand, Handystep
Orbitalschüttler Grant Bio PMS 1000	Grant-bio instruments
Pipettierhilfe (pipet boy)	Thermo Scientific, Matrix
Plattenlesegerät	Tecan GmbH, Infinite M200
Repetitive Pipette	Brand Handystep
RT, PCR	Applied Biosystems, StepOne Plus
Software (RT, PCR)	StepOne Plus V 2.3 LinregPCR Version 2013.0
Software, i-control 1.6	Tecan
Statistikprogramm	SigmaPlot, Version 11.0
Sterilwerkbank, Klasse 2	Telstar, BioStar Plus
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner, VWR
Waage, PioneerTM	OHAUS
Wasseraufbereitungssystem, Arium 611 VF	Sartorius
Wasserbad mit Wärmethermostat, Ecoline-Staredition E 100	VWR
Zählkammer, Neubauer improved Bright-line, 0,1 mm Tiefe 0,0025 mm ²	VWR
Zentrifugen	Eppendorf, 5415 R und 5804 R

3.2 Medien

Die Medienbestandteile wurden unter der Sterilwerkbank zusammengefügt und im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. Vor der Benutzung wurde die fertige Lösung im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt.

Medien der Caco-2 Zelllinie

Kultivierungsmedium: 500 mL DMEM mit 10 % FBS, 2 % L-Glutamin, und 1 % PenStrep

Inkubationsmedium: 500 mL DMEM mit 2 % L-Glutamin und 1 % PenStrep

Inkubationsmedium (Glukoseaufnahme): DMEM ohne Glukose, ohne Phenolrot und ohne Glutamin

Medien der 3T3-L1 Zelllinie

Kultivierungsmedium: 500 mL DMEM mit 10 % FBS, 4 % L-Glutamin und 1 % PenStrep

Inkubationsmedium: 500 mL DMEM mit 4 % L-Glutamin und 1 % PenStrep

Differenzierungsmedium: Kultivierungsmedium mit 1 % IBMX-Stocklösung, 0,1 % Insulinstocklösung und 0,1 % Dexamethasonstocklösung

Reifungsmedium: Kultivierungsmedium mit 0,1 % Insulinstocklösung

3.3 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x

Substanz	Menge [g]
Natriumchlorid	99,9
Dinatriumhydrogenphosphat	14,2
Kaliumchlorid	3,53
Kaliumhydrogenphosphat	2,45

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und auf einen Liter mit bidest. Wasser aufgefüllt.

PBS 1x

PBS 10x wurde 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt und 40 min autoklaviert, bevor es in der Zellkultur zum Einsatz kam.

HBSS/HEPES Puffer (20 mM)

Je nach Bedarf wurde ein Gemisch aus 2 % HEPES Puffer (1 M) und 98 % HBSS hergestellt.

IBMX-Stocklösung (51,8 mM; 1 mL)

Die IBMX-Lösung wurde stets frisch zubereitet, dazu wurden 11,5 mg IBMX in ein Eppendorf Tube eingewogen und 500 µL bidest. Wasser und anschließend 160 µL NaOH (1 N) hinzugefügt und gelöst. Danach wurden nochmals 340 µL bidest. Wasser hinzupipettiert und homogenisiert. Die Lösung wurde durch einen 0,22 µm Spritzenfilter steril filtriert.

Dexamethason Stocklösung (0,994 mM)

0,39 mg/mL Dexamethason wurden in bidest. Wasser gelöst und durch einen 0,22 µm Spritzenfilter steril filtriert.

Lösung des 2-NBDG-Floureszenzfarbstoffes

Der 2-NBDG-Feststoff wurde für die Versuche aliquotiert. Hierzu wurden 5 mg in 730 µL Ethanol gelöst, um eine Lösung aus 20 mM herzustellen, die anschließend zu je 50 µL in Eppendorf Tubes aufgeteilt wurde.

Lösung der Testsubstanzen

Für die Stocklösungen von Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol und Homoeriodictyol (1000x, 100 mM) wurden die Substanzen eingewogen und im Lösungsmittel gelöst. Daraus wurden dezimale Verdünnungsreihen (100 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM) erstellt. Anschließend wurden diese Lösungen mit HBSS/HEPES Puffer 1:100 (10x) verdünnt, um physiologisch relevante Konzentrationen zu erreichen.

Die Homoeriodictyol-Natriumsalz Stocklösung wurde 10-fach konzentriert angesetzt und direkt in HBSS/HEPES Puffer im Wasserbad und Ultraschallbad gelöst (1 mM). Aus dieser Mischung wurde wiederum eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt.

Substanz	Lösungsmittel	Stocklösung
Phloretin	Ethanol	100 mM
Hesperetin	Ethanol	100 mM
Sterubin	DMSO	100 mM
Eriodictyol	DMSO	100 mM
Homoeriodictyol	Ethanol	100 mM
Natrium-Homoeriodictyol	HBSS/HEPES	1 mM

Die Endkonzentrationen in den Zellkulturmedien der Versuchsansätze sollten 1 nM, 10 nM, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M betragen. Dazu wurden die Zellen mit neun Teilen Inkubationsmedium vorinkubiert und anschließend wurde ein Teil der 10-fach konzentrierten in HBSS/HEPES Puffer gelösten Testsubstanzen zugegeben. Als Kontrolle wurde, wenn nicht anders angegeben, das jeweilige Lösungsmittel ohne Zusatz der Testsubstanzen im HBSS/HEPES Puffer verwendet.

3.4 Primer

Verwendung bereits etablierter Primer, die mit NCBI / Primer-BLAST entworfen oder von PrimerBank verwendet und bei Sigma Aldrich erworben wurden [RIEDEL et al., 2014]

Gen	Sequenz (5' - 3')		Produktlänge (bp)
HPRT-1 (Referenzgen)	FW	CCTGGCGTCGTGATTAGTGA	137
	RV	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	
CD36	FW	TGTAACCCAGGACGCTGAGG	69
	RV	GAAGGTTCGAAGATGGCACC	
IFABP	FW	AACTGAACTCAGGGGGACCT	78
	RV	TCGTTTCCATTGTCTGTCCGT	
FATP 2	FW	TGGAACCACAGGTGCTACTC	116
	RV	ACCGAAGCAGTTCACCGATA	
FATP 4	FW	GGCTGCCCTGGTGTACTATG	93
	RV	CCCACGATGTTTCCTGCTGA	
PPAR α	FW	TTCGCAATCCATCGGCGAG	146
	RV	CCACAGGATAAGTCACCGAGG	
PPAR γ	FW	ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGA	100
	RV	ATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT	

3.5 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Caco-2 und 3T3-L1) zählen zu permanenten, adhären wachsenden Zellen. So bilden diese Zellen einen Monolayer (einlagige Zellschicht) und heften sich an die Oberfläche der Zellkulturflaschen [SCHMITZ, 2007].

3.5.1 Die Caco-2 Zelllinie

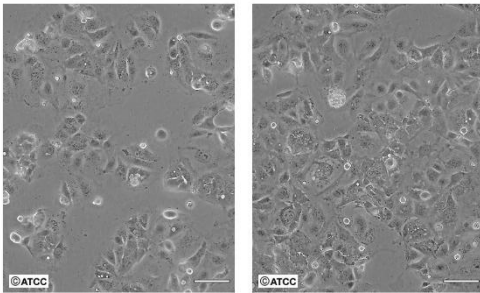


Abb. 3 Caco-2 Epithelzellen

Wachstum bei geringer (linkes Bild) und hoher (rechtes Bild) Dichte. [mod nach ATCC b, 2013]

Die intestinale Caco-2- Zelllinie (ATCC[®] HTB-37) stammt von einem humanen Kolonkarzinom eines 72-jährigen männlichen Kaukasiers und wurde zu einer permanenten, adhärent wachsenden Zelllinie etabliert. Das einschichtige Epithelgewebe stellt bei 100 % Konfluenz, als sogenanntes Monolayer, das Wachstum ein und beginnt spontan zu differenzieren. Nach der Aussaat

verdoppeln sich diese Zellen innerhalb von 24 Stunden, sie bilden inselähnliche Zellanhäufungen bis der Monolayer gebildet wird. Nach etwa drei Wochen ist die Differenzierung abgeschlossen.

Differenzierte Caco-2 Zellen weisen typische morphologische und funktionelle Eigenschaften von Enterozyten auf. So bilden diese Zellen an der apikalen Membranseite Mikrovilli und zwischen den Zellen *Tight junctions*. Ferner exprimieren sie zahlreiche Enzyme (u.a. Sucrase-Isomaltase, das als Differenzierungsmarker gilt), Membranrezeptoren, sowie Rezeptoren für den Insulin-ähnlichen Wachstums Faktor (IGF-I) der menschlichen Enterozyten. Caco-2 Zellen sind ein etabliertes Modell, um absorptive Eigenschaften von Inhaltstoffen zu untersuchen [MEUNIER et al., 1995], [SAMBUY et al., 2005].

3.5.2 Die 3T3-L1 Zelllinie

Die 3T3-L1 Zellen zählen zu den meist untersuchten Präadipozyten und stellen ein etabliertes Zellmodell dar, um die Differenzierung von Adipozyten zu erforschen [NTAMBI und YOUNG-CHEUL, 2000]. Die 3T3-L1 Zellen (ATCC[®] CL-173TM) sind isolierte, unipotente, embryonale Fibroblastenklone der Hausmaus (*Mus musculus*) [ATCC a, 2013].

Green und Meuth zeigten 1974 erstmals deren Differenzierung zu Fettzellen durch Akkumulierung von Triglyzeriden *in vitro* [GREEN und MEUTH, 1974]. In Kultur zeigen diese Zellen Eigenschaften, die Adipozyten ähnlich sind, wobei

die wichtigste phänotypische Erscheinung die Einlagerung von Fetttropfchen ist [GREGOIRE et al., 1998]. Die 3T3-L1

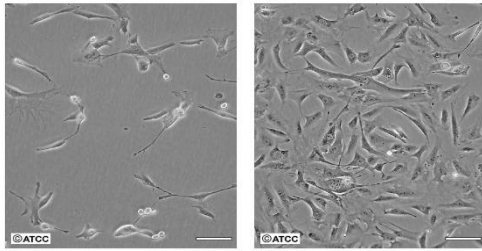


Abb. 4 3T3-L1 Präadipozyten

Wachstum bei geringer (linkes Bild) und hoher (rechtes Bild) Dichte [mod. nach ATCC a, 2013]

Zelllinie zeigt im Verlauf ihres Wachstums gut erkennbare Veränderungen der Struktur und Morphologie. Präadipozyten, wie sie in Abbildung 4 gezeigt sind, teilen sich rasch bis sie Konfluenz erreichen. In diesem Zustand unterscheidet sich die Zellmorphologie stark von den ursprünglichen Fibroblasten.

3T3-L1 Differenzierung

Eine spontane Differenzierung der 3T3-L1 Zellen innerhalb einiger Wochen ist möglich, kann aber durch Zugabe von geeigneten Hormonen oder hormonähnlichen Substanzen (Insulin, Isobutylxanthin und Dexamethason) und erhöhten Serumgehalt beschleunigt werden [GREGOIRE et al., 1998]. Dexamethason, ein synthetisches Glucocortikoid, induziert die Präadipozytendifferenzierung und erhöhte bei Anwesenheit von Serum die Expression des Transkriptionsfaktors CCAAT/enhancer binding Protein (C/EBP) α .

Erreichen die 3T3-L1 Zellen 100 % Konfluenz, wird deren Wachstum durch den Zell-Zell-Kontakt inhibiert. Kurz nach Zugabe des Differenzierungsmediums werden für einige Stunden mitogene Proteine exprimiert. Die Zellen durchwandern ein oder zwei Mitose-Zyklen bevor sie den Wachstumsstillstand

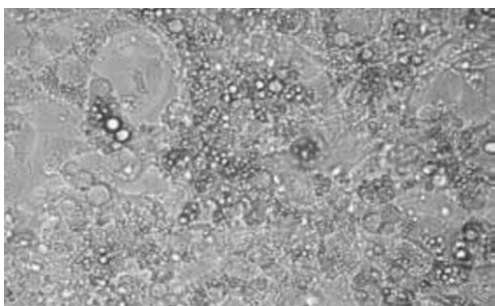


Abb. 5 Differenzierte 3T3-L1 Adipozyten

[mod. nach ATCC a, 2013]

(G₀-Phase) erreichen. Nun beginnen sie Marker der Differenzierung, wie die Transkriptionsfaktoren C/EBP β und C/EBP δ , zu exprimieren. Es wird vermutet, dass C/EBP β und C/EBP δ zwei Tage nach Einleitung der Differenzierung die Expression der adipozytenspezifischen Transkriptionsfaktoren PPAR γ und

C/EBP α vermitteln [NTAMBI und YOUNG-CHEUL, 2000]. PPAR γ und C/EBP α spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Adipogenese in Präadipozyten, indem sie die Transkription zahlreicher Enzyme des Fettsäuremetabolismus induzieren und die Triglyzeridakkumulierung fördern. [NTAMBI und YOUNG-CHEUL, 2000], [ROSEN und MACDOUGALD, 2006]. Etwa drei Tage nach Einleitung der Differenzierung beginnen die Zellen adipozytenähnliche Formen anzunehmen und runden in ihrer Form ab. Nach fünf bis sieben Tagen ist die Differenzierung abgeschlossen (siehe Abbildung 5).

3.5.3 Kultivierung

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Kulturbedingungen und Differenzierung der Caco-2 Zelllinie

Caco-2 Zellen wurden in sterilen Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² (T-75) und 15 mL Kultivierungsmedium gezüchtet und bei 70 - 80 % Konfluenz geteilt. Bei zu engem Zellkontakt würde die Mitoserate verlangsamen und die Zellen würden spontan zu differenzieren beginnen [SCHMITZ, 2007]. Für Versuche wurden Zellen bis zur Passage 20 subkultiviert.

Um eine Differenzierung einzuleiten, wurden, wenn nicht anders angegeben, 3×10^4 Zellen in 200 μ L Kultivierungsmedium pro Well in 96-Well-Platten ausgestreut und 21 Tage lang im Inkubator kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Währenddessen wurde das Medium an jedem zweiten bis dritten Tag gewechselt.

Um einen Vergleich ohne Zellen zu gewährleisten (Leerwert), wurden drei bis fünf Wells nur mit Medium befüllt. Für die Versuche wurden keine Randwells verwendet.

Kulturbedingungen und Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie

3T3-L1 Zellen wurden nach dem Auftauen in einer 75 cm² Kulturflasche in 15 mL Kultivierungsmedium gezüchtet. Diese Zellen wurden ebenfalls bei 70-80 % Konfluenz subkultiviert.

Die Differenzierung zu Adipozyten wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Tag - 4:** 3T3-L1 Fibroblasten wurden bei etwa 80 % Konfluenz geerntet und $1,5 \times 10^6$ Zellen in 50 mL Kultivierungsmedium in einer 175 cm² Flasche (T-175) ausgestreut.
- Tag 0:** Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz, wurde die Differenzierung eingeleitet. Dazu wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und 50 mL Differenzierungsmedium zugefügt.
- Tag 2:** Das Differenzierungsmedium wurde durch 50 mL Reifungsmedium ersetzt. Die Zellen zeigten erste erkennbare Fetttröpfchen.
- Tag 4:** Nun wurde wieder zu 50 mL Kultivierungsmedium gewechselt. Für weitere drei bis fünf Tage wurden die Zellen an jedem zweiten Tag mit neuem Kultivierungsmedium versorgt.
- Tag 7 - 9:** Versuchstag

Kryokonservierung der Zellen

Für eine längere Aufbewahrung wurden undifferenzierte Zellen in speziellen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren. Dazu wurde die Zellsuspension mit 10 % DMSO versetzt, um eine Kristallbildung zu vermeiden. Zunächst wurden 900 µL Zellsuspension mit 100 µL DMSO zügig vermengt und bei -80 °C vorgefroren. Nach 24 Stunden wurden sie in flüssigen Stickstoff gelagert.

Zellen Auftauen

Die gefrorenen Kryoröhrchen wurden mit einer Pinzette aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort im Wasserbad (37 °C) aufgetaut. In einem 15 mL Falcon Röhrchen wurden die Zellen mit 9 mL Kultivierungsmedium 1:10 verdünnt, um eine minimale Konzentration von 1 % des zytotoxischen DMSO

zu erhalten. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 115 xg und 25 °C, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 10 mL frischen Medium vorsichtig vermengt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein T-75 Kulturfläschchen mit weiteren 5 mL Medium überführt und im Inkubator gelagert.

Subkultivieren und Zellernte

Die Zellen wurden in T-175 oder T-75 Kulturflaschen gezüchtet. Erreichten die Zellen 70 – 80 % Konfluenz, wurden sie passagiert, um eine Wachstumsinhibierung durch zu dichten Zell-Zell-Kontakt zu vermeiden [SCHMITZ, 2007].

Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, um die Zellen von dem trypsin-inhibierenden Serum zu befreien. Die Zellen wurden durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (Einwirkzeit Caco-2 Zellen fünf bis sechs min, 3T3-L1 zwei bis drei min) und Beklopfen der Kulturflasche vom Gefäßboden gelöst. Diese Zelldissoziation wurde mit Kultivierungsmedium gestoppt und anschließend wurde die Zellsuspension mehrmals suspendiert, damit sich die Zellen vereinzeln. Die gewünschte Menge an Zellen wurde zum Weiterführen in ein neues Kulturgefäß transferiert oder die Zellzahl bestimmt.

Tab. 3 Volumina für Zellkulturmaterialien

Gefäß	PBS [mL]	Trypsin/EDTA [mL]	Medium [mL]
T-75	2,5	1,5	5
T-175	5	2,5	10

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Hierzu wurde die zur Zählung bestimmte Zellmenge je nach Populationsdichte 1:2 (50 µL Trypanblau + 50 µL Zellsuspension) oder 1:5 (80 µL Trypanblau + 20 µL Zellsuspension) verdünnt. Anschließend wurde ein kleines Volumen in die zwei, mit einem Deckglas abgeschlossenen, Kammern pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die lebenden (nicht gefärbten) Zellen in den vier großen Quadraten, die in 16 Kleinquadrate unterteilt werden, gezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$N = Z \times VF \times \text{Faktor}$$

N	relative Zellzahl pro mL
Z	Mittelwert der Zellzahl der vier Quadrate
VF	Verdünnungsfaktor (2 oder 5)
Faktor	Faktor der Neubauer Zählkammer (10^4)

Der Kammerfaktor ergibt sich aus dem Produkt (entspricht dem Volumen) der Fläche (1 mm^2) und der Tiefe (0,1 mm) eines Großquadrates = $0,1 \text{ µL} = 10^{-4} \text{ mL}$ (Faktor 10^4).

Je nach Experiment wurde eine definierte Zellzahl in dem gewünschten Kulturgefäß ausgesät.

3.6 Methoden

3.6.1 Bestimmung der Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten und 3T3 - L1 Adipozyten mit QBT *Fatty Acid Uptake Assay Kit*

Prinzip

Für die Messung der Fettsäureaufnahme wurde der *QBT Fatty acid Uptake Assay Kit* mit dem BODYPI® Farbstoff der Firma Molecular Devices verwendet. Dieses Reagenz enthält neben dem fluoreszierendem Laurinsäure-Analog (4,4-difluoro-5-methyl-4-bor-3a,4a-diazo-S-indacene-3-dodekansäure), auch ein *Quenching* Agens (Q-Red.1), welches das Fluoreszenz-Signal im Extrazellularraum unterdrückt. Tritt das markierte Fettsäureanalog in die Zelle

ein, wird das Signal messbar und kann quantifiziert werden [LIAO et al., 2005]. Die Fettsäureaufnahme korreliert somit mit dem Fluoreszenzsignal.

Probenvorbereitung

Die Messung wurde mit differenzierten Caco-2 Zellen und 3T3-L1 Zellen (für die Differenzierung siehe Kapitel 3.5.3) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mussten zunächst $6,5 \times 10^4$ Zellen aus den T-75 Kulturgefäß in eine 96-Well Platte in 100 μL Kultivierungsmedium pro Well ausgestreut werden. Anschließend wurde die Platte vier min bei 1000 rpm mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert und vier Stunden bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen am Plattenboden ansetzen konnten.

Durchführung

Die folgende Beschreibung gilt sowohl für die 3T3-L1 als auch für die Caco-2 Zelllinie.

Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt, mit 90 μL des entsprechenden Inkubationsmediums pro Well ersetzt und eine Stunde lang präinkubiert.

Die Testsubstanzen wurden, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, vorbereitet. Nach der Präinkubation wurden die gelösten Substanzen im Dreifach-Ansatz zu je 10 μL auf die Zellen pipettiert. Dabei wurden in den 3T3-L1 Zellen die Endkonzentrationen 10 nM, 0,1 μM , 1 μM und 10 μM und dieselben Konzentrationen plus 100 μM in den Caco-2 Zellen eingestellt. Für jede Platte wurde als Kontrolle zusätzlich ein Dreifach-Ansatz pro Lösungsmittel ohne Substanzzugabe angefertigt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 100 μL Ladepuffer pro Well hinzugefügt. Für 10 mL Ladepuffer pro 96-Well Platte wurden 0,02 g fettsäurefreies Rinderserumalbumin (BSA) und das *QBT Fatty Acid Uptake Kit*[®] in HBSS/HEPES Puffer gelöst. Die Fluoreszenz wurde im Plattenlesegerät 60 min lang alle 20 Sekunden im Bodenlese Modus gemessen ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$).

Auswertung

Die Absorptionswerte wurden gegen die Zeitmesspunkte aufgetragen und mithilfe der Software SigmaPlot 11.0 die Fläche unter der Kurve (AUC) des jeweiligen Wells berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert des Leerwertes von den übrigen Werten abgezogen. Die mittleren Werte der Kontrolle wurden auf 100 % gesetzt und die Testsubstanzen darauf bezogen (Testkomponente / Kontrolle x 100). Daraus wurden pro Testsubstanz Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

3.6.2 Bestimmung der Glukoseaufnahme in Caco-2 Enterozyten mit 2-NBDG Fluoreszenzfarbstoff

Prinzip

Um die Glukoseaufnahme in Enterozyten zu bestimmen, wurde die nicht-radioaktive Methode mit dem fluoreszierenden D-Glukose-Analog 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) gewählt. Der Farbstoff wiegt 342,26 g/mol und wird über den Glukosetransporter (GLUT) und den natriumabhängigen Glukose-Cotransporter (SGLT) 1 in isolierten Enterozyten aufgenommen [KANWAL et al., 2012], [ROMAN et al., 2001], [BLODGETT et al., 2011], [ZOU et al., 2005]. Intrazellulär wird 2-NBDG zu 2-NBDG-6-Phosphat umgewandelt und im weiteren Verlauf in eine nicht-fluoreszierende Form metabolisiert [LEIRA et al., 2002]. Die Fluoreszenz bei 550 nm (nach Anregung bei 480 nm) korreliert mit der Glukoseaufnahme.

Probenvorbereitung

Caco-2 Zellen wurden differenziert (Kap. 3.5.3) und die Testverbindungen eingewogen und gelöst (Kap. 3.5.).

Durchführung

Am 21. Tag der Differenzierung der Caco-2 Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt, mit 90 µL Inkubationsmedium für Glukoseaufnahme ersetzt und eine Stunde vorinkubiert (37°C, 5% CO₂). Im Dreifachansatz wurden 10 µL HBSS/HEPES Puffer mit oder ohne Testsubstanzen 10-fach konzentriert

aufgetragen. Für den Leerwert wurden 10 µL HBSS/HEPES Puffer zu je drei Wells ohne Zellen gegeben. Die Platte wurde 10 sek im Plattenschüttelgerät geschwenkt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Dunkeln wurde die Endkonzentration 200 µM des 2-NBDG-Farbstoffes in den Wells eingestellt, geschwenkt und die Platte für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und dreimal mit 100 µL eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 480 nm bzw. 550 nm Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge am Tecan Plattenlesegerät gemessen.

Auswertung

Die ausgegebenen Werte wurden vom Leerwert subtrahiert und auf die mittlere Kontrolle (= 100%) bezogen. So wird der Unterschied der Testsubstanzen zur unbehandelten Kontrolle verdeutlicht.

3.6.3 RNA-Isolierung mit Caco-2 Enterozyten

Prinzip

Die Isolierung der RNA wurde mit dem peqGold Total RNA Kit nach Anleitung des Herstellers Peqlab durchgeführt. Um die Genexpression bestimmter Proteine messen zu können, ist es nötig, die nach der Transkription entstandene mRNA zu isolieren. Die mRNA würde bei der darauffolgenden Translation in das entsprechende Protein übersetzt werden.

Mithilfe des Isolierungs-Kits werden die RNA-Abschnitte von DNA, RNAsen und anderen inhibierenden Proteinen, Verunreinigungen und Zellbestandteilen gereinigt. Dafür wird das Zellhomogenisat durch verschiedene Säulen filtriert und gewaschen [PeqLab, 2014].

Probenvorbereitung

In einer 6-Well Platte wurden 6×10^5 Caco-2 Zellen in 3 mL Kultivierungsmedium pro Well ausgestreut und differenziert. Am 21. Tag wurde das Kultivierungsmedium mit 2,70 mL Inkubationsmedium pro Well ersetzt und eine Stunde lang bei 37 °C vorinkubiert.

Die Testsubstanzen (NaHED und HED) wurden für die Inkubation, wie in Kap. 3.3. beschrieben, 10-fach konzentriert gelöst und zu je 300 µL pro Well zu den Zellen pipettiert, so dass die Endkonzentration 10 µM betrug. Anschließend wurden die Zellen für 15, 30, 60 oder 90 min inkubiert. Für jeden Zeitpunkt wurde als Kontrolle HBSS/HEPES Puffer mit bzw. ohne Lösungsmittel ohne Testsubstanzen auf der Platte integriert.

Durchführung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 mL eiskaltem PBS gewaschen, um die Testsubstanzen und Medienreste wieder zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 600 µL *RNA Lysis Buffer T* aufgelöst und homogenisiert. Das Lysat wurde bei - 80 °C eingefroren oder die enthaltene RNA sofort isoliert.

Für die Isolierung wurde das gesamte Lysat auf eine *DNA Removing Säule*, die in einem 2 mL Reaktionsgefäß steckte, pipettiert und eine Minute bei 12.000 xg zentrifugiert. Danach wurde die Säule verworfen. Um die RNA zu präzipitieren, wurde dem Eluat 600 µL 70%iger Ethanol zugegeben und homogenisiert. Zur Bindung der RNA auf die Säule wurden 600 µL der Probe auf eine *PerfectBind RNA Säule* mit Auffanggefäß geladen und zentrifugiert (1 min, 10.000 xg). Der Durchfluss wurde verworfen und die restlichen 600 µL auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule wieder zentrifugiert und das Auffanggefäß verworfen.

Für den ersten Waschschrift wurde die *PerfectBind RNA Säule* in ein Auffanggefäß gegeben, mit 500 µL *RNA Wash Buffer I* versetzt, zentrifugiert (15 sek, bei 10.000 xg) und das Eluat verworfen. Nun wurden 600 µL *RNA Wash Buffer II* kurz auf der Säule inkubiert und zentrifugiert (15 sek, bei 10.000 xg). Dieser Waschschrift wurde wiederholt und der Säulendurchfluss verworfen.

Zum Trocknen wurde die *PerfectBind RNA Säule* in einem frischen Auffanggefäß bei 10.000 xg für zwei Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurden 30 µL vorgewärmtes RNase-freies Wasser auf die Säule pipetiert. Nach fünf Minuten Wartezeit wurde die RNA durch Zentrifugieren

(5.000 xg, 1 min.) in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Es folgte eine zweite Elutionsrunde.

Messung der RNA-Konzentration

Zur Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der RNA in den Proben, wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm (Absorptionsmaximum der reinen RNA) und 280 nm gemessen. Liegt der Quotient daraus zwischen 1,8 und 2,2 entspricht es im Allgemeinen einer Reinheit von 80-100 %. Darüber hinaus wurde die Absorption bei 260 bzw. 230 nm gemessen. Dieses Verhältnis (260/230) sollte einem Wert nahe $2,0 \pm 0,2$ entsprechen, um Verunreinigungen mit Proteinen, Phenolen und chaotropen Salzen auszuschließen [Biomedical Genomics, 2014].

Die Absorption von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg RNA / mL. Mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann die Konzentration der RNA in der Probe berechnet werden [PeqLab, 2014].

Als Leerwert wurden 2 µL RNase freies Wasser verwendet. Die RNA-Lösung bzw. der Leerwert wurden in einem Volumen von 2 µL invers auf die NanoQuant-Platte pipettiert und die OD bei 230 nm, 260 nm und 280 nm im Tecan Plattenlesegerät gemessen. Für die Reverse Transkription wurden ausschließlich Proben mit einem 260/280-Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2 verwendet.

3.6.4 cDNA-Synthese – Reverse Transkription

Prinzip

Die, wie in Kap. 3.6.3. beschrieben, isolierte und gereinigte RNA wurde in der reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Life Technologies verwendet.

Durch Zugabe der reversen Transkriptase, Primern und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) wird während eines schrittweisen Temperaturverfahren die RNA in cDNA umgeschrieben.

Probenvorbereitung

Anhand der in Kap. 3.6.3. ermittelten RNA Konzentration wurde die RNA-Konzentration jeder Probe auf 1,5 µg / 10 µL eingestellt.

Alle vorbereitenden Tätigkeiten wurden auf Eis durchgeführt, um eine vorzeitige Reaktion der Enzyme zu vermeiden.

Herstellung des 2x Reverse Transkription Master Mix

Die Komponenten für die Umschreibung wurden auf Eis aufgetaut. Je nachdem wie viele Proben umgeschrieben wurden, wurden pro Reaktion (entspricht einer Probe) folgende Bestandteile in einem Röhrchen zusammengefügt und vorsichtig durchmischt:

Komponente	Volumen / Reaktion [mL]
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
Multiscribe TM Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuklease freies Wasser	3,2
Gesamtvolumen / 20 µL Reaktion	10

Die Umschreibung wurde entweder in einer 96-Well PCR-Platte oder in RNase und DNase freien Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Zunächst wurden 10 µL 2x Reverse Transkription Mastermix pro Reaktion vorgelegt. Anschließend wurde 10 µL Probe (1,5 µg RNA) dazugegeben und mit einer Pipette homogenisiert. Das Gefäß wurde gut verschlossen und kurz zentrifugiert.

Durchführung

Nun wurde die Transkription nach folgendem Temperaturschema im StepOnePlus™ Thermocycler eingestellt:

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
25 °C	37°C	85°C	4 °C
10 min	120 min	5 min	∞

Die synthetisierte cDNA konnte nun gleich für die qPCR verwendet werden oder für einige Monate bei - 20 °C gelagert werden.

3.6.5 Bestimmung der Genexpression mit quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Prinzip

Die Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung der DNA (in diesem Fall cDNA), wobei der Fortschritt im Verlauf beobachtet und anschließend quantifiziert werden kann. Die PCR besteht aus zwei bis drei aufeinanderfolgenden Schritten, die etwa 40 Mal wiederholt werden und eine exponentielle Steigerung des gewünschten Genabschnittes gewährleistet. Die PCR startet mit der Denaturierung bei 95 °C. Hierbei wird die doppelsträngige DNA aufgetrennt. Durch Abkühlung auf 60 °C folgt die Anlagerung der spezifischen vorwärts und rückwärts Primer (*Annealing*). Schließlich folgt die Verdoppelung (Amplifizierung) der Einzelstränge durch die thermostabile Polymerase. Diese drei Schritte werden 40 Mal wiederholt und nach jedem Zyklus wird das Fluoreszenzsignal, welches mit der doppelsträngigen DNA korreliert, gemessen [LÖFFLER und MÖSSNER, 2007]. Das Messsignal wird vom Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green ausgelöst, der nur an doppelsträngige DNA-Abschnitte bindet und eine gesteigerte Fluoreszenz verursacht [AB, 2014]. Nach der Normalisierung auf das Referenzgen erfolgte die relative Quantifizierung im Vergleich zur Kontrolle.

Zur Überprüfung des PCR-Produktes wurde eine Schmelzkurvenanalyse angehängt. Die Temperatur wird schrittweise erhöht, dabei dissoziieren die amplifizierten Doppelstränge wieder und das Fluoreszenzsignal wird schwächer

und im Verlauf mitgemessen. Anhand des Schmelzpunktes, der durch den Gehalt von Guanin und Cytosin, Basenlänge und Sequenz des DNA-Abschnittes beeinflusst wird, kann das Amplikon unterschieden werden [RIRIE et al., 1997].

Probenvorbereitung

Die etablierten Primer wurden bei NCBI / Primer-BLAST entworfen oder von PrimerBank verwendet und bei Sigma Aldrich erworben [RIEDEL et al., 2014].

Die cDNA-Proben aus Kap. 3.6.4. wurden 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und entsprachen in etwa einer Konzentration von 50 ng / μL . Die Proben und Reaktionskomponenten wurden auf Eis aufgetaut und zusammengefügt.

Herstellung des Reaktionsmix

Zunächst wurde die Menge der Reagenzien pro Reaktion kalkuliert. Jede Probe und die Negativkontrolle (nukleasefreies Wasser statt cDNA) wurden im Dreifach-Ansatz analysiert. Ein Überschuss von 10 % wurde dazu gerechnet.

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
Fast SYBR [™] Green Mastermix (2x)	5,00 μL	
nukleasefreies Wasser	3,80 μL	
Forward Primer [10 pmol / μL]	0,10 μL	100 nM
Reverse Primer [10 pmol / μL]	0,10 μL	100 nM
Probe (10x)	1,00 μL	
gesamtes Reaktionsvolumen	10,0 μL	

Durchführung

Der homogenisierte Reaktionsmix wurde auf die PCR-Platte pipettiert, mit einer Folie verschlossen und kurz zentrifugiert.

Im *StepOnePlus™ Thermal Cycler* wurde die Echtzeit qPCR nach Eingabe folgender Einstellungen gestartet:

		T [°C]	Dauer [sek]
Stufe 1 (<i>Holding Stage</i>)	Enzym Aktivierung	95	20
Stufe 2 (<i>Cycling Stage</i>)	Denaturierung	95	3
(40 x)	Anlagerung / Amplifizierung	60	30
		95	15
Stufe 3 (Schmelzkurve)	T.-Anstieg alle 0,5°C + Fluoreszenzmessung	60	60
		95	15

Quantifizierung	komparative C _T ($\Delta\Delta C_T$)
Geschwindigkeit	Fast
Passive Referenzfarbe	ROX

Auswertung

Aus den ΔR_n Werten (Signalwerte der Proben nach Abzug der Basislinie) wurden mithilfe LinRegPCR die N_0 Werte jeder Probe ermittelt, diese stellen die Anfangskonzentration der respektiven mRNA dar.

Die Ausreißer (+ / - 15 % der mittleren Effizienz) wurden von der Ermittlung der Effizienz ausgeschlossen, die über 1,8 liegen soll.

$$N_0 = \text{Threshold} \div \text{mittlere Eff}^{C_T}$$

Die erhaltenen N_0 -Werte der Zielgene wurden auf die mittleren N_0 -Werte des Referenzgens (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1, HPRT-1) pro Probe bezogen ($N_0 \text{ (Zielgen)} / N_0 \text{ (Referenzgen)}$) [RUIJTER et al., 2009]. Die normalisierten Werte wurden in x-facher Änderung (Probe / Kontrolle) auf den Mittelwert der Kontrollen (=1) bezogen.

Pro Gen wurden die Behandlungen (HED, NaHED bzw. Kontrollen) den verschiedenen Zeitpunkten gegenübergestellt.

3.6.6 Messung der metabolischen Aktivität mittels MTT-Methode in Caco-2 und 3T3-L1 Zellen

Prinzip

Um die Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität der Caco-2 und 3T3-L1 Zellen nach Inkubation mit den Testverbindungen nachzuweisen, wurde die etablierte MTT-Methode angewandt. Das gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Reagenz wird von lebenden Zellen aufgenommen und durch Nicotinamidadenosindinukleotid(phosphat) zu dunkelvioletten Formazan-Kristallen umgewandelt. Die Menge des gebildeten Formazans ist direkt proportional zur Anzahl lebender und aktiver Zellen und kann photometrisch bestimmt werden [RISS et al., 2013].

Probenvorbereitung

Die Messung der metabolischen Aktivität der verwendeten Zellen wurde analog zu den Versuchen durchgeführt.

Die Testsubstanzen wurden, wie in Kap 3.3. beschrieben, in den Endkonzentrationen 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M und 0,1 μ M eingesetzt.

Die Zellen wurden, wie in Kap. 3.5.3 geschildert, differenziert. Die 3T3-L1 Adipozyten wurden, wie in Kap. 3.6.1 beschrieben, ausgestreut und nach dem Absetzen (vier Stunden) analog zu den Caco-2 Zellen behandelt.

Herstellung der MTT-Arbeitslösung

Für jeden Versuch wurde ein Teil der MTT-Stocklösung (siehe Kap. 3.3) mit fünf Teilen zellspezifischem Inkubationsmedium verdünnt.

Durchführung

Das Kultivierungsmedium wurde mit 90 μ L Inkubationsmedium ersetzt und für eine Stunde vorinkubiert. Danach wurden die Testsubstanzen (10x), Kontrollen und Negativkontrollen (Medium) auf die Zellen gebracht und für 90 min inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium mit den gelösten Testsubstanzen abgesaugt, 100 μ L MTT-Arbeitslösung pro Well zu

den Zellen pipettiert und inkubiert (37°C, 5% CO₂). Bei Bildung violett-gefärbter Kristalle (nach etwa 20 bis 25 min erkennbar) wurde die Reaktion gestoppt.

Dazu wurde der Überstand entfernt und die Formazanpräzipitate in 150 µL DMSO pro Well gelöst. Nachdem die Platte eine Minute geschwenkt worden war, konnten die Extinktionen (Testsignal 570 nm und Referenzsignal bei 650nm) gemessen werden.

Bei der Referenzwellenlänge werden unspezifische Signale gemessen. Von den Messwerten der Testwellenlänge bei 570 nm, dem Absorptionsmaximum von Formazan, wurden die Referenzwerte subtrahiert [RISS et al., 2013]. Der Mittelwert des Leerwertes wurde von allen Messwerten abgezogen und auf die Kontrolle (Medium) bezogen.

3.6.7 Statistik

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen wurde mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden mit mindestens drei biologischen und jeweils drei technischen Replikaten ausgeführt.

Ausreißer wurden mit Nalimov-Test für die kritische Grenze $\alpha=0,05$ identifiziert und aus der statistische Analyse ausgeschlossen.

Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Testsubstanzen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test angewandt. Die Voraussetzung hierfür sind gleiche Varianzen und normalverteilte Werte. War dies nicht der Fall, wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse nach Rängen (*ANOVA on Ranks*) mit nachfolgenden Dunn's post hoc-Test eingesetzt. Zum Vergleich aller Testsubstanzen nach den Konzentrationen wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two Way ANOVA*) genutzt und die signifikanten Unterschiede anhand des *General Linear Model* berechnet. Falls nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse im Text stets mit Mittelwert (MW) $\pm$ Standardabweichung (SD) angeführt.

Für die Genexpressionsanalyse wurden die Unterschiede zwischen der Inkubationsdauer und den Testsubstanzen mithilfe der zweifaktoriellen ANOVA

berechnet. Hier wurden die Werte mit $MW \pm SEM$ (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben.

Die Rohdaten sind im Anhang ersichtlich.

4 ERGEBNISSE

4.1 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die metabolische Aktivität der Caco-2 Enterozyten

Zunächst musste die metabolische Aktivität in Caco-2 Enterozyten nach Inkubation mit den Testsubstanzen in den gewählten Konzentrationen getestet werden.

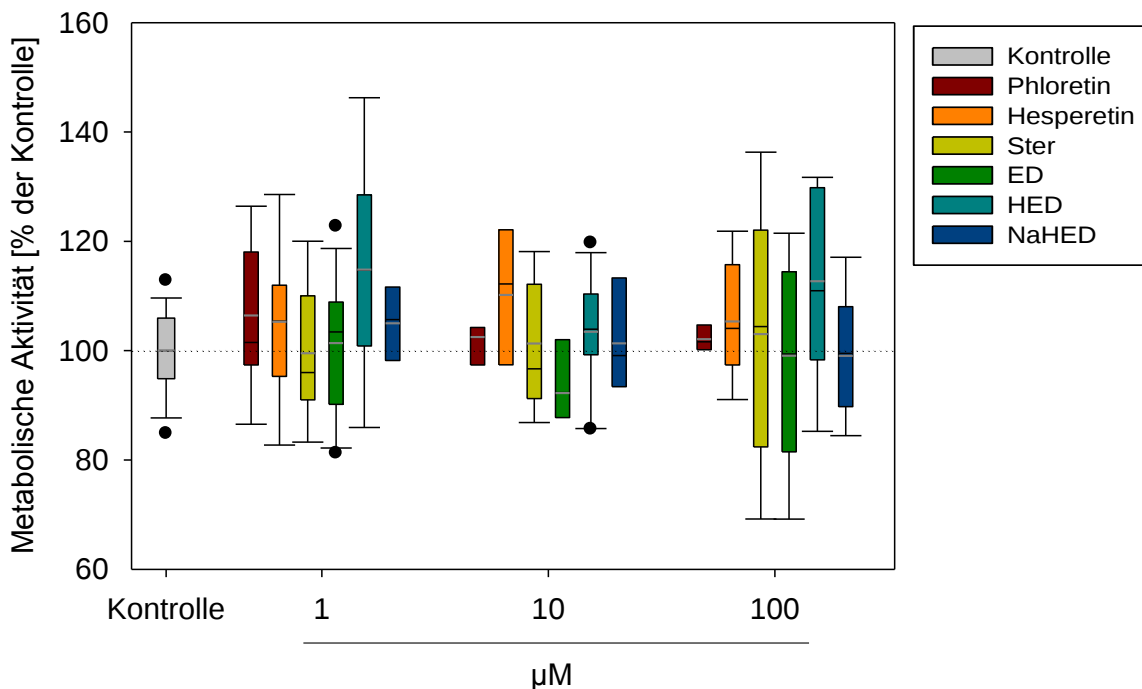


Abb. 6 Metabolische Aktivität nach 90-minütiger Inkubation mit 1 bis 100 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen

Signifikanz wurde mit ANOVA nach Rängen getestet, Ergebnisse sind in % der Kontrolle (=100%, Inkubationsmedium) als Boxplot dargestellt, n=3-6, tR= 2-3. Die grauen Linien zeigen den Mittelwert (MW), schwarze Linien den Median. Abkürzungen: Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol), HED (Homoeriodictyol), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

Abbildung 6 stellt die metabolische Aktivität nach 90-minütiger Inkubation mit 1, 10 oder 100 µM mit Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen dar.

Keine der getesteten Substanzen beeinflusste in den analysierten Konzentrationen die metabolische Aktivität in Caco-2 Enterozyten.

4.2 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten

Im Rahmen eines Substanzvergleiches wurden die Flavanone Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz auf deren Einfluss auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten untersucht.

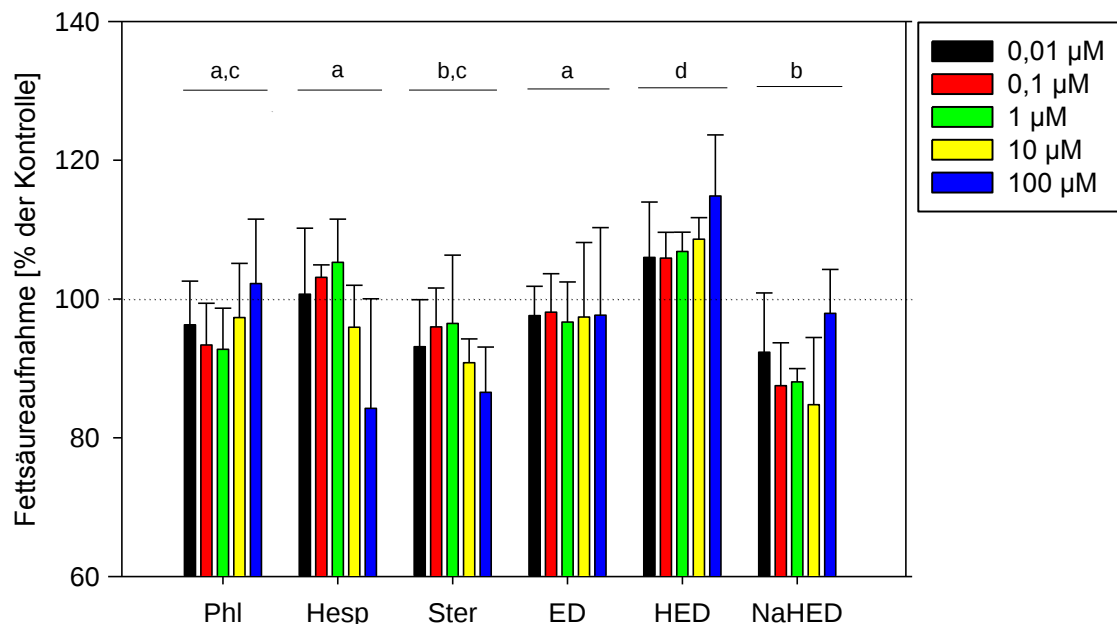


Abb. 7 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 100 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Nach Präinkubation und anschließender 60-minütiger Fluoreszenzmessung, wurde die AUC der Veränderung der Fluoreszenz während der Zeitmesspunkte berechnet, Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle (0,1% Lösungsmittel in HBSS/HEPES Puffer) mit MW $\pm$ SD angegeben. Signifikanz wurde mit zweifaktorieller ANOVA ($p < 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p = 0,05$) getestet; unterschiedliche Buchstaben (abcd) repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, $n = 3-4$, $tR = 1-3$. Abkürzungen: Phl (Phloretin), Hesp (Hesperetin), Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol), HED (Homoeriodictyol), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

Abbildung 7 zeigt in einem Substanzvergleich die Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation und anschließender 60-minütiger Messung der AUC mit 10 nM bis 100 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten.

Die Fettsäureaufnahme unterschied sich nach Inkubation mit Homoeriodictyol von den übrigen getesteten Flavanonen ($p < 0,001$). Die Wirkung von Homoeriodictyol-Natriumsalz auf die Fettsäureaufnahme differierte zusätzlich

zu Homoeriodictyol zu Hesperetin, Eriodictyol und Phloretin ($p < 0,001$). Schließlich unterschied sich die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit Sterubin von Hesperetin ($p = 0,004$) und Eriodictyol ($p = 0,005$).

Die genauere Auswertung der einzelnen Verbindungen im Vergleich zur Kontrolle in Abhängigkeit der Konzentrationen* ergab, dass die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 100 μM Phloretin im Vergleich zur Inkubation mit 0,1 μM bzw. 1 μM Phloretin um 8,83 % ($p = 0,003$) bzw. 9,48 % ($p = 0,001$) anstieg*. Jedoch gab es keinen Unterschied zur Kontrolle.

Die Inkubation mit Eriodictyol zeigte keinen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen*.

Die Fettsäureaufnahme wurde nach Inkubation mit 100 μM Hesperetin im Vergleich zur Kontrolle um $15,8 \pm 15,8$ % ($p < 0,001$) verringert. Des Weiteren unterschied sich die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 10 nM bis 10 μM Hesperetin von der Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 100 μM Hesperetin ($p < 0,001$)*.

Die Inkubation mit Sterubin reduzierte die Fettsäureaufnahme im gesamten Konzentrationsverlauf und zeigte nach Inkubation mit 10 μM und 100 μM eine Verringerung der Fettsäureaufnahme um $10,6 \pm 3,44$ % ($p = 0,003$) bzw. $14,8 \pm 6,53$ % ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (= 101%)*.

Nach Inkubation mit Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz verhielt sich die Fettsäureaufnahme unterschiedlich. Die Ergebnisse sind detaillierter in Abbildung 8 dargestellt.

* Mittelwertvergleiche mit zweifaktorieller Varianzanalyse ($p < 0,001$) und anschließenden Holm-Sidak post hoc Test ($p = 0,05$), Werte mit $\text{MW} \pm \text{SD}$ angegeben.

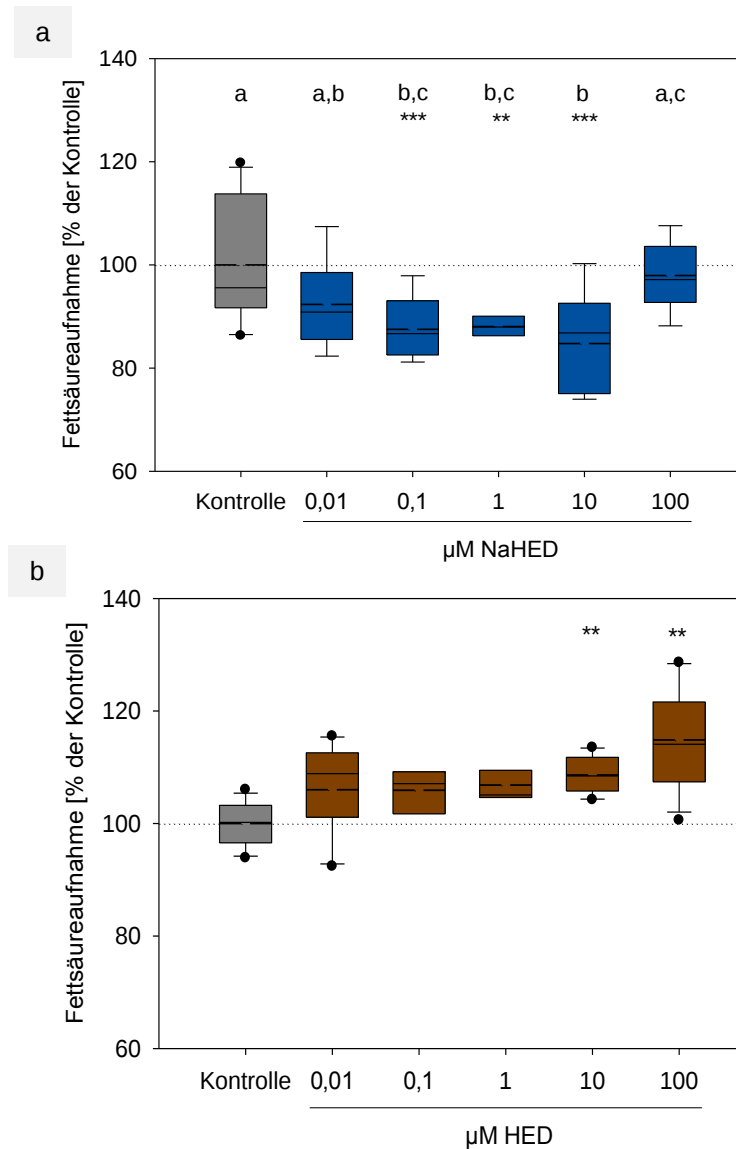


Abb. 8 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 100 μM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen

Nach Präinkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz (NaHED) (a) oder Homoeriodictyol (HED) (b) und anschließender 60-minütiger Fluoreszenzmessung, wurde die AUC der Veränderung der Fluoreszenz während der Zeitmesspunkte berechnet. Ergebnisse sind in % der Kontrolle (=100%, 0,1% Lösungsmittel in HBSS/HEPES Puffer) als Boxplot dargestellt und im Text mit $\text{MW} \pm \text{SD}$ angegeben. a Signifikanz wurde mit einfaktorieller ANOVA ($p < 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p < 0,05$) durchgeführt, $n=3$, $tR=2-3$. b Signifikanz wurde mit ANOVA nach Rängen ($p < 0,001$) und anschließend Dunns's post hoc Test ($p < 0,01$) durchgeführt, $n=4$, $tR=1-3$. *** ($p < 0,001$) und ** ($p < 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle und verschiedene Buchstaben (abc) zwischen den Gruppen.

Mittelwert — — —, Median —

Abbildung 8a zeigt den Einfluss der 30-minütigen Präinkubation und Messung der AUC für eine Stunde mit 10 nM bis 100 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten. Der Einfluss der Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz auf die Fettsäureaufnahme gleicht einem kurvigen Verlauf, mit einer maximalen Verringerung im Bereich zwischen 0,1 μ M und 10 μ M. So sank die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz um $12,5 \pm 6,18$ % ($p=0,001$), um $11,9 \pm 1,91$ % ($p=0,003$) und um $15,2 \pm 9,69$ % ($p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Des Weiteren sank die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz um 13,2 % ($p=0,002$) im Vergleich zu der nach 100 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz.

Abbildung 8b stellt den Einfluss der 30-minütigen Präinkubation und Messung der AUC für 60 Minuten mit 10 nM bis 100 μ M Homoeriodictyol auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen dar. Die Inkubation mit Homoeriodictyol zeigte im Gegensatz zu dessen Natriumsalz einen Anstieg der Fettsäureaufnahme. Ein Unterschied zur Kontrolle war nach der Inkubation mit 10 μ M und 100 μ M Homoeriodictyol zu erkennen. Dabei stieg die Fettsäureaufnahme um $8,62 \pm 3,09$ % ($p<0,01$) bzw. $14,9 \pm 8,79$ % ($p<0,01$).

4.3 Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression ausgewählter Fettsäuretransporter und Gene des Fettstoffwechsel in Caco-2 Enterozyten

Aus dem Substanzvergleich ging hervor, dass die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz sank, während die Inkubation mit Homoeriodictyol eine Steigerung verursachte. Um die Ursache dafür zu finden, wurde die Wirkung dieser Substanzen auf das Expressionslevel der Gene *CD36*, *FATP 2*, *FATP 4*, *IFABP*, *PPAR α* und *PPAR γ* untersucht. Diese Gene kodieren für Proteine, die am Fettsäuretransfer beteiligt sind. Die Resorption der Fettsäuren in Enterozyten erfolgt passiv und aktiv über die Fettsäuretransportproteine (FATP) 2 und 4 und CD36 / Fettsäuretranslokase [LYNES und WIDMAIER, 2011, SANDOVAL et al., 2008]. Intrazellulär binden

Fettsäuren an das intestinale fettsäurebindende Protein (IFABP) [NIOT et al., 2009]. Die Transkriptionsfaktoren PPAR α und PPAR γ sind an der Fettsäurehomöostase beteiligt und regulieren unter anderem die Expression der genannten Fettsäuretransporter. Die Expression der oben genannten Gene wurde im menschlichen Duodenum und Jejunum nachgewiesen [WANG et al., 2005].

Genexpression von CD36 in Caco-2 Enterozyten

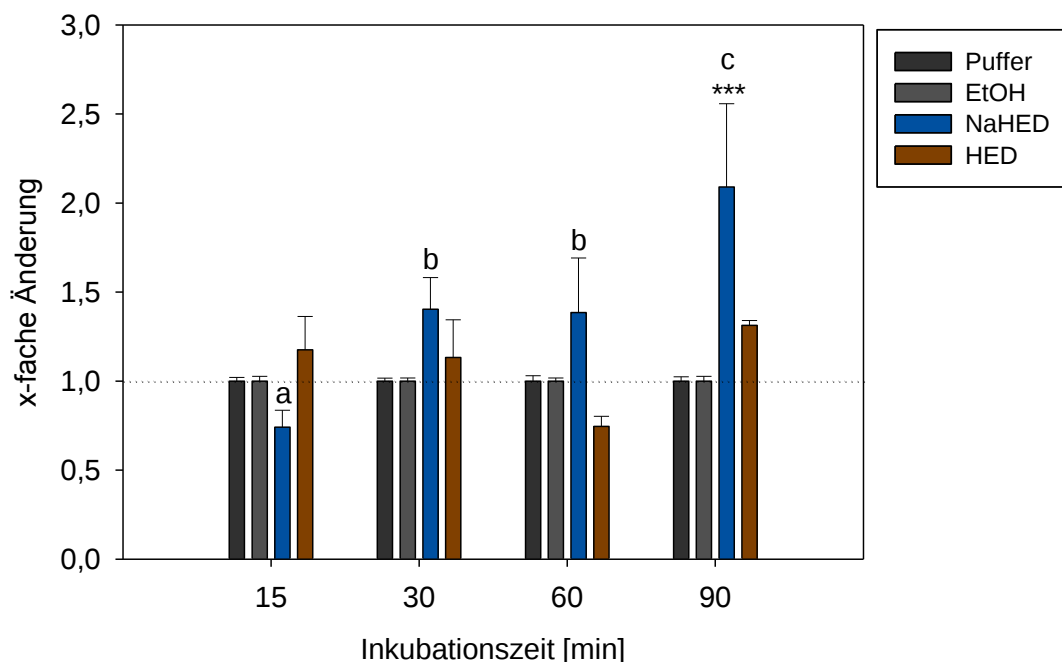


Abb. 9 Genexpression von CD36 nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Puffer (=HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu NaHED, EtOH (=0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu HED. Die Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) als $MW \pm SEM$ angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,002$) und anschließendem Holm Sidak post hoc Test ($p<0,05$) getestet. Unterschiedliche Buchstaben (abc) repräsentieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlungsgruppe zwischen den Zeitpunkten, ***($p<0,001$) zeigt signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, $n=3-4$, $tR=1-3$. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

Abbildung 9 zeigt die Genexpression von CD36 nach Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Caco-2 Enterozyten.

CD36 wurde nach 90 min durch die Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol-Natriumsalz auf das $2,09 \pm 0,47$ -Fache ($p<0,001$) im Vergleich

zur Kontrolle hochreguliert. Nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz für 15, 30 und 60 min wurden keine Unterschiede zur Kontrolle gemessen. Es wurden aber zwischen der 15- bis 90-minütigen Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz Unterschiede gemessen. So stieg die Genexpression von *CD36* nach 15 min von dem $0,74 \pm 0,09$ -Fachen auf das $1,40 \pm 0,18$ -Fache nach 30 min ($p=0,005$). Nach weiteren 30 min konnte kein Unterschied gemessen werden. Aber nach 60-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz stieg die Genexpression von *CD36* wiederum von dem $1,39 \pm 0,31$ -Fachen auf das $2,09 \pm 0,47$ -Fache nach 90 min ($p=0,006$).

Die Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol zeigte zu den getesteten Zeitpunkten keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von *CD36*.

Genexpression von *IFABP* in Caco-2 Enterozyten

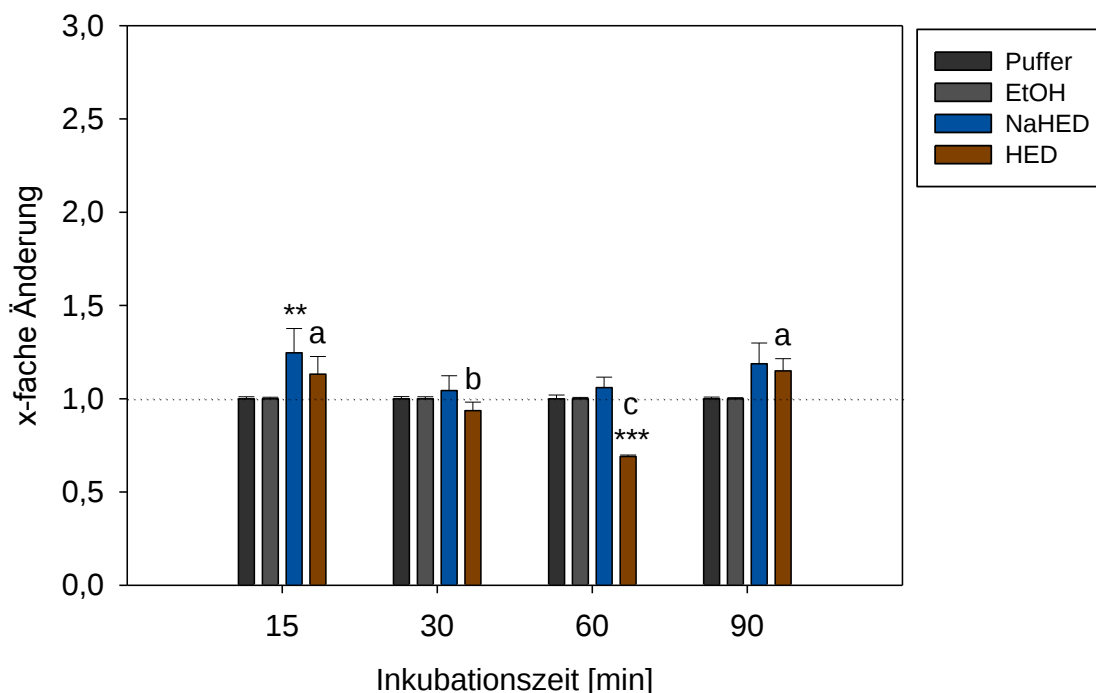


Abb. 10 Genexpression von *IFABP* nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Puffer (=HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu NaHED, EtOH (=0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu HED. Die Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) als $MW \pm SEM$ angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,005$) und anschließendem Holm Sidak post hoc Test ($p=0,05$) getestet. Unterschiedliche Buchstaben (abc) repräsentieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlungsgruppe zwischen den Zeitpunkten, ***($p<0,001$) und **($p<0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, $n=3-4$, $tR=1-3$. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

Abbildung 10 zeigt den Einfluss von 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz auf die Genexpression von *IFABP* zu verschiedenen Inkubationszeiten.

IFABP wurde bereits nach 15-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz auf das $1,25 \pm 0,13$ -Fache im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,004$) hochreguliert. Eine längere Behandlungsdauer (30 bis 90 min) mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz führte zu keinem Einfluss auf die Genexpression von *IFABP*.

Nach 60-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol wurde *IFABP* auf das $0,69 \pm 0,01$ -Fache im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert ($p<0,001$). Des Weiteren wurden Unterschiede der Genexpression von *IFABP* nach 60-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol zu den übrigen Inkubationszeiten nach 15, 30 und 90 min ($p<0,007$) gemessen.

Genexpression von *FATP 2* in Caco-2 Enterozyten

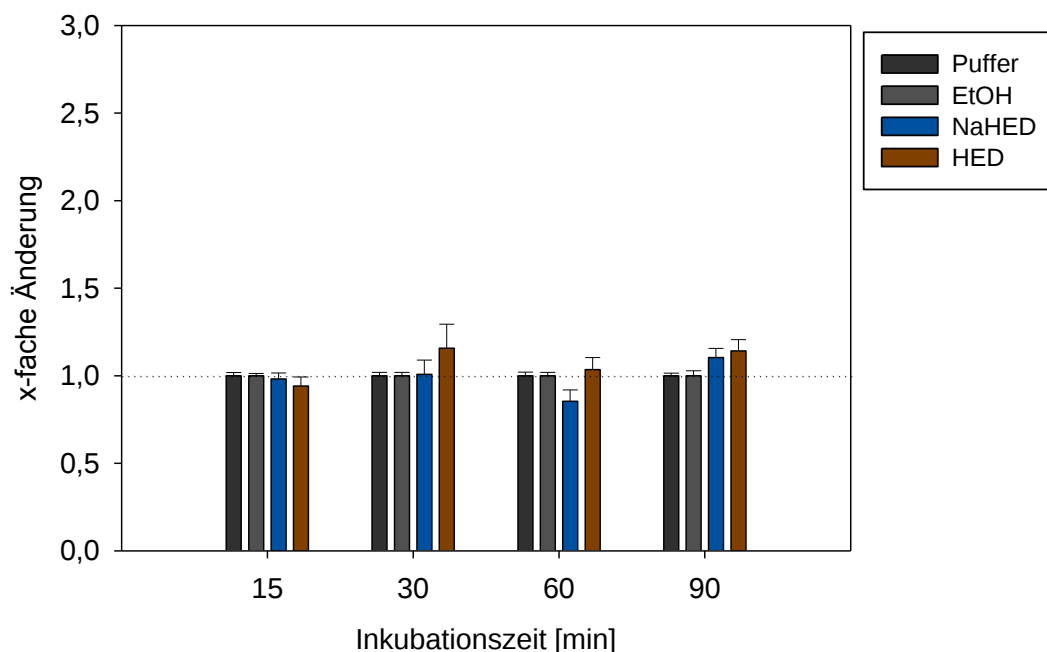


Abb. 11 Genexpression von *FATP 2* nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Puffer (=HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu NaHED, EtOH (=0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu HED. Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) als $MW \pm SEM$ angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit zweifaktorieller ANOVA getestet, $n=4$, $tR=2-3$. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

Abbildung 11 zeigt die Genexpression von *FATP 2* nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz zu verschiedenen Zeitpunkten. Weder die Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol noch die mit dessen Natriumsalz beeinflussten die Genexpression von *FATP 2* zu den analysierten Inkubationszeiten.

Genexpression von *FATP 4* in Caco-2 Enterozyten

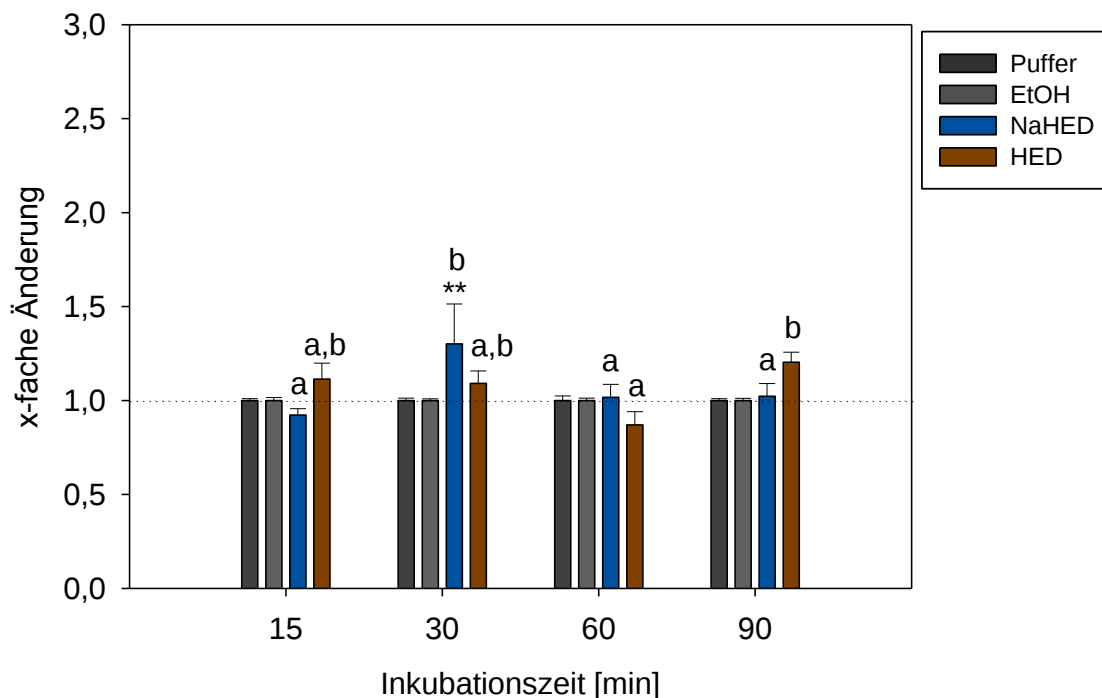


Abb. 12 Genexpression von *FATP 4* nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Puffer (=HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu NaHED, EtOH (=0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu HED. Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) als $MW \pm SEM$ angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,016$) und anschließendem Holm Sidak post hoc Test ($p=0,05$) getestet. Verschiedene Buchstaben (ab) repräsentieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlungsgruppe zwischen den Zeitpunkten, **($p<0,01$) zeigt signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, $n=4$, $tR=2-3$. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

In Abbildung 12 ist die Genexpression von *FATP 4* nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz zu verschiedenen Zeitpunkten in Caco-2 Enterozyten dargestellt.

FATP 4 wurde durch die 30-minütige Behandlung mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz auf das $1,30 \pm 0,21$ -Fache ($p=0,003$) im Vergleich zur Kontrolle

hochreguliert. Zu den übrigen Inkubationszeiten wurden keine Änderungen der Genexpression von *FATP 4* durch 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz gemessen.

Nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol zeigte die Genexpression von *FATP 4* zu den analysierten Zeitpunkten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Inkubationsverlängerung von 60 auf 90 min mit 10 μ M Homoeriodictyol stieg die Genexpression von *FATP 4* von dem $0,87 \pm 0,07$ -Fachen auf das $1,20 \pm 0,05$ -Fache ($p < 0,001$).

Genexpression von *PPAR α* in Caco-2 Enterozyten

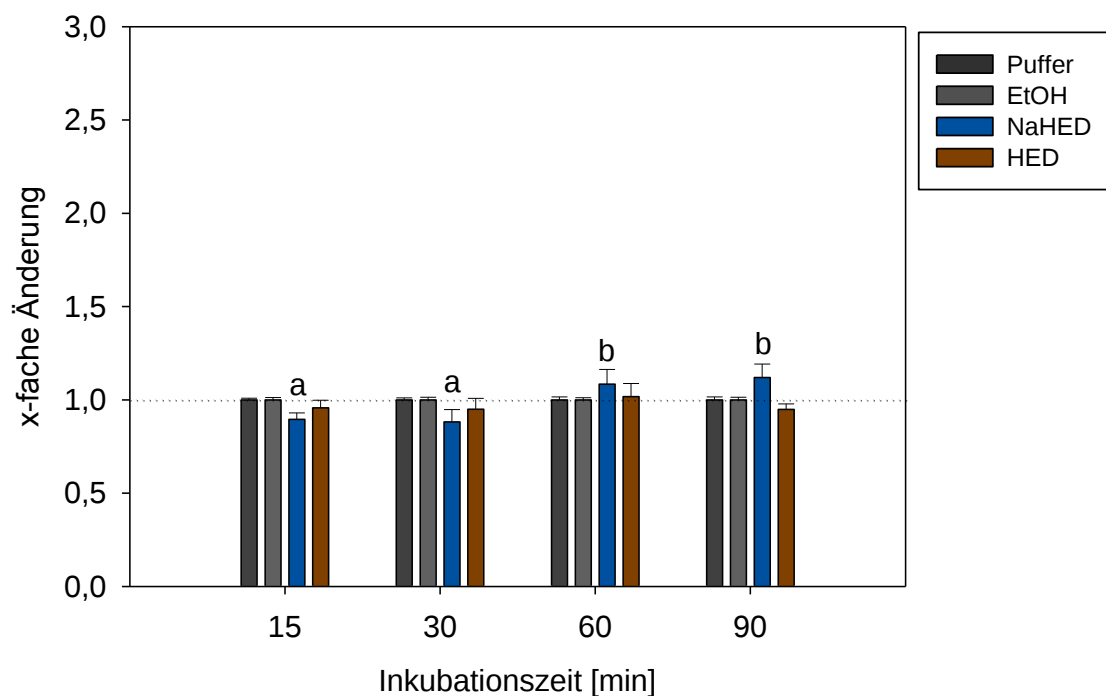


Abb. 13 Genexpression von *PPAR α* nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Puffer (=HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu NaHED, EtOH (=0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu HED. Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) als MW $\pm$ SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,033$) und anschließendem Holm Sidak post hoc Test ($p < 0,05$) getestet. Verschiedene Buchstaben (ab) repräsentieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlungsgruppe zwischen den Zeitpunkten, $n=3-4$, $tR=2-3$. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

Abbildung 13 stellt die Genexpression von *PPARα* nach Inkubation mit 10 μM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Caco-2 Enterozyten dar.

Die Genexpression von *PPARα* wurde nach Inkubation mit 10 μM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz im Vergleich zur Kontrolle zu den analysierten Zeitpunkten nicht beeinflusst.

Nach Inkubation mit 10 μM Homoeriodictyol-Natriumsalz zeigte die Genexpression von *PPARα* einen zeitabhängigen Effekt: nach 15 min ($0,90 \pm 0,04$ -Fache) und 30 min ($0,88 \pm 0,07$ -Fache) unterschied sich die Genexpression von *PPARα* von jener nach Inkubation für 60 min ($1,08 \pm 0,08$ -Fache) oder 90 min ($1,12 \pm 0,07$ -Fache) ($p < 0,002$).

Genexpression von *PPARγ* in Caco-2 Enterozyten

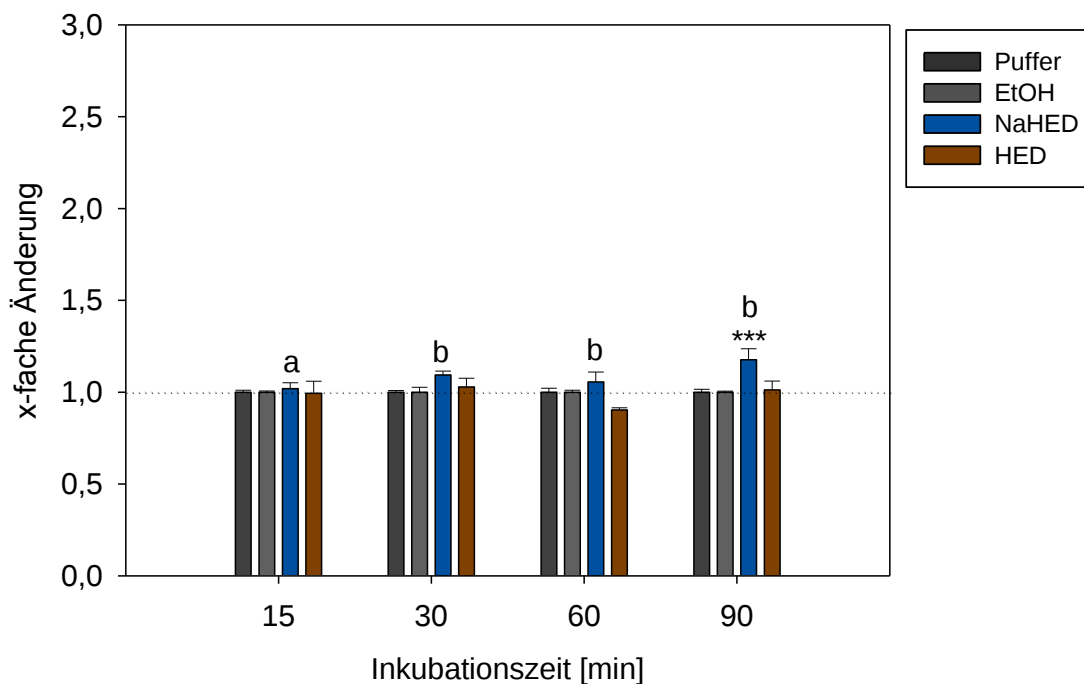


Abb. 14 Genexpression von *PPARγ* nach 15-, 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation mit 10 μM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten

Puffer (=HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu NaHED, EtOH (=0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer): Kontrolle zu HED. Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) als MW ± SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit zweifaktorieller ANOVA ($p < 0,001$) und anschließendem Holm Sidak post hoc Test ($p = 0,05$) getestet. Verschiedene Buchstaben (ab) repräsentieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlungsgruppe zwischen den Zeitpunkten, ***($p < 0,001$) zeigt signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, n=3-4, tR=2-3. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

Abbildung 14 zeigt den Einfluss der Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz auf die Genexpression von *PPAR γ* zu unterschiedlichen Zeiten in Caco-2 Enterozyten.

Die Genexpression von *PPAR γ* wurde durch die Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz beeinflusst, nach 90 min wurde *PPAR γ* auf das $1,18 \pm 0,06$ -Fache ($p < 0,001$) verglichen mit der Kontrolle hochreguliert.

Die Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol zeigte keinen Einfluss auf die Genexpression von *PPAR γ* zu den analysierten Zeitpunkten in Caco-2-Zellen.

4.4 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Glukoseaufnahme in Caco-2 Enterozyten

Um festzustellen, ob die Flavonoide Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz die intestinale Glukoseaufnahme beeinflussen, wurde dies in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen der Testverbindungen in Caco-2 Zellen untersucht.

In Abbildung 15 ist die Glukoseaufnahme nach 60-minütiger Inkubation mit 10 nM bis 100 μ M Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen dargestellt. Die Glukoseaufnahme nach Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz unterschied sich von der Glukoseaufnahme nach Inkubationen mit den übrigen analysierten Substanzen ($p < 0,001$). Weiters unterschied sich die Glukoseaufnahme nach Inkubation mit Hesperetin von der Glukoseaufnahme nach Inkubation mit Eriodictyol ($p < 0,001$) bzw. Sterubin ($p = 0,002$).

Die Signifikanzanalyse der einzelnen Verbindungen mit ANOVA nach Rängen oder einfaktorieller Varianzanalyse zeigte, dass die Glukoseaufnahme nach Inkubation mit 10 nM bis 100 μ M Phloretin nicht beeinflusst wurde.

Die Inkubation mit 10 nM bis 100 μ M Sterubin ergab ebenfalls keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme in Caco-2 Zellen.

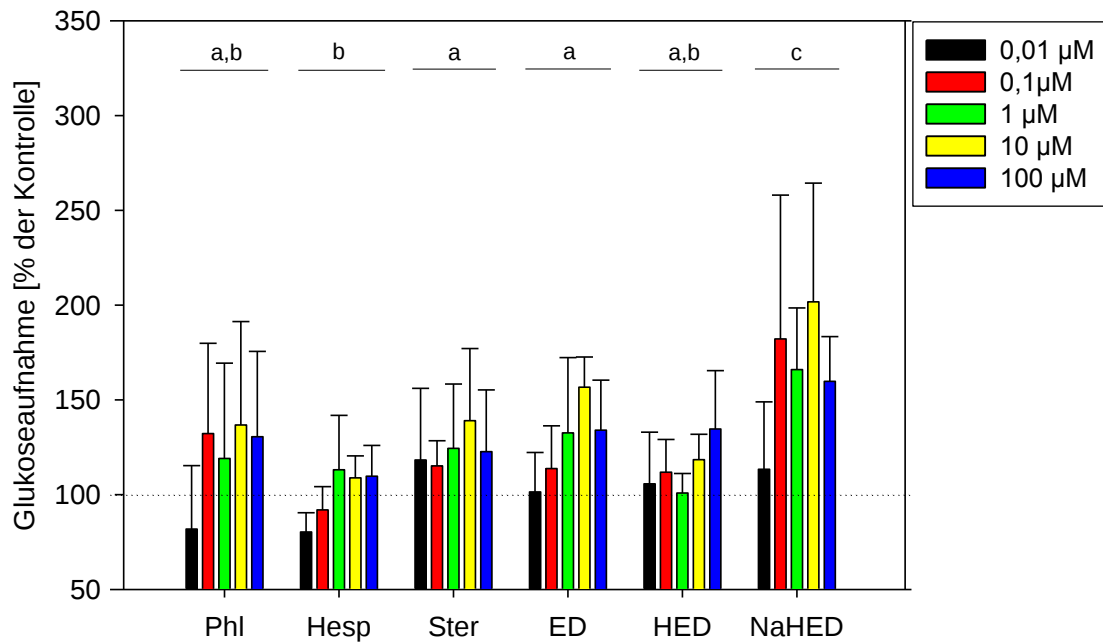


Abb. 15 Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation und 30-minütiger Inkubation nach Zugabe des 2-NBDG-Farbstoffes mit 0,01 bis 100 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen

Ergebnisse sind in % zur Kontrolle (=100%) (0,1% Lösungsmittel in HBSS/HEPES Puffer) als MW $\pm$ SD angegeben. Die Signifikanzanalyse wurde mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,037$) und nachfolgendem Holm-Sidak post hoc Test ($p=0,05$) durchgeführt. Verschiedene Buchstaben (abc) repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, $n=3-4$, $tR=1-3$. Abkürzungen: Phl (Phloretin), Hesp (Hesperetin), Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol), HED (Homoeriodictyol), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

Die einfaktorielle Varianzanalyse ($p=0,008$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test ($p=0,05$) ergab, dass sich die Glukoseaufnahme nach Inkubation mit 10 nM bis 100 µM Hesperetin nicht von der Kontrolle unterscheidet. Nach Inkubation mit 1 µM Hesperetin wurde um 32,8 % ($p<0,001$) mehr Glukose aufgenommen als nach Inkubation mit 10 nM Hesperetin.

Verglichen mit der Kontrolle[†] zeigte sich nach Inkubation mit 1 µM, 10 µM und 100 µM Eriodictyol ein Glukoseanstieg von $32,6 \pm 39,7$ % ($p<0,05$), $56,7 \pm 15,9$ % ($p<0,05$) und $34,0 \pm 26,4$ % ($p<0,05$). Weiters nahmen Caco-2 Zellen nach Inkubation mit 10 µM Eriodictyol um 55,3 % ($p<0,05$) mehr Glukose auf als nach Inkubation mit 10 nM Eriodictyol.

[†] ANOVA nach Rängen ($p<0,001$) mit anschließendem Dunn's post hoc Test ($p<0,05$), graphisch nicht dargestellt.

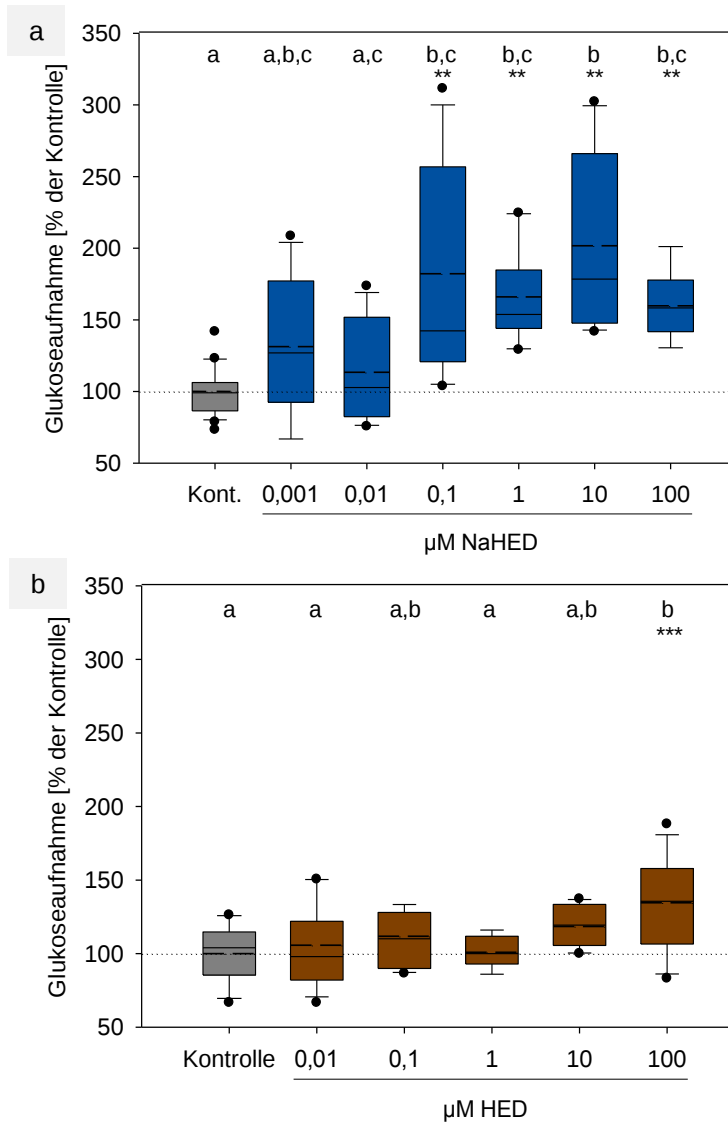


Abb. 16 Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation und 30-minütiger Inkubation nach Zugabe des 2-NBDG-Farbstoffes mit 0,001 bis 100 µM Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz in Caco-2 Zellen

a: Ergebnisse von NaHED sind in % zur Kontrolle (HBSS/HEPES Puffer) als Boxplot dargestellt und im Text mit $MW \pm SD$ angegeben. Signifikanz wurde mit ANOVA nach Rängen ($p < 0,001$) und nachfolgendem Dunn's post hoc Test ($p < 0,01$) analysiert. **b:** Ergebnisse von HED sind in % der Kontrolle (0,1% Ethanol in HBSS/HEPES Puffer) als Boxplot dargestellt und im Text mit $MW \pm SD$ angegeben. Signifikanz wurde mit einfaktorieller ANOVA ($p = 0,001$) und nachfolgendem Holm-Sidak post hoc Test ($p = 0,05$) getestet. *** ($p < 0,001$) und ** ($p < 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle und verschiedene Buchstaben (abc) zwischen den Gruppen, $n = 3$, $tR = 1-3$. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

Mittelwert — — —, Median ———

Aus dem Substanzvergleich (Abb.15) geht hervor, dass die Glukoseaufnahme durch Inkubation mit Homoeriodictyol bzw. mit dessen Natriumsalz

unterschiedlich beeinflusst wird. Daher sind diese Ergebnisse in Abbildung 16a und b detaillierter dargestellt.

Abbildung 16a stellt die Glukoseaufnahme nach 60-minütiger Inkubation mit 1 nM bis 100 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten dar. Den höchsten Anstieg der Glukose um $102 \pm 62,6 \%$ ($p < 0,01$) verglichen mit der Kontrolle (=100 %) löste die Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz aus. Die Inkubation mit 100 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz zeigte eine Steigerung der Glukoseaufnahme um $59,8 \pm 23,6 \%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliche Veränderungen wurden durch Inkubation mit 1 μ M und 0,1 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz erreicht. So stieg die Glukoseaufnahme um $66,0 \pm 32,5 \%$ ($p < 0,01$) bzw. $82,2 \pm 75,9 \%$ ($p < 0,01$) verglichen mit der Kontrolle. Weiters erhöhte sich die Glukoseaufnahme nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz um 88,3 % ($p < 0,01$) im Vergleich zur Inkubation mit 10 nM Homoeriodictyol-Natriumsalz.

Abbildung 16b zeigt den Einfluss der 60-minütigen Inkubation mit 10 nM bis 100 μ M Homoeriodictyol auf die Glukoseaufnahme in Caco-2 Zellen. Nach Inkubation mit 100 μ M Homoeriodictyol konnte ein Anstieg von $34,6 \pm 30,8 \%$ ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (=100%) gemessen werden.

4.5 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die metabolische Aktivität der 3T3-L1 Adipozyten

Um eine Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität in Adipozyten durch die Testverbindungen auszuschließen, wurde die metabolische Aktivität in 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit den Flavanonen Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz in den höchsten Konzentrationen überprüft.

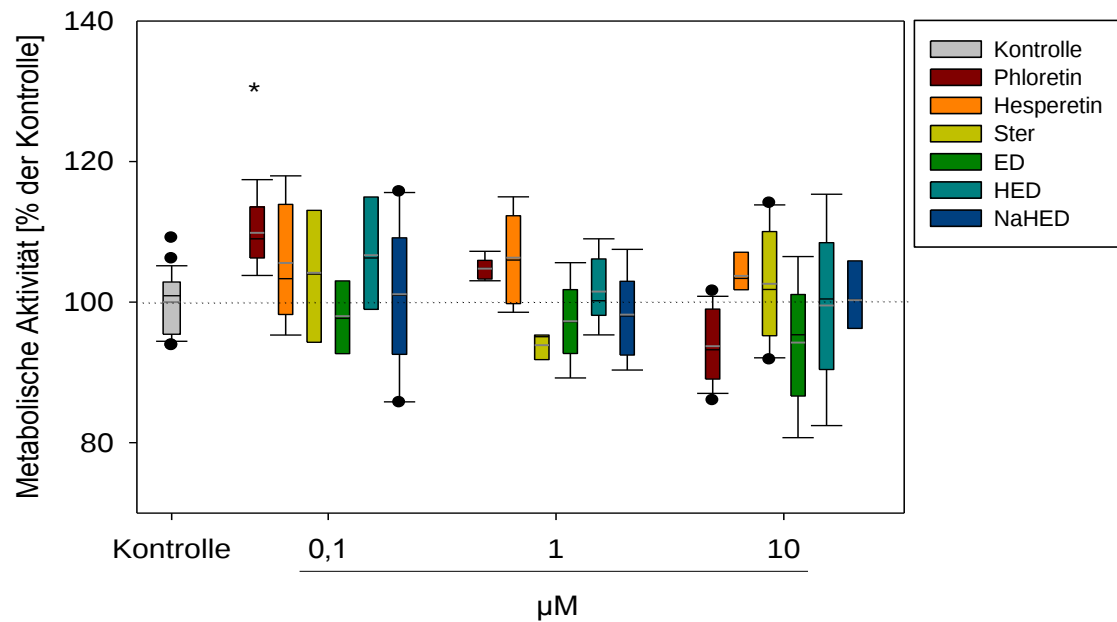


Abb. 17 Metabolische Aktivität nach 90-minütiger Inkubation mit 0,1 bis 10 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in 3T3-L1-Adipozyten

Signifikanz wurde mit ANOVA nach Rängen ($p < 0,001$) mit anschließendem Dunn's post hoc-Test ($p < 0,05$) getestet. Ergebnisse sind in % der Kontrolle (=100%, Inkubationsmedium) als Boxplot dargestellt und im Text als $MW \pm SD$ angegeben. * ($p < 0,05$) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, $n=3-6$, $tR=2-3$. Graue Linien zeigen den Mittelwert, schwarze den Median. Abkürzungen: Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol), HED (Homoeriodictyol), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

Abbildung 17 zeigt die metabolische Aktivität nach 90-minütiger Inkubation mit 0,1 µM, 1 µM oder 10 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Adipozyten.

Keine der getesteten Verbindungen verursachte in den Konzentrationen 0,1 µM bis 10 µM eine Verringerung der metabolischen Aktivität. Daher kann eine Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität durch die Testsubstanzen in den Konzentrationen 0,1 µM bis 10 µM in 3T3-L1 Adipozyten ausgeschlossen werden.

Nach Inkubation mit 0,1 µM Phloretin stieg die metabolische Aktivität um $9,87 \pm 4,37$ % ($p < 0,05$) verglichen mit der Kontrolle.

4.6 Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten

Um den Einfluss der Fettsäureaufnahme durch die Flavanone Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf ein peripheres Gewebe zu untersuchen, wurde das Fettgewebe ausgewählt. Im Rahmen eines Substanzvergleiches wurden die genannten Flavanone in verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich deren Einfluss auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten analysiert.

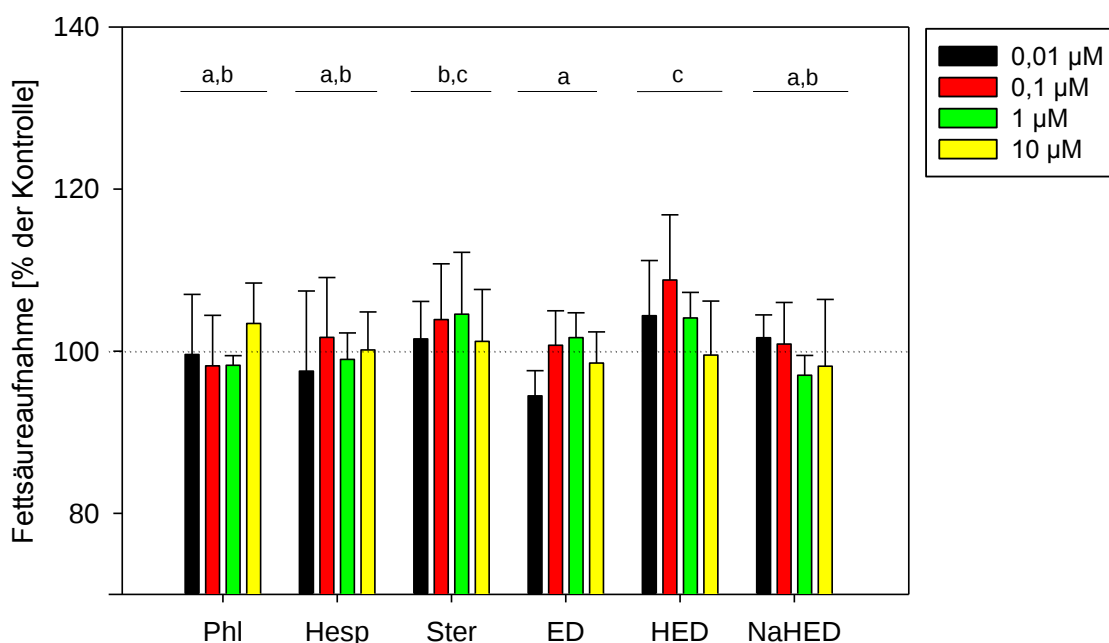


Abb. 18 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 10 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in 3T3-L1 Adipozyten

Nach Präinkubation und anschließender 60-minütiger Fluoreszenzmessung, wurde die AUC der Veränderung der Fluoreszenz während der Zeitmesspunkte berechnet, Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle ($\approx 100\%$, 0,1% Lösungsmittel in HBSS/HEPES Puffer) mit $MW \pm SD$ angegeben. Signifikanz wurde mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,027$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p=0,05$) getestet. Verschiedene Buchstaben (abc) zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, $n=5-4$, $tR=1-3$. Abkürzungen: Phl (Phloretin), Hesp (Hesperetin), Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol), HED (Homoeriodictyol), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

Abbildung 18 zeigt den Einfluss der 30-minütigen Präinkubation und Messung der AUC für eine Stunde mit 10 nM bis 10 µM Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten.

Die Fettsäureaufnahme wurde nach Inkubation mit Homoeriodictyol im Vergleich zur Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit Phloretin, Hesperetin, Eriodictyol, sowie Homoeriodictyol-Natriumsalz unterschiedlich beeinflusst ($p=0,001$). Nach Inkubation mit Sterubin unterschied sich die Fettsäureaufnahme zu der nach Inkubation mit Eriodictyol ($p=0,003$).

Abgesehen von Homoeriodictyol zeigte keine der getesteten Verbindungen in den Konzentrationen 10 nM bis 10 μ M einen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme im Vergleich zur Kontrolle[‡].

Die Fettsäureaufnahme unterschied sich nach Inkubation mit Homoeriodictyol signifikant zu der Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit dessen Natriumsalz. In Abbildung 19a und b ist der Einfluss nach 30-minütiger Präinkubation und Messung der AUC für eine Stunde mit 10 nM bis 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten gegenübergestellt.

Die Inkubation mit 10 nM bis 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz zeigte in keiner untersuchten Konzentration einen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten.

Nach Inkubation mit 0,1 μ M Homoeriodictyol stieg die Fettsäureaufnahme im Vergleich zur Kontrolle (=100%) um $8,78 \pm 8,05$ % ($p<0,001$). Verglichen zur Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol stieg die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 0,1 μ M Homoeriodictyol signifikant um 9,25 % ($p=0,002$).

[‡] Signifikanzanalyse mit zweifaktorieller ANOVA ($p=0,002$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc test ($p=0,05$).

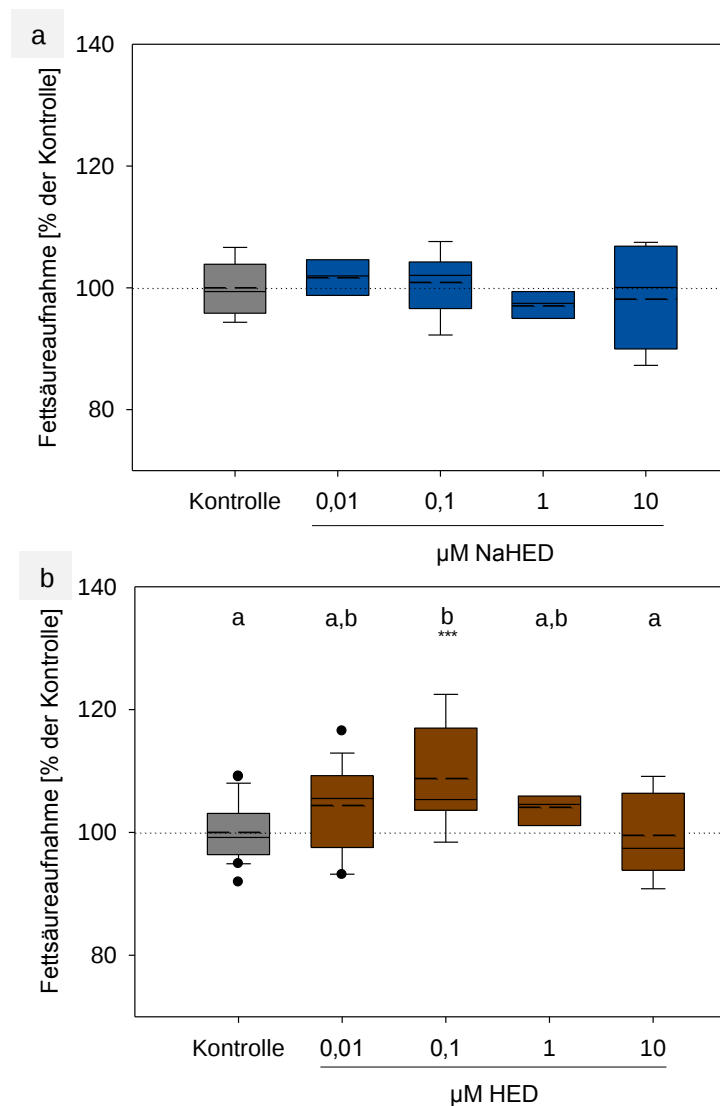


Abb. 19 Fettsäureaufnahme nach 30-minütiger Präinkubation mit 0,01 bis 10 μM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in 3T3-L1 Adipozyten

Nach Präinkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz (a) oder Homoeriodictyol (b) und anschließender 60-minütiger Fluoreszenzmessung, wurde die AUC der Veränderung der Fluoreszenz während der Zeitmesspunkte berechnet. Ergebnisse sind in % der Kontrolle ($\approx 100\%$, 0,1% Lösungsmittel in HBSS/HEPES Puffer) als Boxplot dargestellt und im Text mit $\text{MW} \pm \text{SD}$ angegeben. a: Signifikanz wurde mit ANOVA nach Rängen getestet und Ergebnisse in Prozent der Kontrolle (HBSS/HEPES Puffer) als Boxplot dargestellt, $n=3$ und $tR=2-3$; b: Signifikanzanalyse wurde mit einfaktorieller ANOVA ($p=0,003$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p=0,05$) durchgeführt, $n=3-4$, $tR=2-3$. Verschiedene Buchstaben (ab) zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, ***($p<0,001$) vs. Kontrolle. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)
Mittelwert — — —, Median —

5 DISKUSSION

Hohe Konzentrationen an Lipiden im Blutkreislauf können schädlich wirken, wenn die Kapazitäten der Zellen, Fettsäuren zu speichern oder zu metabolisieren, ausgelastet sind. Werden Lipide nicht aus dem Blut entfernt, können sie zur Bildung von atherogenen Schaumzellen beitragen [BOTHAM et al., 2007]. Zudem stellen erhöhte Triglyzeride im Blut einen Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen dar. Daher sollten zu hohe Plasmatriglyzeride vermieden werden [BOULLART et al., 2011], [MOSCA et al., 2011].

Eine Reduzierung der Blutlipidwerte kann unter anderem durch verringerte Resorption der Nahrungslipide im Intestinaltrakt, verminderte Lipoproteinproduktion in Enterozyten bzw. Leber oder erhöhte Oxidation von Lipiden in den Geweben erreicht werden. In den letzten Jahren wurde immer mehr bekannt, dass sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, allen voran Flavonoide, die Blutlipide positiv beeinflussen [FRIEDRICH et al., 2012], [MIWA et al., 2005]. So wurde der Triglyzerid- und Cholesterolspiegel in einem Tierversuch an Ratten durch Verabreichung von Hesperetin (5 mg/kg Körpergewicht) zu cholesterolreichen (1 %) Futter gesenkt. Dabei wurde die Aktivität der hepatischen ACAT reduziert, wodurch die Synthese von Lipoproteinen die ApoB enthalten (wie VLDL) gehemmt werden kann. Dadurch kann in weiterer Folge der Gehalt an Triglyzeriden und Cholesterol im Blut verringert werden [KIM et al., 2003]. In einer weiteren Studie wurden die postprandialen Triglyzeride im Plasma von Mäusen nach Verabreichung von 0,5 % bzw. 1 % Epigallocatechingallat (EGCG) (0,83 g/kg Körpergewicht bzw. 1,67 g/kg Körpergewicht) zu fettreichem Futter (40 % der Energie aus Fett) für vier Tage im Vergleich zur Kontrolle ohne EGCG verringert. Darüber hinaus wurde nach achttägiger Zugabe von 0,5 % EGCG der Fettsäuregehalt im Plasma in der Nüchternphase reduziert. In dem Fäzes dieser Versuchstiere wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt ¹³C-markierte Fettsäuren gemessen, das auf eine verringerte Resorption und eine erhöhte Ausscheidung von Nahrungslipiden durch EGCG deutet [FRIEDRICH et al., 2012].

Aufgrund der verringerten Fettabsorption durch Verabreichung von EGCG aus der Studie von Friedrich et al., 2012 wurde in der vorliegenden Arbeit der direkte Einfluss der Flavanone Homoeriodictyol (HED) und dessen Natriumsalz (NaHED) sowie Hesperetin, Sterubin (Ster), Eriodictyol und das Dihydrochalkon Phloretin auf die intestinale Fettsäureresorption in Enterozyten, als primäre Zellen des Gastrointestinaltraktes untersucht. Die vorliegende Untersuchung stellt somit einen möglichen Mechanismus dar, um die Triglyzeridmenge im Blut zu reduzieren.

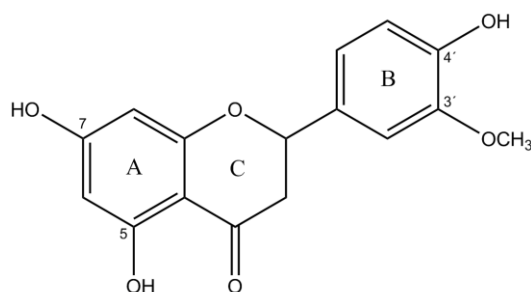
Ein negativer Einfluss der Testverbindungen auf die metabolische Aktivität der intestinalen Zellen wurde vor Beginn der Untersuchungen in den höchsten Konzentrationen (100 μ M, 10 μ M und 1 μ M) in Caco-2 Zellen ausgeschlossen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, strukturelle Determinanten innerhalb der Flavanone zu finden, die die Resorption von Fettsäuren in intestinalen Zellen beeinflussen.

Im Rahmen des Substanzvergleiches zeigten Caco-2 Zellen nach 90-minütiger Inkubation mit 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz eine Reduktion der Fettsäureaufnahme um $12,5 \pm 6,18$ %, $11,9 \pm 1,91$ % beziehungsweise $15,2 \pm 9,69$ % im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit 100 μ M Hesperetin verringerte sich die Fettsäureaufnahme um $15,8 \pm 15,8$ % verglichen mit der Kontrolle. Schließlich reduzierte sich die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit 10 μ M und 100 μ M Sterubin um $10,6 \pm 3,44$ % beziehungsweise $14,8 \pm 6,53$ % im Vergleich zur Kontrolle.

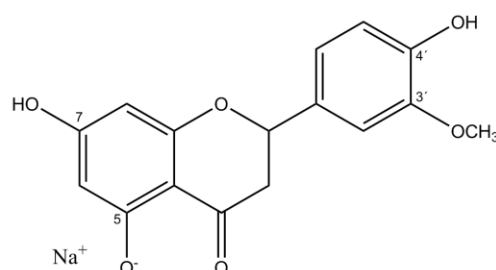
Während in Gegenwart von Homoeriodictyol-Natriumsalz die intestinale Fettsäureaufnahme verringert wurde, führte die Inkubation mit 10 μ M und 100 μ M Homoeriodictyol zu dessen Förderung um $8,62 \pm 3,09$ % bzw. $14,9 \pm 8,79$ % im Vergleich zur Kontrolle. Schließlich beeinflusste die Inkubation mit 10 nM bis 100 μ M Phloretin oder Eriodictyol die intestinale Fettsäureaufnahme nicht.

Phloretin, als einziges Dihydrochalkon der getesteten Verbindungen, weist eine C-Brücke statt eines C-Rings auf. Weiters unterscheidet es sich durch eine Hydroxylgruppe an Position 6` am A-Ring. Phloretin besitzt, wie Eriodictyol, keine Methoxygruppe. Hingegen enthalten Hesperetin, Sterubin,

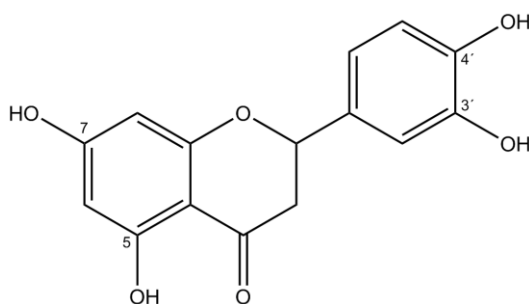
Homoeriodictyol sowie dessen Natriumsalz, die Veränderungen der intestinalen Fettsäureaufnahme verursachten, je eine Methoxygruppe. Die Strukturformeln der untersuchten Substanzen sind in Abbildung 20 dargestellt.



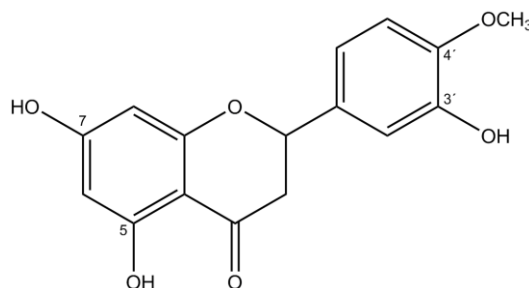
Homoeriodictyol



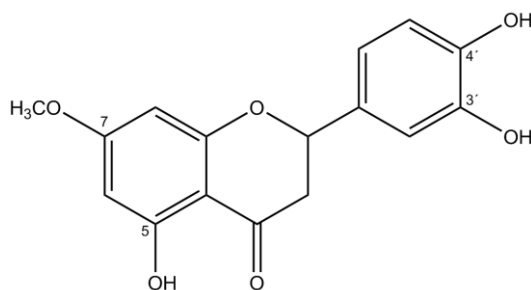
Homoeriodictyol-Natriumsalz



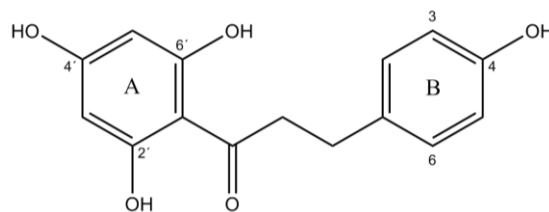
Eriodictyol



Hesperetin



Sterubin



Phloretin

Abb. 20 Strukturformeln von Homoeriodictyol, dessen Natriumsalz, Eriodictyol, Hesperetin, Sterubin und Phloretin

Da Phloretin und Eriodictyol die intestinale Fettsäureaufnahme nicht beeinflussten, könnte die Methylierung einer Hydroxylgruppe bei Flavanonen ausschlaggebend für die Wirkung auf die intestinale Fettsäureaufnahme sein. Durch Methylierung werden die Verbindungen lipophiler und dadurch leichter resorbierbar [HEIM et al., 2002]. Denn damit steigt die Affinität zur Zellmembran

[MUROTA et al., 2000] und die Substanzen könnten leichter in Enterozyten diffundieren, um dort eine Wirkung auf die Fettsäureaufnahme zu erzielen.

Ähnliche Ergebnisse wurden durch die strukturelle Verwandtschaft der Pyridin-Derivate in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt [RIEDEL et al., 2014]. Unter den Substituenten, die den Einfluss der Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen bestimmten, kam ebenfalls die Anwesenheit von Methylgruppen in Frage [RIEDEL et al., 2014].

In der vorliegenden Arbeit konnte weiters gezeigt werden, dass das Natriumsalz von Homoeriodictyol die intestinale Fettsäureaufnahme herabsetzten. Die erhöhte Natriumkonzentration könnte die Fettsäureaufnahme behindern. Ein vermehrter Eintritt von Natriumionen in die Zelle könnte in weiterer Folge den Natrium/kurzkettige Fettsäure-Symporter (SLC5A8) blockieren [ROHM et al., 2015]. Auf diese Weise könnte die Fettsäureaufnahme vermindert worden sein. Diese Theorie widerspricht einer Veröffentlichung von Vyska et al, 1994. In dieser Untersuchung, an primären Leberzellen, stieg die Fettsäureaufnahme bei Anwesenheit von Natrium im Vergleich zur Fettsäureaufnahme in natriumfreier Umgebung [VYSKA et al., 1994]. Es ist zu erwähnen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht mit Resultaten aus Versuchen, die mit natriumfreien Puffer durchgeführt worden waren, verglichen wurden. In zukünftigen Untersuchungen sollte dieser Aspekt berücksichtigt werden. Die Hypothese, dass die intestinale Fettsäureaufnahme in Enterozyten durch Natriumsalze beeinträchtigt wird, könnte dadurch geklärt werden.

Darüber hinaus wurde die Löslichkeit des Natriumsalzes von Homoeriodictyol zwar optisch überprüft, jedoch kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, dass diese Substanzen in der angegebenen Konzentration oder noch als ungelöste Salze in der Lösung vorlagen. Daher kann die reduzierende Wirkung auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen dieser Substanzen nicht auf die erhöhte Natriumkonzentration zurückgeführt werden und benötigt weitere Untersuchungen, um dies zu klären.

Der einzige Unterschied der Isomere Hesperetin und Homoeriodictyol liegt an der Isovanillyl- beziehungsweise Vanillylgruppe am B-Ring. Die Isovanillylgruppe führte nach Inkubation mit 100 μ M Hesperetin zu einer

Reduktion der intestinalen Fettsäureaufnahme um $15,8 \pm 15,8$ %, während die Vanillylgruppe von Homoeriodictyol in derselben Konzentration die Fettsäureaufnahme in einem ähnlichen Ausmaß ($14,9 \pm 8,8$ %) steigerte. So könnten diese Substituenten als bedeutsame Parameter für die Wirksamkeit der intestinalen Fettsäureaufnahme agieren. Ergebnisse einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe [ROHM et al., 2015] zeigten jedoch, dass $0,1 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$ Vanillin als Reinsubstanz nach 30-minütiger Präinkubation und Messung der AUC für eine Stunde keinen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen hatte [ROHM et al., 2015]. Dennoch könnte der hemmende beziehungsweise fördernde Effekt der Isovanillyl- oder Vanillyl-Reste auf die intestinale Fettsäureaufnahme speziell für das Flavan-Grundgerüst gelten.

Diese kleinen strukturellen Unterschiede spiegeln sich ebenfalls in der bittermaskierenden Eigenschaft der Flavanone wider. Eriodictyol und Homoeriodictyol-Natriumsalz ($100 \text{ mg} / \text{L}$) setzen die Bitterkeit von $500 \text{ mg} / \text{L}$ Koffein am stärksten herab (etwa 40 % Verringerung des bitteren Geschmackes im Vergleich zu reinem Koffein). Homoeriodictyol und Sterubin zeigten ebenfalls eine Reduzierung (etwa 20 %) des bitteren Geschmackes, jedoch weniger ausgeprägt. Hesperetin führte zu keiner signifikanten Abschwächung des bitteren Geschmackes von Koffein [LEY et al., 2005]. Auch Phloretin ist ein potenter Bittermaskierer gegenüber Koffein und Chinin [LEY et al., 2012].

Die Reduktion der Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit Hesperetin, Sterubin und des Natriumsalzes von Homoeriodictyol in den Enterozyten aus der vorliegenden Arbeit gehen im weiteren Sinne mit den Ergebnissen einer anderen Studie an Caco-2 Enterozyten [DO et al., 2011] einher: Nach 60-minütiger Behandlung der Zellen mit schwarzem oder weißem Sojabohnenextrakt sank die Fettsäureaufnahme um 16,7 % beziehungsweise 28,3 % [DO et al., 2011]. Die hemmende Wirkung der Sojabohnenextrakte auf die Fettsäureaufnahme stellt nicht den Einfluss der reinen Flavonoide dar, da in dem verwendeten Hexanextrakt noch andere Substanzen vorhanden sein können. In der wissenschaftlichen Literatur wurden jedoch nur wenig vergleichbare Studien mit Caco-2 Zellen durchgeführt, die die intestinale Fettsäureaufnahme untersuchten. Daher wurden die Ergebnisse von Do et al.,

2011 herangezogen, denn Sojabohnen enthalten etwa zwei mg Isoflavone pro 100 g Trockengewicht [MALENCIC et al., 2012] (der genaue Gehalt im Extrakt wurde in der Studie von Do et al., 2011 nicht angegeben). Isoflavone sind Flavonoide, die den Flavanonen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, strukturell ähnlich sind (siehe Abb. 1). Die Studie gibt dennoch Hinweise auf einen möglichen Effekt der Isoflavone, die intestinale Fettsäureaufnahme zu verringern. Zudem gehen die Ergebnisse von Hesperetin, aus der vorliegenden Arbeit, mit jenen aus einem Tierversuch mit männlichen Ratten einher. Diese Studie zeigte, dass eine Zugabe von 0,02 % (0,066 mmol / 100g Futter) Hesperetin zu cholesterolreichen Futter (1 %), den Triglyzerid- und Cholesterolspiegel im Plasma nach fünf Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Hesperetin im Futter signifikant reduzierte. Das Gesamt-Cholesterol:HDL-Cholesterol Verhältnis verbesserte sich ebenfalls durch Fütterung mit Hesperetin [KIM et al., 2003]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Humanstudie mit 25 Männern. Hierbei wurden täglich 500 mg Hesperidin (Hesperetin-7-Rutinoglukosid) für 24 Wochen in Tablettenform verabreicht. In der Hypertriglyzeridämie-Gruppe sanken die Triglyzeridkonzentrationen im Plasma durch die Intervention um 34 %. Bei Probanden mit normalen Triglyzeridwerten waren keine Unterschiede auf den Triglyzeridspiegel bemerkbar [MIWA et al., 2005]. Es ist mechanistisch nicht geklärt, aber eventuell könnte Hesperetin (das Aglykon von Hesperetin-7-Rutinoglukosid) die intestinale Fettsäureaufnahme verringern und dadurch einen Beitrag zur Senkung der Triglyzeridwerte im Plasma leisten. Da sich die getesteten Substanzen strukturell sehr ähnlich sind, könnte diese Eigenschaft auch auf ähnliche Verbindungen zutreffen.

In vitro Daten aus der Literatur zeigten eine Reduktion der Fettsäureaufnahme um 14 ± 4 % nach Inkubation mit 200 μ M Phloretin in enteroendokrinen Zellen [POREBA et al., 2012]. Phloretin wird schon lange zur Blockierung der Fettsäureaufnahme in verschiedenen Zellmodellen verwendet [ABUMRAD et al., 1981]. Hingegen waren im Zuge der vorliegenden Arbeit nach Inkubation mit 10 nM bis 100 μ M Phloretin keine signifikanten Unterschiede auf die intestinale Fettsäureaufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen.

Möglicherweise tritt eine Inhibierung der Fettsäureaufnahme erst ab einer höheren Konzentration von Phloretin auf, denn die oben genannten Studien verwendeten 200 μM Phloretin [POREBA et al., 2012], [ABUMRAD et al., 1981].

Diskussion zum Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression ausgewählter Fettsäuretransporter in Caco-2 Enterozyten

Um herauszufinden, welcher Mechanismus für den unterschiedlichen Effekt von Homoeriodictyol bzw. dessen Natriumsalz auf die intestinale Fettsäureaufnahme verantwortlich ist, wurde mit diesen Verbindungen eine zeitabhängige Untersuchung der Fettsäuretransporter auf Genexpressionsebene durchgeführt.

Die molekularen Mechanismen der zellulären Fettsäureaufnahme sind bislang nicht vollständig geklärt, jedoch wird davon ausgegangen, dass Fettsäuren passiv durch die Zellmembran diffundieren oder aktiv über einen protein-vermittelten Weg mit Fettsäuretransportern in die Zelle gelangen [NIOT et al., 2009]. Wenn die Fettsäurekonzentration intrazellulär höher ist als extrazellulär, zeigte sich der protein-vermittelte Transport oft als die dominierende Form [SCHWENK et al., 2010]. In Enterozyten sind unter anderem CD36, Fettsäure-Bindungsproteine (FABP), sowie die Fettsäure-Transportproteine (FATP) 2 und 4 [WANG et al., 2013] an der Fettsäureaufnahme beteiligt. Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPAR) α und γ spielen im Fettsäuremetabolismus ebenfalls eine tragende Rolle, indem sie die Genexpressionen von vielen Enzymen regulieren, die auch am Energiestoffwechsel beteiligt sind [DESVERGNE et al., 2006]. Sowohl *FATP 2* und *4*, *CD36*, *IFABP* als auch *PPAR α* und γ werden in differenzierten Caco-2 Zellen exprimiert [RIEDEL et al., 2014], [STAHL et al., 1999], [SANDOVAL et al., 2008].

Diskussion zum Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression von CD36

Es sind bereits einige Agonisten von CD36 bekannt. Fettreiche Nahrung oder der hypolipidämische Wirkstoff Bezafibrat induzierten die Expression von CD36 in der Dünndarmmukosa von Ratten [POIRIER et al., 1996]. So könnte Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz CD36 ebenfalls beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die kurzfristige Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol keine signifikanten Effekte auf die Genexpression von CD36 im Vergleich zur Kontrolle. Hingegen wurde CD36 nach 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol-Natriumsalz auf das $2,09 \pm 0,47$ -Fache hochreguliert. Es gibt derzeit wenig wissenschaftliche Literatur, die einen geeigneten Vergleich zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit zulässt. Daher wurden auch Ergebnisse aus Studien mit anderen Zellmodellen und Verbindungen mit unterschiedlicher chemischer Struktur herangezogen.

In einer *in vitro* Studie wurde nach 60-minütiger Inkubation von Caco-2 Zellen mit einem Sojabohnenextrakt die Genexpression von CD36 unter Anwesenheit von Elaidinsäure nicht beeinflusst [Do et al., 2011]. Möglicherweise haben Isoflavone (Struktur siehe Abbildung 1) keine Wirkung auf CD36 oder in dem verwendeten Extrakt waren andere Substanzen enthalten, die eine Wirkung auf CD36 verhinderten.

Hassan et al., 2010 untersuchten, ob die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten durch Anwesenheit von 50 µM Phloretin beeinflusst worden ist. Die mRNA Expression von CD36 wurde dadurch auf das 2,2-Fache hochreguliert [HASSAN et al., 2010]. Dieser Einfluss wurde zwar nicht in intestinalen Zellen gezeigt, deutet dennoch darauf hin, dass bestimmte Flavanone (wie Phloretin und Homoeriodictyol-Natriumsalz) die Genexpression von CD36 regulieren können.

In primären Kardiomyozyten von Ratten führte die 30-minütige Inkubation mit 10 µM oder 50 µM Aliskiren (antihypertonischer Wirkstoff, strukturell nicht mit Flavanonen verwandt) zu einer erhöhten Lokalisation von CD36 an der Plasmamembran. Dieses Ergebnis ging ebenfalls mit einem Anstieg der

Fettsäureaufnahme um 47 % beziehungsweise 86 % nach 120-minütiger Inkubation mit 10 μM oder 50 μM Aliskiren einher. Zudem wurde ein kompensatorischer Abfall des Glukosetransporters GLUT 4 an der Plasmamembran nach 30 min bei den gleichen Inkubationsbedingungen gemessen [RODRÍGUEZ-PENAS et al., 2011]. Diese entgegengesetzte Wirkung von Aliskiren auf die Glukose- und Fettsäuretransporter trifft ebenfalls auf die Ergebnisse von Homoeriodictyol-Natriumsalz aus der vorliegenden Arbeit zu: Die Fettsäureaufnahme sank nach Inkubation mit 0,1 μM bis 10 μM Homoeriodictyol-Natriumsalz in Caco-2 Zellen. Gleichzeitig stieg die Glukoseaufnahme bei den gleichen Inkubationsbedingungen, während CD36 nach Inkubation mit 10 μM Homoeriodictyol-Natriumsalz hochreguliert wurde. So könnte Homoeriodictyol-Natriumsalz die Lokalisation von CD36 an der Membran verringern, welches zu einer kompensatorischen Erhöhung der Aktivität eines Glukosetransporters geführt haben könnte. Beide Veränderungen könnten in weiterer Folge zu einer Gegenregulation von CD36 auf genetischer Ebene führen.

In einem Tierversuch an Mäusen verringerte der Zusatz von 0,50 % Epigallocatechingallat (EGCG, Struktur siehe Abb. 1), das wichtigste Flavanol aus grünem Tee, zu fettreichem Futter nicht nur den Fettsäuregehalt im Plasma, sondern hob auch die Überexpression von CD36, hervorgerufen durch fettreiches Futter, in der intestinalen Mukosa nach acht Tagen wieder auf [FRIEDRICH et al., 2012]. Ob Homoeriodictyol-Natriumsalz in fettreicher Nahrung ähnliche Wirkungen wie EGCG auf die intestinalen Zellen erzielt, wurde im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt. Da Homoeriodictyol-Natriumsalz die intestinale Fettsäureaufnahme reduziert und gleichzeitig die Genexpression von CD36 induziert, könnte dieser Zusammenhang dennoch einen Anhaltspunkt für zukünftige Untersuchungen geben.

Des Weiteren geht ein CD36-Gendefekt mit einem gestörten Metabolismus der Lipoproteine bei Mensch und Maus einher und stellt ein Risiko für die Entwicklung des metabolischen Syndroms dar [DROVER et al., 2005], [NIOT et al., 2009]. In der Annahme, dass Homoeriodictyol-Natriumsalz auch in anderen

Zellen *CD36* induziert, könnte es auf diese Weise das Lipoproteinverhältnis im Blut aufrechterhalten.

Diskussion zum Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression von *IFABP*

Das intestinale FABP (*IFABP* oder *FABP2*) ist entscheidend für den Transport von langkettigen Fettsäuren durch die Zelle. Es fördert ebenso deren Oxidation indem es Fettsäuren zu den Mitochondrien transportiert [STORCH und THUMSER, 2010].

Ezetimib (fluorhaltiges 2-Azetinidone-Derivat, das chemisch nicht mit Flavanonen verwandt ist) ist ein Wirkstoff zur Reduktion der intestinalen Cholesterolabsorption. In einem Tierversuch an Mäusen (10 mg Ezetimib / kg KG zu fettreichen Futter) verringerte diese Substanz die postprandiale Triglyzeridabsorption und die Menge an Triglyzeriden in der intestinalen Lymphe durch reduzierte Genexpression der Fettsäuretransporter *IFABP* und *FATP4* und Enzymen, die an der Triglyzeridsynthese in Enterozyten beteiligt sind (*Stearoyl-CoA Desaturase 1*, *Acyl-CoA-Diglycerid-Acyltransferasen 1* und *2*) im Dünndarm [SANDOVAL et al., 2010]. In ähnlicher Weise könnten auch Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz auf intestinale Zellen wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde *IFABP* nach 60-minütiger Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol auf das $0,69 \pm 0,01$ -Fache herunterreguliert, dennoch förderte Homoeriodictyol in der gleichen Konzentration die intestinale Fettsäureaufnahme. In umgekehrter Weise verhielt sich die Genexpression von *IFABP* nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz: Nach 15-minütiger Inkubation wurde *IFABP* auf das $1,25 \pm 0,13$ -Fache hochreguliert, die intestinale Fettsäureaufnahme war nach Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz wiederum verringert. Hier zeigt sich, dass Homoeriodictyol anders als dessen Natriumsalz wirkt. Wie bereits aus der Diskussion zur Genexpression von *CD36* der vorliegenden Arbeit hervorgeht, weisen die Resultate von *IFABP* ebenfalls auf eine Gegenregulation auf genetischer Ebene aufgrund einer Inhibierung von *IFABP* nach Inkubation mit

Homoeriodictyol-Natriumsalz hin. Homoeriodictyol könnte hingegen die Fettsäureaufnahme aufgrund einer Aktivierung von IFABP auf Proteinebene erhöht haben, was zu einer Gegenregulation von *IFABP* geführt haben könnte. Ein Einfluss von Flavonoiden auf *IFABP* wurde in der Literatur bisher nicht gezeigt. In einer Studie von Do et al., 2010 mit Caco-2 Zellen, wurde die Fettsäureaufnahme nach 60-minütiger Inkubation mit einem flavonoidreichem schwarzen Sojabohnenextrakt reduziert, während bei den gleichen Inkubationsbedingungen unter Anwesenheit von Fettsäuren die Genexpression von *IFABP* nicht beeinflusst wurde [DO et al., 2011]. Es ist fraglich ob Isoflavone aus Sojabohnen (strukturell ähnlich zu Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz) überhaupt auf *IFABP* wirken oder ob im Extrakt Substanzen enthalten waren, die eine mögliche Wirkung inhibiert haben könnten.

Ähnliche Ergebnisse wie Do et al., 2010, wurden in einem Tierversuch mit Mäusen nach acht-tägiger Supplementierung mit 0,25 % oder 0,5 % EGCG zu fettreichem Futter erzielt. In der intestinalen Mukosa der Versuchstiere wurde die Genexpression von *IFABP* im Vergleich zur Placebogruppe nicht beeinflusst [FRIEDRICH et al., 2012]. Möglicherweise wurde die Wirkung von EGCG durch die Anwesenheit von Nahrungsfett in der Studie von Friedrich et al., 2012 herabgesetzt oder dieses Ergebnis zeigt, dass EGCG keinen Einfluss auf *IFABP* hat. Die Resultate von Do et al., 2011 und Friedrich et al., 2012 geben Anlass für weitere Studien, um den Effekt der Flavanone bei Anwesenheit von Fettsäuren auf die Genexpression von Fettsäuretransportern, die an der intestinalen Fettsäureresorption beteiligt sind, zu analysieren.

Diskussion zum Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression von *FATP 2 und 4*

Sowohl FATP2 als auch FATP4 werden in intestinalen Zellen exprimiert und sind in Kombination mit dem Enzym Acyl-Coenzym A Synthetase an der Fettsäureaufnahme beteiligt [SANDOVAL et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von *FATP2* nach 15- bis 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2

Zellen nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die verminderte Wirkung von Homoeriodictyol-Natriumsalz beziehungsweise die fördernde Wirkung von Homoeriodictyol auf die intestinale Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten nicht in Abhängigkeit von *FATP2* erfolgt.

FATP4 steht im engen Zusammenhang mit einer erleichterten Fettsäureaufnahme in Enterozyten [STAHL et al., 1999] und anderen lipidmetabolisierenden Zellen [ZHAN et al., 2012]. Es wird vermutet, dass *FATP4* aufgrund der ACS-Aktivität die Fettsäureaufnahme fördert [MILGER et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurde die intestinale Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz verringert. Dennoch wurde *FATP4* nach 30-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol-Natriumsalz auf das $1,30 \pm 0,21$ -Fache hochreguliert. Dieses Ergebnis könnte, wie bei *CD36*, aufgrund einer Hemmung des Fettsäuretransporters und einer Gegenregulation auf genetischer Ebene hervorgerufen worden sein.

Die Genexpression von *FATP4* wurde nach 15- bis 90-minütiger Inkubation mit 10 µM Homoeriodictyol nicht beeinflusst.

Die Wirkung von Flavonoiden auf die Genexpression von *FATP4* ist in der wissenschaftlichen Literatur kontrovers beschrieben. Do et al., 2010 zeigten nach 60-minütiger Behandlung mit flavonoidreichen Sojabohnen-Extrakten eine Reduktion der Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten. Jedoch beeinflusste dies, unter Anwesenheit von Elaidinsäure, die Genexpression von *FATP4* nicht [DO et al., 2011]. In einem anderen Zellmodell wurde die Genexpression durch Inkubation mit 50 µM Phloretin während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten um das 1,80-Fache erhöht [HASSAN et al., 2010]. In einem Tierversuch wurde die Genexpression von *FATP4* in der intestinalen Mukosa nach achttägiger Zugabe von 0,50 % EGCG zu fettreichem Futter im Vergleich zur Kontrolle ohne EGCG in Mäusen ebenfalls höher exprimiert. Dabei normalisierte EGCG die fettinduzierte verminderte Genexpression von *FATP4* wieder. Gleichzeitig sank die Konzentration der Lipide aus der Nahrung im Plasma. Die Autoren vermuten, dass EGCG die Absorption von Fettsäuren verhindert, da auch vermehrt Nahrungsfett im Fäzes gefunden wurde [FRIEDRICH et al., 2012]. In ähnlicher Weise könnte auch Homoeriodictyol-

Natriumsalz wirken, jedoch werden noch weitere Untersuchungen benötigt, um diese Vermutung zu bestätigen.

Diskussion zum Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression von *PPARα*

PPARs sind nukleare Rezeptoren, die im aktivem Zustand die Transkription unterschiedlicher Gene, die den Fettstoffwechsel modulieren, fördern [DESVERGNE et al., 2006]. *PPARα* induziert die Genexpression von *CD36* und *FATP*, darüber hinaus fördert es die β -Oxidation und induziert Gene des katabolen Lipidstoffwechsel [DESVERGNE et al., 2006]. Fibrate sind synthetische Liganden von *PPARα*, die postprandial Plasma-Triglyzeride reduzieren [UCHIDA et al., 2011]. In Caco-2 Enterozyten förderte die Inkubation mit 50 μ M Bezafibrat für 24 Stunden die Expression von Genen, die an der β -Oxidation beteiligt sind. In dieser Studie wurde die Sekretion von Triglyzeriden und Apolipoprotein B an der basolateralen Seite durch Inkubation von Caco-2 Zellen mit Bezafibrat unterdrückt [KIMURA et al., 2011]. Die Flavanone Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz könnten als natürliche Liganden von *PPARα* fungieren und eventuell ähnliche Wirkungen wie Bezafibrate erzielen. In der vorliegenden Arbeit beeinflusste die 15- bis 90-minütige Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz die Genexpression von *PPARα* in Caco-2 Zellen nicht. In der wissenschaftlichen Literatur wurde noch kein Einfluss von Flavonoiden auf *PPARα* in Enterozyten publiziert. Goldwasser et al., 2010 haben in Hela-Luciferas-Reporter-Zellen (HG₅LN-Zellen) gezeigt, dass das Flavanon Naringenin (240 μ M) als Agonist von *PPARα* fungiert [Goldwasser et al., 2010]. Die Inkubation dauerte in der Studie von Goldwasser et al., 2010 16 Stunden. Möglicherweise könnte eine längere Inkubation in einer höheren Konzentration ebenfalls einen Effekt auf *PPARα* in intestinalen Zellen erzielen. In einem Tierversuch an Ratten erhielten die Muttertiere und deren Nachwuchs (bis zu Tag 48, junges Erwachsenenalter) Futter, das entweder 20 % Sojaprotein (0,13 % Isoflavone) oder 20 % Kasein plus 0,025 % angereichertes Genistein enthielt. Die dritte Gruppe wurde mit Kontrollfutter

(20 % Kasein ohne Genistein) gefüttert. Im Dünndarm der Jungtiere wurde kein Unterschied der mRNA Expression von *PPAR α* zwischen den drei Gruppen gemessen [SIMMEN et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurde *PPAR α* in Caco-2 Enterozyten durch Inkubation mit 10 μ M Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz ebenfalls nicht beeinflusst. Im Versuch von Simmen et al., 2010, stieg *PPAR α* in der Leber der Tiere in der Sojaprotein Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Möglicherweise wird die Genexpression durch Sojaproteine ausgelöst, oder Isoflavone werden erst nach deren Metabolisierung in eine Form umgewandelt, die *PPAR α* induzieren kann [SIMMEN et al., 2010].

Diskussion zum Einfluss von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die Genexpression von *PPAR γ*

Ein weiteres Mitglied der PPAR-Familie, das die Transkription der Gene von Fettsäuretransportern induziert, ist *PPAR γ* . Die Aktivierung dieses nuklearen Rezeptors spielt eine tragende Rolle bei der Fettsäureaufnahme. Darüber hinaus steht dieser Rezeptor im Zusammenhang den Fettsäurespiegel im Blut zu reduzieren, indem er Gene (von u.a. CD36 oder Lipoproteinlipase) reguliert, die an der Fettsäureaufnahme, -freisetzung und -speicherung in peripheren Geweben beteiligt sind [DESVERGNE et al., 2006]. Goldwasser et al., 2010, zeigten in Hela-Luciferase-Reporter-Zellen (HG₅LN-Zellen), dass Flavanone in der Lage sind *PPAR γ* zu aktivieren [Goldwasser et al., 2010]. *PPAR γ* wurde in der vorliegenden Arbeit nach 90-minütiger Inkubation von Caco-2 Enterozyten mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz auf das $1,18 \pm 0,06$ -Fache hochreguliert. Hingegen hatte die 15- bis 90-minütige Inkubation der Caco-2 Zellen mit 10 μ M Homoeriodictyol keinen Einfluss auf die Genexpression von *PPAR γ* . Bisher wurden keine vergleichbaren Versuche, die einen Einfluss von Flavonoiden im selben Zellmodell auf *PPAR γ* untersuchten, veröffentlicht. Daher wurde die Studie von Do et al., 2010 herangezogen, die den Einfluss eines flavonoidhaltigen Sojabohnenextrakt in Caco-2 Zellen untersuchten. In dieser Studie wurde *PPAR γ* nach 60-minütiger Behandlung mit einem flavonoidreichen schwarzen Sojabohnenextrakt, bei Anwesenheit von

Elaidinsäure, auf das 0,28-Fache im Vergleich zur Kontrolle ohne Sojabohnenextrakt herunterreguliert. Bei den gleichen Inkubationsbedingungen sank die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen [DO et al., 2011]. Andere Substanzen aus dem Extrakt könnten diesen Effekt ebenso hervorgerufen haben, denn die Untersuchung umfasste keinen Vergleich mit isolierten Isoflavonen. Dennoch weisen die Resultate von Do et al., 2011 darauf hin, dass die reduzierte Fettsäureaufnahme über *PPAR γ* reguliert wurde. In der vorliegenden Arbeit sank die Fettsäureaufnahme nach 90-minütiger Inkubation der Caco-2 Zellen mit 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz und bei den gleichen Inkubationsbedingungen stieg die Genexpression von *PPAR γ* . Hier wurde die alleinige Wirkung der Flavanone, ohne Zugabe von Fettsäuren, auf die Genexpression analysiert, was die unterschiedlichen Ergebnisse zu Do et al., 2010, erklären könnte. Eine andere Vermutung legt nahe, dass Homoeriodictyol-Natriumsalz, wie schon bei *CD36* und *FATP4* festgestellt, *PPAR γ* auf Proteinebene inhibiert haben könnte und dadurch eine Gegenregulation des Gens auslöst wurde.

Vergleichbare Ergebnisse zu Do et al., 2010, liefert der Tierversuch von Crespillo et al., 2011, der zeigt, dass die Genexpression von *PPAR γ* in der Leber von adipösen Ratten nach 14-tägiger intraperitonealer Applikation von 50 mg Daidzein-7- β -Glukosid / kg KG im Vergleich zur Placebogruppe herunterreguliert wurde. Bei normalgewichtigen Ratten wurde kein Unterschied auf die Genexpression von *PPAR γ* in der Leber gemessen [CRESPILLO et al., 2011]. Diese Ergebnisse zeigten zwar nicht den Einfluss auf intestinale Zellen, geben aber Auskunft darüber, dass Isoflavone die fettinduzierte gesteigerte Genexpression *in vivo* wieder herunterregulieren können und gehen in dieser Hinsicht mit den Ergebnissen von Do et al., 2010, einher. Zukünftige Untersuchungen mit einer kombinatorischen Gabe von Homoeriodictyol-Natriumsalz und Fettsäuren könnten weitere Erkenntnisse darüber bringen. Aktiviertes *PPAR γ* induziert die Genexpression von Fettsäuretransportern [DESVERGNE et al., 2006], daher könnte einzig die Beeinträchtigung von *PPAR γ* genügen, um die Fettsäureaufnahme zu vermindern. Aus der zeitabhängigen Genexpressionsanalyse der vorliegenden Arbeit geht hervor,

dass *PPAR γ* nach 90-minütiger Inkubation von Caco-2 Zellen mit Homoeriodictyol-Natriumsalz hochreguliert wurde. Da *CD36* bei denselben Inkubationsbedingungen ebenfalls induziert wurde, könnte dies in Abhängigkeit von *PPAR γ* erfolgt sein.

Diskussion zum Einfluss ausgewählter Flavanone auf die intestinale Glukoseaufnahme in Caco-2 Enterozyten

Um herauszufinden, ob die Resorption anderer Nährstoffe durch die Flavanone Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz beeinflusst werden kann, wurde deren Effekt auf die intestinale Glukoseaufnahme in Caco-2 Zellen getestet. Nach 60-minütiger Inkubation von Caco-2 Zellen mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Eriodictyol stieg die Glukoseaufnahme um $32,6 \pm 39,7 \%$, $56,7 \pm 15,9 \%$ und $34,0 \pm 26,4 \%$ verglichen mit der Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden in Hepatozyten (HepG2 Zellen) und Adipozyten (3T3-L1 Zellen) bei hoher Glukosekonzentration (30 mM) und Anwesenheit von Insulin (1 μM) nachgewiesen [ZHANG et al., 2012]. Hier induzierte Eriodictyol nach 60 min in einer Konzentration von 25 μM die Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen. In 3T3-L1 Adipozyten stieg die Glukoseaufnahme nach 60-minütiger Inkubation mit 5 μM oder 25 μM Eriodictyol [ZHANG et al., 2012]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Eriodictyol die Glukoseaufnahme in anderen Geweben ebenfalls fördern kann. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind zwar noch nicht geklärt, die Ergebnisse geben dennoch einen Hinweis darauf, dass Eriodictyol die Verteilung von Glukose in periphere Zellen fördern kann. In der vorliegenden Arbeit stieg die Glukoseaufnahme in Caco-2 Enterozyten nach Inkubation mit 100 μM Homoeriodictyol um $34,6 \pm 30,8 \%$ im Vergleich zur Kontrolle an. Die größte Zunahme der Glukose erhielten die Inkubation der Caco-2 Zellen mit 0,1 μM , 1 μM , 10 μM oder 100 μM Homoeriodictyol-Natriumsalz um $82,2 \pm 75,9 \%$, $66,0 \pm 32,5 \%$, $102 \pm 62,6 \%$ bzw. $59,8 \pm 23,6 \%$. Enterozyten könnten die Homoeriodictyol-Natriumsalz-vermittelte Verringerung der Fettsäureaufnahme durch gesteigerte Glukoseabsorption energetisch

kompensieren. Dieser Effekt gilt jedoch nur für Homoeriodictyol-Natriumsalz, denn die übrigen in dieser Arbeit getesteten Verbindungen, erzielten keine Nährstoffkompensation.

Eine andere Studie zeigte eine Beeinträchtigung der Glukoseaufnahme in Caco-2/TC7 Enterozyten durch Flavonoide. Nach Inkubation mit 100 µM Quercetin, Apigenin, Myricetin und Phloretin wurde der natrium-unabhängige Glukosetransport (über GLUT-Transporter) gesenkt. Darüber hinaus wurde in Gegenwart einiger Catechinderivate und Phlorizin (2'-Glukosyl-Phloretin) der natrium-abhängigen Glukose-Transport (über SGLT1) in Caco-2 Enterozyten reduziert [JOHNSTON et al., 2005]. In der hier vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Johnston et al., 2005 nicht bestätigt werden, denn nach 60-minütiger Inkubation zeigte 10 nM bis 100 µM Phloretin keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme. Dies könnte durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen erklärt werden. Einerseits wurde in der Untersuchung von Johnston et al., 2005 der Subklon TC7 von Caco-2 Zellen verwendet. Andererseits wurde in der vorliegenden Arbeit mit 2-NBDG-Farbstoff (200 µM) in glukosefreiem Inkubationsmedium getestet, während Johnston et al, 2005 den radioaktiven D-[³H]-Glukose Indikator (125 kBq / mL) in glukosehaltiger Testlösung (1 mM) verwendete. Es könnte durchaus möglich sein, dass unmarkierte Glukose in die Zellen eingetreten ist und nicht durch den Glukoseaufnahmetest von Johnston et al., 2005 detektiert wurde. Darüber hinaus war die Inkubationszeit von zwei Minuten in der Untersuchung von Johnston et al., 2005 kürzer als die 60-minütige Inkubation in der vorliegenden Arbeit [JOHNSTON et al., 2005]. Phloretin gilt als selektiver Inhibitor von GLUT 2 [KELLETT et al., 2008], während dessen Glykosid Phlorizin zur Hemmung von SGLT1 eingesetzt wird [ALVARADO, 1967]. Bei niedriger Glukosekonzentration ist SGLT1 am aktivsten, während GLUT 2 ab 30 mM Glukose als überwiegender Transporter an der apikalen Seite fungiert [KELLETT et al., 2008]. Die Wirkungslosigkeit von Phloretin, die Glukoseaufnahme in der vorliegende Arbeit zu verringern, könnte dadurch erklärt werden, dass GLUT 2 bei der verwendeten Glukosekonzentration (200 µM 2-NBD-Glukose) an der apikalen Membran nicht oder nur schwach

exprimiert wurde [KELLETT et al., 2008]. Diese Vermutung könnte in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

In einer *in vivo* Studie an Mäusen wurde nach achttägiger Supplementierung mit 0,5 % EGCG zu fettreichem Futter die Genexpression von *SGLT1*, jedoch nicht die von *GLUT 2*, in der intestinalen Mukosa im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hochreguliert [FRIEDRICH et al., 2012]. Hier war eine Reduktion der Genexpression der Glukosetransporter durch fettreiches Futter detektierbar, die der Zusatz von EGCG wieder behob. Die Glukoseabsorption wurde in der Studie von Friedrich et al., 2012 allerdings nicht analysiert [FRIEDRICH et al., 2012]. Dennoch geht aus der Untersuchung von Friedrich et al., 2012 hervor, dass Flavonoide zu einer Nährstoffbalance in den Zellen beitragen können.

In 3T3-L1 Adipozyten stellten Nugent et al., 2001 fest, dass die Proteinexpression der Glukosetransporter GLUT 1 und 4 an der Plasmamembran teilweise durch PPAR γ vermittelt wird [NUGENT et al., 2001]. In Enterozyten werden an der apikalen Seite GLUT 2 und 5 sowie SGLT1 exprimiert [KELLETT et al., 2008]. In der Annahme, dass die Aktivierung von PPAR γ ähnliche Effekte in Enterozyten auslöst, könnte die erhöhte Genexpression des nuklearen Rezeptors nach Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz, die Erhöhung der Glukoseaufnahme ebenfalls erklären.

Neue Erkenntnisse legen nahe, dass künstliche Süßstoffe die intestinale Glukoseaufnahme fördern. Dies geschieht, indem sie die Lokalisation von GLUT 2 auch bei niedriger Glukosekonzentration an der apikalen Seite induzieren [KELLETT et al., 2008]. So wurde die Glukoseaufnahme nach Inkubation mit 10 mM des Süßstoffs Akesulfam K in glukosereicher Umgebung (> 25 mM) in Caco-2 Zellen um 30 % gesteigert [ZHENG und SARR, 2013]. Die Verbindungen Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz, Sterubin und Eriodictyol sind als bittermaskierende Verbindungen bekannt [LEY et al., 2005] und könnten in ähnlicher Weise wie künstliche Süßstoffe die Glukoseaufnahme in intestinalen Zellen fördern.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Verminderung der intestinalen Nährstoffaufnahme durch Homoeriodictyol-Natriumsalz, Hesperetin und

Sterubin führen kann, ist eine veränderte Permeabilität der Plasmamembran. Querzetin, ein Flavonol in Äpfeln und Zwiebeln, erhöhte den parazellulären Widerstand in den Konzentrationen 100 µM bis 200 µM nach 24 Stunden in Caco-2 Zellen. Das *Tight Junction* Protein Claudin-4 wurde dadurch ebenfalls hochreguliert [AMASHEH et al., 2008]. So kann die Barrierefunktion der Membran erhöht und die parazelluläre Diffusion begrenzt werden. Dadurch kann die Nährstoffaufnahme herabgesetzt werden. Da die Messung der Membranpermeabilität der Caco-2 Zellen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, könnte dies in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Diskussion zum Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten

Aufgrund der fördernden Wirkung von Homoeriodictyol und der beeinträchtigenden Wirkung von Hesperetin, Sterubin und Homoeriodictyol-Natriumsalz auf die intestinale Fettsäureaufnahme wurde der Effekt dieser Flavanone auch in einem peripheren Gewebe, genauer in Adipozyten, untersucht. Zuvor wurde eine negative Wirkung der Testverbindungen Phloretin, Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in den Konzentrationen 0,1 µM bis 10 µM auf die metabolische Aktivität in 3T3-L1 Adipozyten ausgeschlossen. Die Inkubation mit 0,1 µM Homoeriodictyol förderte die Fettsäureaufnahme um $8,78 \pm 8,05 \%$ in 3T3-L1 Adipozyten, ähnlich wie in Caco-2 Enterozyten. Diese Wirkung könnte zu einer Reduktion von Fettsäuren bzw. Triglyzeriden im Plasma beitragen. Der Triglyzeridwert im Serum zählt zu einem wichtigen Parametern zur Ermittlung des kardiovaskulären Risikos [BOULLART et al., 2012]

Nach Inkubation mit Phloretin, Hesperetin und Sterubin, Eriodictyol und Homoeriodictyol-Natriumsalz wurde die periphere Fettsäureaufnahme in den Konzentrationen 10 nM bis 10 µM nicht beeinflusst.

In einer *in vitro* Studie wurde die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlung mit flavonoidreichen schwarzen (53,8 mg Querzetinäquivalente / g Extrakt) und weißen (36,1 mg Querzetinäquivalente / g Extrakt) Sojabohnen-

Extrakten für eine Minute um 35 % bis 40 % reduziert [DO et al., 2011]. Die Inkubation mit Sojabohnenöl, das einen geringen Flavonoidgehalt (7,62 mg Quercetinäquivalente / g Extrakt) hatte, verringerte die Fettsäureaufnahme ebenfalls um 31 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fettsäurereduktion nicht durch die vorhandenen Flavonoide ausgelöst wurde [DO et al., 2011]. Wenngleich die Inkubation deutlich kürzer war als die 90-minütige Behandlung in der vorliegenden Arbeit, kann aus der Studie von Do et al., 2010 und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht geschlossen werden, dass die getesteten Flavonoide die periphere Fettsäureaufnahme in Adipozyten reduzieren. Hassan et al., 2010 analysierten die Expression zahlreicher stoffwechselrelevanter Gene nach Inkubation mit 50 μ M Phloretin während der Differenzierung zu 3T3-L1 Adipozyten. Zu den hochregulierten Genen zählten unter anderem die an der Differenzierung beteiligten Transkriptionsfaktoren *PPAR γ* und *C/EBP α* oder Zielgene von *PPAR γ* , wie die Fettsäuretransporter *CD36*, *FATP4*, *FABP4* und *FABP5* [HASSAN et al., 2010]. Eventuell könnte Phloretin in höherer Konzentration dazu beitragen, dass mehr Fettsäuren in Adipozyten gelangen und so deren Gehalt im Plasma verringert wird. Homoeriodictyol könnte in ähnlicher Weise wirken, da es, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Fettsäureaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten erhöhte. Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, dass Homoeriodictyol, wie Glykosyl-Hesperidin, die Triglyzeridkonzentration im Plasma verbessert [MIWA et al., 2005]. In einer 24-wöchigen Interventionsstudie mit Männern, die an Hypertriglyzeridämie litten, verbesserte sich deren Triglyzeridlevel im Plasma nach Verabreichung von 500 mg Glykosyl-Hesperidin pro Tag [MIWA et al., 2005]. Darüber hinaus verringerte der acht-tägige Zusatz von 0,5 % EGCG (0,83 g/kg KG) zu fettreichem Futter die Konzentration von Nahrungslipiden im Plasma und deren Einbau in das viszerale Fettgewebe und anderen peripheren Geweben von Mäusen [FRIEDRICH et al., 2012]. Die Autoren kamen zu der Erkenntnis, dass EGCG die Fettresorption vermindert und dessen Ausscheidung fördert [FRIEDRICH et al., 2012]. Um zu klären, ob Homoeriodictyol und andere Flavanone in höherer Dosierung in ähnlicher

Weise wie EGCG oder Glykosyl-Hesperidin zu einem verbesserten Blutbild beitragen, könnten *in vivo* Studien weiter darüber Auskunft geben.

Flavonoide werden auf dem Weg durch den Körper metabolisiert und nur ein bestimmter Teil der konsumierten Flavonoide gelangen zu den Zielzellen, wo sie ihre Wirkungen entfalten.

Die Menge an vorhandenen Flavonoiden im Darm kann nicht genau bestimmt werden. In der Annahme, dass 24 % der oral verabreichten Flavonoidmenge im Intestinaltrakt vorhanden ist (Daten stammen aus einer Humanstudie mit Ileostomiepatienten nach Aufnahme von 100 mg Quercetin [HOLLMAN et al., 1995]), kann die Menge, die nötig ist, um eine biologische Wirkung zu erzielen, kalkuliert werden. Da täglich etwa zwei Liter Dünndarmsekret produziert werden [VAUPEL, 2005], müssten etwa 270 µg Homoeriodictyol-Natriumsalz oral verabreicht werden, um eine intestinale Konzentration von 0,1 µM zu erreichen. Die Zufuhrmengen der Flavanone, die nötig sind, um die Fettsäureaufnahme in Enterozyten zu beeinflussen, sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 benötigte Zufuhrmengen von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz, Hesperetin und Sterubin um die intestinale Fettsäureaufnahme zu modulieren

	Bioaktive Konzentration in Enterozyten	benötigte Zufuhrmenge, um bioaktive Konzentration in Enterozyten zu erreichen
NaHED	0,1 bis 10 µM	0,27 bis 27 mg
HED	10 oder 100 µM	25,3 oder 253 mg
Hesperetin	100 µM	253 mg
Ster	10 und 100 µM	25,3 oder 253 mg

Nach oraler Verabreichung von 1,95 mg Hesperetin / kg Körpergewicht wurde eine maximale Plasmakonzentration von 2,73 µM Hesperetin als Glucuron- und Sulfuronkonjugat detektiert [KANAZE et al., 2007]. Anhand dieser Werte kann die Verzehrsmenge, die nötig ist, um eine Wirkung in den Adipozyten zu erzielen, auf Homoeriodictyol (ein Isomer von Hesperetin) umgerechnet werden. In der vorliegenden Arbeit führte Homoeriodictyol in der Konzentration von 0,1 µM zu einer Steigerung der Fettsäureaufnahme in Adipozyten. So müssten 71,4 µg Homoeriodictyol / kg KG oral aufgenommen werden, um eine Plasmakonzentration von 0,1 µM zu erreichen. Jedoch ist es noch nicht geklärt,

ob Flavanone in der konjugierten Form dieselbe Wirkung ausüben wie die freie Form. Kahle et al., 2011 zeigten, dass 8,3 bis 11,6 % des Phloretin im menschlichen Serum in der freien Form vorliegen [KAHLE et al., 2011]. Unter der Annahme, dass diese Daten auch für Homoeriodictyol gelten, müssten 612 µg Homoeriodictyol / kg KG oral aufgenommen werden, um eine Plasmakonzentration von 0,1 µM Homoeriodictyol in der freien Form zu erzielen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die

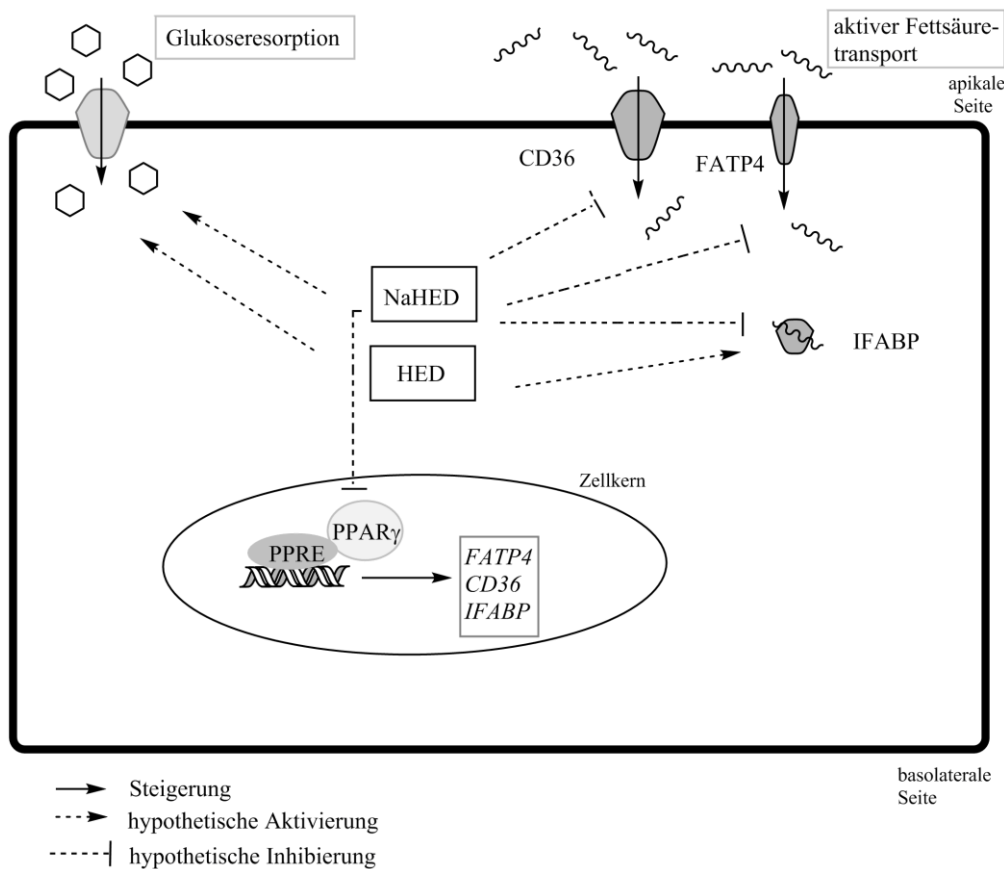


Abb. 21 Überblick der analysierter Mechanismen zur Veränderung der intestinalen Fettsäureresorption nach Inkubation mit Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz in Caco-2 Enterozyten. Zusammenfassend wird vermutet, dass durch Inkubation mit NaHED die intestinale Fettsäureaufnahme durch direkte Inhibierung der Fettsäuretransporter FATP4, CD36 und IFABP oder des nuklearen Rezeptors PPAR γ reduziert wurde und zu einer Gegenregulation auf genetischer Ebene geführt haben könnte. Weiters wurde eine kompensatorische Steigerung der Glukoseaufnahme durch Inkubation von NaHED detektiert. Die Inkubation mit HED könnte hingegen die intestinale Fettsäureaufnahme durch Förderung von IFABP steigern, was wiederum eine Gegenregulation des Gens ausgelöst haben könnte. Abkürzungen: NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol), IFABP (intestinales Fettsäure-Bindungsprotein), FATP4 (Fettsäuretransportprotein 4), CD36 (*Cluster of differentiation 36*), PPAR γ (Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor γ). PPARE (Peroxisom Proliferator response element).

Anwesenheit einer Methoxygruppe am Flavan-Grundgerüst für den Einfluss auf die intestinale Fettsäureaufnahme erforderlich sein kann. Näher war zu erkennen, dass die Vanillyl-Gruppe am B-Ring die intestinale Fettsäureaufnahme erhöhte, während die Anwesenheit einer Isovanillyl-Gruppe in Flavanonen diese reduzierte. Interessanterweise verhielt sich Homoeriodictyol im Vergleich zu seinem Natriumsalz hinsichtlich der intestinalen Fettsäureaufnahme entgegengesetzt. Während Homoeriodictyol diese, möglicherweise aufgrund der Anwesenheit einer Vanillyl-Gruppe im Molekül, erhöhte, führte Homoeriodictyol-Natriumsalz zur Reduktion der intestinalen Fettsäureaufnahme. Die erhöhte Natriumkonzentration durch Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz könnte bestimmte Fettsäuretransporter blockieren. Die Genexpressionsanalyse von Fettsäuretransportern der intestinalen Zellen brachte Hinweise auf einen möglichen molekularen Mechanismus, der die unterschiedlichen Wirkungen von Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz auf die intestinale Fettsäureaufnahme ausgelöst haben könnte (siehe auch Abbildung 21): Homoeriodictyol könnte das Protein IFABP aktiviert haben. Diese Aktivierung könnte zu einer Gegenregulation des Gens geführt haben. Wiederum könnte Homoeriodictyol-Natriumsalz PPAR γ , CD36, IFABP oder FATP4 auf Proteinebene beeinträchtigt haben. Diese Reduzierung der Aktivität könnte ebenfalls eine Gegenregulation dieser Gene verursacht haben.

Diese Hypothese ist noch nicht ausreichend erforscht, jedoch könnten auf diese Weise Homoeriodictyol-Natriumsalz, Sterubin und Hesperetin Fettsäuren im Plasma reduzieren. Homoeriodictyol könnte diese Wirkung ebenfalls durch erhöhte Fettsäureaufnahme in Adipozyten auslösen. Abschließend sei zu erwähnen, dass Flavonoide in *in vivo* Studien aus der Literatur den hypolipidämischen Effekt hauptsächlich in fettreicher Nahrung erzielten [FRIEDICH et al., 2012], [KIM et al., 2003]. Daher könnten zukünftigen Untersuchungen mit einer kombinatorischen Gabe von Homoeriodictyol-Natriumsalz und Lipiden Auskunft darüber geben, ob dieses Flavanon fettinduzierte Veränderungen des Fettsäure- bzw. Glukosetransportes in Enterozyten verhindern kann.

6 SCHLUSSBETRACHTUNG

Da ein Zusammenhang zwischen erhöhter Triglyzeridkonzentration im Blut und kardiovaskulären Erkrankungen besteht, kann die Normalisierung hoher Triglyzeridwerte im Blut dazu beitragen, diese Krankheiten zu vermeiden [MOSCA et al., 2011].

Flavonoide sind eine heterogene Gruppe innerhalb der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit positiven Wirkungen auf die Gesundheit. So zeigten Flavonoide *in vitro* und *in vivo* antioxidative, chemopräventive sowie antidiabetische und hypolipidämische Eigenschaften [GALLEANO et al., 2012]. Das Flavonoid Epigallocatechingallat aus grünem Tee weist über vielerlei Mechanismen hypolipidämische Eigenschaften auf. So wurde die Lipidabsorption bei Mäusen nach achttägiger Verabreichung von 0,5 % Epigallocatechingallat (0,83 g/kg Körpergewicht) im Vergleich zur Lipidabsorption der Kontrollgruppe vermindert. Diese verminderte Absorption äußerte sich durch erhöhte Ausscheidung oral verabreichter Lipide und wirkte sich ebenfalls positiv auf die Triglyzeridkonzentration im Plasma aus. Darüber hinaus verminderte Epigallocatechingallat (0,83 g/kg Körpergewicht) die Inkorporation von Nahrungslipiden in periphere Gewebe und förderte bei einer Dosis von 1,67 g/kg Körpergewicht für 24 Stunden die Oxidation von Fettsäuren aus der Nahrung [FRIEDRICH et al., 2012]. Aufgrund der Ergebnisse von Friedrich et al., 2012 wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von strukturell ähnlichen Flavanonen auf die intestinale Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen untersucht. Eine verminderte Fettsäureaufnahme in Enterozyten stellt einen Mechanismus dar, um erhöhte Triglyzeride im Blut zu vermeiden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welcher struktureller Faktor der Flavanone für die Verringerung der intestinalen Fettsäureaufnahme verantwortlich ist. Im Zuge dessen wurde ein Substanzvergleich von sechs Flavanonen (Hesperetin, Sterubin, Eriodictyol, Homoeriodictyol sowie dessen Natriumsalz und das Dihydrochalkon Phloretin) hinsichtlich ihrer Wirkung auf die intestinale Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen durchgeführt. Nach Inkubation mit 0,1 μM , 1 μM und 10 μM Homoeriodictyol-Natriumsalz wurde die

intestinale Fettsäureaufnahme um $12,5 \pm 6,18 \%$, $11,9 \pm 1,91 \%$ beziehungsweise $15,2 \pm 9,69 \%$ im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Nach Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ Hesperetin verringerte sich die Fettsäureaufnahme um $15,8 \pm 15,8 \%$ verglichen mit der Kontrolle. Schließlich sank die Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Sterubin um $10,6 \pm 3,44 \%$ beziehungsweise $14,8 \pm 6,53 \%$ im Vergleich zur Kontrolle. Im Vergleich zu dessen Natriumsalz förderte die Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Homoeriodictyol die intestinale Fettsäureaufnahme um $8,62 \pm 3,09 \%$ beziehungsweise $14,9 \pm 8,79 \%$ im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen beeinflusste die Inkubation mit Phloretin oder Eriodictyol die intestinale Fettsäureaufnahme nicht.

Es stellte sich heraus, dass die Anwesenheit von Methoxy-Gruppen für die Wirkung auf die Fettsäureaufnahme ausschlaggebend sein könnte. Die Erhöhung der Natriumkonzentration durch Flavanon-Natriumsalze könnte einen Beitrag zur Reduktion der intestinalen Fettsäureaufnahme leisten. Schließlich wurde gezeigt, dass eine Isovanillyl-Gruppe am B-Ring die Fettsäureaufnahme hemmt, hingegen das Vorhandensein einer Vanillyl-Gruppe zu einer Erhöhung führen könnte. Dieser induzierende Effekt des Vanillyl-Substituenten stellt sich bei erhöhter Natriumkonzentration (wie bei Homoeriodictyol-Natriumsalz) wieder ein. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mit Homoeriodictyol und dessen Natriumsalz eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, um den mechanistischen Hintergrund zu untersuchen. Es wird davon ausgegangen, dass die intestinale Fettsäureaufnahme über passive Diffusion und über einen aktiven protein-vermittelten Weg erfolgt [NIOT et al., 2009]. Am aktiven Transport in den Enterozyten beteiligen sich unter anderem CD36, das intestinale Fettsäurebindungsprotein (IFABP), die Fettsäuretransportproteine (FATP) 2 und 4 [WANG et al., 2013]. Die nuklearen Rezeptoren PPAR α und PPAR γ regulieren die Transkription der Fettsäuretransporter und andere Gene des Fettstoffwechsel [DESVERGNE et al., 2006]. Zusammenfassend geht aus der Genexpressionsanalyse nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Homoeriodictyol oder dessen Natriumsalz hervor, dass der fördernde Effekt von Homoeriodictyol und die absenkende Wirkung des Natriumsalzes auf die intestinale

Fettsäureaufnahme auch auf genetischer Ebene erkennbar sind. Die Inkubation mit Homoeriodictyol könnte die Aktivität von IFABP auf Proteinebene induzieren und dadurch eine Gegenregulation des Gens verursachen. Hingegen könnte die Inkubation mit Homoeriodictyol-Natriumsalz $PPAR\gamma$, CD36, IFABP oder FATP4 hemmen, was zu verminderter Fettsäureaufnahme führen könnte, und dadurch eine Gegenregulation auf genetischer Ebene auslösen. *FATP2* und *PPAR α* wurden in Gegenwart der hier getesteten Flavanone nicht beeinflusst und zeigt, dass die Gegenregulation der Fettsäuretransporter, nicht durch *PPAR α* ausgelöst wurde.

Die Untersuchungen der Effekte der Flavanone auf die intestinale Glukoseaufnahme weisen auf eine kompensatorische Steigerung der Glukoseaufnahme nach Inkubation mit 0,1 μ M bis 10 μ M Homoeriodictyol-Natriumsalz, die durch *PPAR γ* vermittelt sein könnte [NUGENT et al., 2001].

Die periphere Fettsäureaufnahme wurde nach Inkubation mit 0,1 μ M Homoeriodictyol erhöht.

Zusammenfassend geht aus den vorliegenden Ergebnissen hervor, dass die Substituenten am Flavanon-Grundgerüst unterschiedlich auf die intestinale und periphere Fettsäureaufnahme und die Glukoseaufnahme in Enterozyten wirken. So könnte Homoeriodictyol-Natriumsalz über $PPAR\gamma$ für einen Nährstoffausgleich in Enterozyten sorgen, der sich durch verminderten Fettsäuretransport und erhöhten Glukosetransport in diese Zellen äußerte. Hingegen könnte Homoeriodictyol zu einer gesteigerten Fettsäureaufnahme in Adipozyten führen, und dadurch den Lipidspiegel im Plasma reduzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Ansatz für weitere Studien dienen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Erhöhte Konzentrationen an Lipiden im Plasma sind mit negativen Folgen, wie kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert. Um die Triglyzeridkonzentration im Plasma zu verringern, spielt die Reduktion der intestinalen Fettsäureaufnahme und die Förderung der peripheren Fettsäureaufnahme eine wichtige Rolle. Flavonoiden können die intestinale Fettsäureaufnahme positiv beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die getesteten Flavanone (Hesperetin, Sterubin und das Natriumsalz von Homoeriodictyol (HED)) die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Enterozyten reduzierten. Ausschlaggebend für einen hemmenden oder fördernden Effekt, ist die Methylierung einer Hydroxygruppe am Flavanongrundgerüst. Weiters stellte sich heraus, dass die Isovanillyl-Gruppe am B-Ring des Flavanongrundgerüsts als verringernder, die Vanillyl-Gruppe hingegen als fördernder Substituent für die Fettsäureaufnahme fungierten. Die erhöhte Natriumkonzentration könnte ebenfalls ausschlaggebend für eine Reduktion der intestinalen Fettsäureaufnahme sein, denn HED-Natriumsalz verringerte die intestinale Fettsäureaufnahme, während HED diese erhöhte.

Die Genexpressionsanalyse der Transporter der Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit HED oder dessen Natriumsalz zeigte eine zeitabhängige Regulation. Die verminderte intestinale Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit HED-Natriumsalz könnte durch eine Hemmung der Fettsäuretransporter CD36, FATP4, und IFABP oder PPAR γ ausgelöst worden sein, was zu einer Gegenregulation auf genetischer Ebene und einer kompensatorischen Förderung der Glukoseaufnahme führen könnte. HED könnte umgekehrt die Aktivität von IFABP fördern, was zur Steigerung der Fettsäureaufnahme führte und sich wiederum in einer Gegenregulation des Gens äußern könnte. Des Weiteren stieg die periphere Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit HED in 3T3-L1 Adipozyten. Auf diese Weise könnte die Lipidkonzentration auch im Plasma *in vivo* gesenkt werden.

8 ABSTRACT

High plasma levels of lipids are associated with a higher risk for cardiovascular diseases. A measure to reduce plasma lipids could be a reduced intestinal or an increased periphery fatty acid uptake. Flavonoids were shown to affect intestinal fatty acid uptake.

In this thesis, the tested flavanones (hesperetin, sterubin and the sodiumsalt of homoeriodictyol (HED)) were shown to reduce intestinal fatty acid uptake in Caco-2 enterocytes *in vitro*. A methylation of one hydroxy group on the flavanone backbone was demonstrated to be a major structural determinant in the regulation of intestinal fatty acid uptake. In addition, an isovanillyl-moiety on the B-ring could be responsible for the reduction of fatty acid uptake after flavanone-treatment, while the vanillyl-moiety was shown to induce the intestinal fatty acid uptake. Furthermore, an increased Na^+ - concentration could affect fatty acid uptake, since the sodium salt of HED differently influenced fatty acid uptake in comparison to HED. Gene expression analysis of modulators of fatty acid uptake after incubation with HED and its sodiumsalt revealed a time-dependent regulation. Thus, the reduced fatty acid uptake after incubation with HED-sodiumsalt in Caco-2 cells could be explained by an inhibition of the fatty acid transporter CD36, FATP4 and IFABP or PPAR γ at the protein level in intestinal cells, resulting in a counter-regulation on gene expression of these proteins and a compensatory increase of intestinal glucose uptake. On the other hand, incubation with HED resulted in an activation of IFABP, as the fatty acid uptake was induced, which might have turned to a counter-regulation of *IFABP* as well. Furthermore, incubation with HED increased fatty acid uptake in 3T3-L1 adipocytes, which could also support a reduction of circulating lipids from the blood *in vivo*.

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABUMRAD N A, PERKINS R C, PARK J H, PARK C R. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *The Journal of Biological Chemistry* 1981;256(17):9183-9191.

ALVARADO F. Hypothesis for the interaction of phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars. *Biochimica et Biophysica Acta* 1967;135(3):483-495.

AMASHEH M, SCHLICHTER S, AMASHEH S, MANKERTZ J, ZEITZ M, FROMM M, SCHULZKE J D. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition* 2008;138(6):1067-1073.

Applied Biosystems (AB): Essentials of Real Time PCR. Internet: <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%20of%20real%20time%20pcr.pdf> (Stand 2.4.2014)

ASSINI J M, MULVIHILL E E, HUFF M W. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 2013;24(1):34-40.

American Type Culture Collection (ATCC): Caco-2 (ATCC® HTB-37) Characteristics. Internet: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CL-173.aspx#generalinformation> (Stand 23.11.2013).

American Type Culture Collection (ATCC): 3T3-L1 (ATCC® CL-173TM) Characteristics. Internet: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CL-173.aspx?geo_country=at#characteristics (Stand 24.11.2013).

AUSTIN M A, HOKANSON J E, EDWARDS K L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *American Journal of Cardiology* 1998; 81: 7-12.

BERG A, BISCHOFF S, COLOMBO-BENKMANN M, ELLROTT T, HAUNER H, HEINTZE C, KANTHAK U, KUNZE D, STEFAN N, TEUFEL M, WABITSCH M, WIRTH A. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur "Prävention und Therapie der Adipositas". Martinsried, 2014. Internet: http://www.adipositas-gesellschaft.de/fileadmin/PDF/Leitlinien/S3_Adipositas_Praevention_Therapie_2014.pdf (Stand: 08.08.2014)

BERGMAN R N, ADER M. Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2000; 11(9):351-356.

BLACK P N, SANDOVAL A, ARIAS-BARRAU E, DIRUSSO C C. Targeting the fatty acid transport proteins (FATP) to understand the mechanisms linking fatty acid transport to metabolism. *Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* 2009;9(1):11-18.

BLODGETT A B, KOTHINTI R K, KAMYSHKO I, PETERING D H, KUMAR S, TABATABAI N M. A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells. *Diabetes Technology & Therapeutics* 2011;13(7):743-751.

Biomedical Genomics: RNA Quality assessment of total RNA. Internet: http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html (Stand 13.03.2014).

BOSCHMANN M, THIELECKE F. The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition* 2007;26(4):389-395.

BOTHAM KM, MOORE EH, PASCALE C, BEJTA F. The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants. *Biochemical Society Translations* 2007; (35): 454-458.

BOULLART ACI, GRAAF J, STALENHOF AF. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1821: 867-875

BRAND W, VAN DER WEL P A, REIN M J, BARRON D, WILLIAMSON G, VAN BLADEREN P J, RIETJENS I M. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals* 2008;36(9):1794-1802.

CHA K H, SONG D G, KIM S M, PAN C H. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee, and gomchui (*Ligularia fischeri*) tea polyphenols during simulated digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012; 60(29): 7152-7157.

COELHO M, OLIVEIRA T, FERNANDES R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science* 2013;9(2):191-200.

COLIN S, BRIAND O, TOUCHE V, WOUTERS K, BARON M, PATTOU F, HANF R, TAILLEUX A, CHINETTI G, STAELS B, LESTAVEL S. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- α increases high-density lipoprotein production. *European Heart Journal* 2013;34(32):2566-2574.

CRESPILLO A, ALONSO M, VIDA M, PAVON F J, SERRANO A, RIVERA P, ROMERO-ZERBO Y, FERNANDEZ-LLEBRES P, MARTINEZ A, PEREZ-VALERO V, BERMUDEZ-SILVA F J, SUAREZ J, DE FONSECA F R. Reduction of body weight, liver steatosis and expression of stearyl-CoA desaturase 1 by the isoflavone daidzein in diet-induced obesity. *British Journal of Pharmacology* 2011;164(7):1899-1915.

CURA A J, CARRUTHERS A. Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis. *Comprehensive Physiology* 2012;2(2):863-914.

DAY A J, CAÑADA F J, DÍAZ J C, KROON P A, MCLAUCHLAN R, FAULDS C B, PLUMB G W, MORGAN M R A, WILLIAMSON G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 2000;468(2-3):166-170.

DELI M A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 2009;1788(4):892-910.

DESVERGNE B, MICHALIK L, WAHLI W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological Reviews* 2006;86(2):465-514.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE): Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit. 2010. Internet: <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=1019> (Stand 09.10.2014).

DJOUSSE L, BENKESER D, ARNOLD A, KIZER J R, ZIEMAN S J, LEMAITRE R N, TRACY R P, GOTTDIENER J S, MOZAFFARIAN D, SISCOVICK D S, MUKAMAL K J, IX J H. Plasma free fatty acids and risk of heart failure: the cardiovascular health study. *Circulation Heart Failure* 2013;6(5):964-969.

DO K, JEUN J, HOUNG S-J, JUN H-j, LEE J, JIA Y, LEE S-J. Soybean (Glycine max L. Merr.) hexane extracts inhibit cellular fatty acid uptake by reducing the expression of fatty acid transporters. *Food Science and Biotechnology* 2011;20(1):237-242.

DROVER V A, AJMAL M, NASSIR F, DAVIDSON N O, NAULI A M, SAHOO D, TSO P, ABUMRAD N A. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115(5):1290-1297.

DULLOO A G, DURET C, ROHRER D, GIRARDIER L, MENSI N, FATHI M, CHANTRE P, VANDERMANDER J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999;70(6):1040-1045.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids /CEF). Scientific opinion flavouring group evaluation 32 (fge.32): flavonoids (flavanones and dihydrochalcones) from chemical group 25 and 30. *EFSA Journal* 2010;8 (9):1065.
<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/1065.html> (Stand 14.06.2014)

Elmadfa I et al.: Österreichischer Ernährungsbericht 2012. Wien, 2012.
<http://www.bmg.gv.at/> (Stand 12.05.2014).

FALOMIR-LOCKHART L J, FRANCHINI G R, GUERBI M X, STORCH J, CORSICO B. Interaction of enterocyte FABPs with phospholipid membranes: clues for specific physiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1811(7-8):452-459.

FELDMAN T, KOREN M, INSULL W, Jr., MCKENNEY J, SCHROTT H, LEWIN A, SHAH S, SIDISIN M, CHO M, KUSH D, MITCHEL Y. Treatment of high-risk patients with ezetimibe plus simvastatin co-administration versus simvastatin alone to attain National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III low-density lipoprotein cholesterol goals. *The American Journal of Cardiology* 2004;93(12):1481-1486.

FRIEDRICH M, PETZKE K J, RAEDERSTORFF D, WOLFRAM S, KLAUS S. Acute effects of epigallocatechin gallate from green tea on oxidation and tissue incorporation of dietary lipids in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity* (2005) 2012;36(5):735-743.

FRITSCH A, JOOST HG, Diabetes mellitus Typ 1 und 2 und metabolisches Syndrom In: Ernährungsmedizin (Biesalski HK; Bischoff SC; Puchstein C. Hsg.) Georg Thieme, Stuttgart, 2010.

GALLEANO M, CALABRO V, PRINCE P D, LITTERIO M C, PIOTRKOWSKI B, VAZQUEZ-PRIETO M A, MIATELLO R M, OTEIZA P I, FRAGA C G. Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012;1259:87-94.

GOLDWASSER J, COHEN PY, YANG E, BALAGUER P, YARMUSH ML, NAHMIAS Y. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of ppar α , ppar γ and lxr α . *PLOS one* 201;5:12399

GREEN H, MEUTH M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974;3(2):127-133.

GREGOIRE F M, SMAS C M, SUL H S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews* 1998;78(3):783-809.

HAMILTON J A. New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2007;77(5–6):355-361.

HASSAN M, YAZIDI C E, MALEZET-DESMOULINS C, AMIOT M-J, MARGOTAT A. Gene expression profiling of 3T3-L1 adipocytes exposed to phloretin. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2010;21(7):645-652.

HEIM K E, TAGLIAFERRO A R, BOBILYA D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13(10):572-584.

HERTOG M G L, FESKENS E J M, KROMHOUT D, HOLLMAN P C H, KATAN M B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 1993;342(8878):1007-1011.

HOLLMAN P C, DE VRIES J H, VAN LEEUWEN S D, MENGELERS M J, KATAN M B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995;62(6):1276-1282.

HUANG T H, KOTA B P, RAZMOVSKI V, ROUFOGALIS B D. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2005;96(1):3-14.

ISSEMMANN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347(6294):645-650.

JOHNSTON K, SHARP P, CLIFFORD M, MORGAN L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2005;579(7):1653-1657.

KAHLE K, KEMPF M, SCHREIER P, SCHEPPACH W, SCHRENK D, KAUTENBURGER T, HECKER D, HUEMMER W, ACKERMANN M, RICHLING E. Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European Journal of Nutrition* 2011;50(7):507-522.

KANAZE F I, BOUNARTZI M I, GEORGARAKIS M, NIOPAS I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 2007;61(4):472-477.

KANWAL A, SINGH S P, GROVER P, BANERJEE S K. Development of a cell-based nonradioactive glucose uptake assay system for SGLT1 and SGLT2. *Analytical Biochemistry* 2012;429(1):70-75.

KELLETT G L, BROU-LAROCHE E, MACE O J, LETURQUE A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annual Review of Nutrition* 2008;28:35-54.

KIM H K, JEONG T-S, LEE M-K, PARK Y B, CHOI M-S. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta* 2003;327(1-2):129-137.

KIMURA R, TAKAHASHI N, MUROTA K, YAMADA Y, NIIYA S, KANZAKI N, MURAKAMI Y, MORIYAMA T, GOTO T, KAWADA T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) suppresses postprandial lipidemia through fatty acid oxidation in enterocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011;410(1):1-6.

LABONTE E D, CAMAROTA L M, ROJAS J C, JANDACEK R J, GILHAM D E, DAVIES J P, IOANNOU Y A, TSO P, HUI D Y, HOWLES P N. Reduced absorption of saturated fatty acids and resistance to diet-induced obesity and diabetes by ezetimibe-treated and *Npc1l1*^{-/-} mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008;295(4):776-783.

LAGAKOS W S, GAJDA A M, AGELLON L, BINAS B, CHOI V, MANDAP B, RUSSNAK T, ZHOU Y X, STORCH J. Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2011;300(5):803-814.

LEIRA F, LOUZAO M C, VIEITES J M, BOTANA L M, VIEYTES M R. Fluorescent microplate cell assay to measure uptake and metabolism of glucose in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in Vitro* 2002;16(3):267-273.

LEY J P, KINDEL G, PAETZ S, RIESS T, HAUG M, SCHMIDTMANN R, KRAMMER G. Use of hesperetin for enhancing the sweet taste. *Google Patents*, 2007.

LEY J P, DESSOY M, PAETZ S, BLINGS M, HOFFMANN-LUCKE P, REICHELT K V, KRAMMER G E, PIENKNY S, BRANDT W, WESSJOHANN L. Identification of enterodiol as a masker for caffeine bitterness by using a pharmacophore model based on structural analogues of homoeriodictyol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012;60(25):6303-6311.

LEY J P, KRAMMER G, REINDERS G, GATFIELD I L, BERTRAM H J. Evaluation of bitter masking flavanones from *Herba Santa* (*Eriodictyon californicum* (H. and A.) Torr., *Hydrophyllaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53(15):6061-6066.

LEY, JP, PAETZ S, BLINGS M, HOFFMANN-LÜCKE, RIESS T, KRAMMER G.E. Structural analogues of hispolon as flavour modifiers. In: *Expression of Multidisciplinary Flavour Science* (Blank I., Wüst M., Yeretizian C. Hsg.) Züricher Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Zürich, 2010 (S. 402-405).

LIAO J, SPORTSMAN R, HARRIS J, STAHL A. Real-time quantification of fatty acid uptake using a novel fluorescence assay. *Journal of lipid research* 2005;46(3):597-602.

LISTENBERGER L L, SCHAFFER J E. Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2002;12(3):134-138.

LÖFFLER G, MÖSSNER J. Stoffwechsel von Triacylglycerinen und Fettsäuren; Gastrointestinaltrakt In: *Biochemie & Pathobiochemie* (Löffler, Petrides, Heinrich), Springer Medizin Verlag, Heidelberg; 2007.

LYNES M D, WIDMAIER E P. Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet. *Life Sciences* 2011;88(9-10):384-391.

MACE O J, AFFLECK J, PATEL N, KELLETT G L. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *The Journal of Physiology* 2007;582:379-392.

MALENCIC D, CVEJIC J, MILADINOVIC J. Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from central Europe. *Journal of Medicinal Food* 2012;15(1):89-95.

MANACH C, WILLIAMSON G, MORAND C, SCALBERT A, REMESY C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:230-242.

MARTIN C, CHEVROT M, POIRIER H, PASSILLY-DEGRACE P, NIOT I, BESNARD P. CD36 as a lipid sensor. *Physiology & Behavior* 2011;105(1):36-42.

MELTON E M, CERNY R L, DIRUSSO C C, BLACK P N. Overexpression of human fatty acid transport protein 2/very long chain acyl-CoA synthetase 1 (FATP2/Acsvl1) reveals distinct patterns of trafficking of exogenous fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;440(4):743-748.

MENARD S, CERF-BENSUSSAN N, HEYMAN M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunology* 2010;3(3):247-259.

MEUNIER V, BOURRIE M, BERGER Y, FABRE G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* 1995;11(3-4):187-194.

MEYDANI M, HASAN S T. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients* 2010;2(7):737-751.

MILGER K, HERRMANN T, BECKER C, GOTTHARDT D, ZICKWOLF J, EHEHALT R, WATKINS P A, STREMMEL W, FULLEKRUG J. Cellular uptake

of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *Journal of Cell Science* 2006;119:4678-4688.

MILLER M; STONE NJ, BALLANTYNE C, BITTNER V, CRIQUI MH, GINSBERG HN, GOLDBERG AC, HOWARD WJ, JACOBSON MS, KRIS-ETHERTON PM, LENNIE TA, LEVI M, MAZZONE T, PENNATHUR S. Triglycerides and cardiovascular disease a scientific statement from the american heart association. *Circulation* 2011 (123): 2292-2333.

MIWA Y, MITSUZUMI H, SUNAYAMA T, YAMADA M, OKADA K, KUBOTA M, CHAEN H, MISHIMA Y, KIBATA M. Glucosyl hesperidin lowers serum triglyceride level in hypertriglyceridemic subjects through the improvement of very low-density lipoprotein metabolic abnormality. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2005;51(6):460-470.

MIYAKE Y, SAKURAI C, USUDA M, FUKUMOTO S, HIRAMITSU M, SAKAIDA K, OSAWA T, KONDO K. Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2006;52(1):54-60.

MOSCA L, BENJAMIN EJ, BERRA K, BEZANSON JL, DOLOR RJ, LLOYD-JONES DM, NEWBY LK, PINA IL, ROGER VL, SHAW LJ, ZHAO D. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women-2011 Update. *Circulation* 2011; 123:1243-1262.

MUROTA K, SHIMIZU S, CHUJO H, MOON J.H, TERAOKA J. Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Archives Biochemistry and Biophysics* 2000; 384: 391–397

NASSIR F, WILSON B, HAN X, GROSS R W, ABUMRAD N A. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282(27):19493-19501.

NIELSEN I L, CHEE W S, POULSEN L, OFFORD-CAVIN E, RASMUSSEN S E, FREDERIKSEN H, ENSLEN M, BARRON D, HORCAJADA M N, WILLIAMSON G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *The Journal of Nutrition* 2006;136(2):404-408.

NIOT I, POIRIER H, TRAN T T T, BESNARD P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Progress in Lipid Research* 2009;48(2):101-115.

NTAMBI J M, YOUNG-CHEUL K. Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of Nutrition* 2000;130(12):3122-3126.

NUGENT C, PRINS J B, WHITEHEAD J P, WENTWORTH J M, CHATTERJEE V K, O'RAHILLY S. Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. Evidence for involvement of lipoxygenase metabolites and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(12):9149-9157.

OCKNER R K, MANNING J A, POPPENHAUSEN R B, HO W K L. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 1972;177(4043):56-58.

PEQLAB Biotechnology: Arbeitsanleitung PeqGOLD Total RNA Kit. Internet: http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6634-02_m.pdf (Stand 04.01.2014)

PERETTI N, DELVIN E, SINNETT D, MARCIL V, GAROFALO C, LEVY E. Asymmetrical regulation of scavenger receptor class B type I by apical and basolateral stimuli using Caco-2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;100(2):421-433.

POIRIER H, DEGRACE P, NIOT I, BERNARD A, BESNARD P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *European Journal of Biochemistry* 1996;238(2):368-373.

POREBA M A, DONG C X, LI S K, STAHL A, MINER J H, BRUBAKER P L. Role of fatty acid transport protein 4 in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from murine intestinal L cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2012;303(7):899-907.

RIEDEL A, LANG R, ROHM B, RUBACH M, HOFMANN T, SOMOZA V. Structure-dependent effects of pyridine derivatives on mechanisms of intestinal fatty acid uptake: regulation of nicotinic acid receptor and fatty acid transporter expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2014;25(7): 750-757.

RIRIE K M, RASMUSSEN R P, WITTEWER C T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1997;245(2):154-160.

RISS T L, MORAVEC RA, NILES AL, BENINK HA, WORZELLA TJ, MINOR L. Cell viability assays In: *Assay Guidance Manual* [Internet], Bethesda (MD) 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (Stand 11.11.2013)

RODRÍGUEZ-PENAS D, FEIJÓO-BANDÍN S, LEAR P V, MOSQUERA-LEAL A, GARCÍA-RÚA V, OTERO M F, RIVERA M, GUALILLO O, GONZÁLEZ-JUANATEY J R, LAGO F. Aliskiren affects fatty-acid uptake and lipid-related genes in rodent and human cardiomyocytes. *Biochemical pharmacology* 2011;82(5):491-504.

ROHM B, RIEDEL A, LEY J, WIDDER S, KRAMMER GE, SOMOZA V. Capsaicin, nonivamide and trans-pellitorine decrease free fatty acid uptake without TRPV1 activation and increase acetyl-coenzyme A synthetase activity in Caco-2 cells. *Food & Function* 2015 (6); 172-184.

ROMAN Y, ALFONSO A, LOUZAO M C, VIEYTES M R, BOTANA L M. Confocal microscopy study of the different patterns of 2-NBDG uptake in rabbit enterocytes in the apical and basal zone. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 2001;443(2):234-239.

ROSEN E D, MACDOUGALD O A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;7(12):885-896.

RUCKER D, PADWAL R, LI S K, CURIONI C, LAU D C. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *British Medical Journal* 2007;335(7631):1194-1199.

RUIJTER J M, RAMAKERS C, HOOGAARS W M, KARLEN Y, BAKKER O, VAN DEN HOFF M J, MOORMAN A F. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 2009;37(6):e45.

SAMBUY Y, DE ANGELIS I, RANALDI G, SCARINO M L, STAMMATI A, ZUCCO F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 2005;21(1):1-26.

SANDOVAL A, FRAISL P, ARIAS-BARRAU E, DIRUSSO C C, SINGER D, SEALLS W, BLACK P N. Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;477(2):363-371.

SANDOVAL J C, NAKAGAWA-TOYAMA Y, MASUDA D, TOCHINO Y, NAKAOKA H, KAWASE R, YUASA-KAWASE M, NAKATANI K, INAGAKI M, TSUBAKIO-YAMAMOTO K, OHAMA T, MATSUYAMA A, NISHIDA M, ISHIGAMI M, KOMURO I, YAMASHITA S. Molecular mechanisms of ezetimibe-induced attenuation of postprandial hypertriglyceridemia. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2010;17(9):914-924.

SCALBERT A, WILLIAMSON G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 2000;130(8S Suppl):2073-2085.

SCHMITZ S. *Der Zellexperimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007.

SCHWENK R W, HOLLOWAY G P, LUIKEN J J F P, BONEN A, GLATZ J F C. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2010;82(4–6):149-154.

SHIM J, MOULSON C L, NEWBERRY E P, LIN M H, XIE Y, KENNEDY S M, MINER J H, DAVIDSON N O. Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *Journal of Lipid Research* 2009;50(3):491-500.

SHAH A, RADER DJ, MILLAR JS. The effect of PPAR- α agonism on apolipoprotein metabolism in humans. *Atherosclerosis* 2010 (210): 35-40.

SIDDIQI S, SHETH A, PATEL F, BARNES M, MANSBACH II C M. Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013;1831(8):1311-1321.

SIMMEN F A, MERCADO C P, ZAVACKI A M, HUANG S A, GREENWAY A D, KANG P, BOWMAN M T, PRIOR R L. Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010;21(11):1106-1113.

SOHRAB G, HOSSEINPOUR-NIAZI S, HEJAZI J, YUZBASHIAN E, MIRMIRAN P, AZIZI F. Dietary polyphenols and metabolic syndrome among Iranian adults. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2013;64(6):661-667.

STAHL A, HIRSCH D J, GIMENO R E, PUNREDDY S, GE P, WATSON N, PATEL S, KOTLER M, RAIMONDI A, TARTAGLIA L A, LODISH H F. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Molecular Cell* 1999;4(3):299-308.

STORCH J, THUMSER A E. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285(43):32679-32683.

TAN K C, TSO A W, TAM S C, PANG R W, LAM K S. Acute effect of orlistat on post-prandial lipaemia and free fatty acids in overweight patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a Journal of the British Diabetic Association* 2002;19(11):944-948.

THOMPSON B R, LOBO S, BERNLOHR D A. Fatty acid flux in adipocytes: The in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010;318(1–2):24-33.

UCHIDA A, SLIPCHENKO M N, CHENG J-X, BUHMAN K K. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor α agonist, alters triglyceride metabolism in enterocytes of mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2011;1811(3):170-176.

Vaupel P. Funktionen des Magen-Darm-Traktes. In: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie (Schmidt RF; Lang F; Thews G. Hsg.) Springer, Heidelberg, 2005, 868-883.

VELKOV T. Thermodynamics of lipophilic drug binding to intestinal fatty acid binding protein and permeation across membranes. *Molecular Pharmaceutics* 2009;6(2):557-570.

VEREECKE L, BEYAERT R, VAN LOO G. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends in Molecular Medicine* 2011;17(10):584-593.

VYSKA K, STREMMEL W, MEYER W, NOTOHAMIPRODJO G, MINAMI K, MEYER H, KORFER R. Effects of temperature and sodium on myocardial and hepatocellular fatty acid uptake. *Circulation Research* 1994;74(1):1-13.

WALLE T, WALLE U K. The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 2003;31(11):1288-1291.

WANG Q, HERRERA-RUIZ D, MATHIS A S, COOK T J, BHARDWAJ R K, KNIPP G T. Expression of PPAR, RXR isoforms and fatty acid transporting proteins in the rat and human gastrointestinal tracts. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005;94(2):363-372.

WANG T Y, LIU M, PORTINCASA P, WANG D Q. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *European Journal of Clinical Investigation* 2013;43(11):1203-1223.

WATZL B, RECHKAMMER G., Flavonoide. *Ernährungs Umschau* 2001 (48): 498-502.

WIMMER B, RAJA M, HINTERDORFER P, GRUBER HJ, KINNE RKH. C-terminal loop 13 of na⁺/glucose cotransporter 1 contains both stereospecific and non-stereospecific sugar interaction sites. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 983-991.

World Health Organization (WHO): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Genua, 2000. Internet:
http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_894.pdf?ua=1 (Stand 2.4.2014)

World Health Organization (WHO): New WHO analysis show alarming rates of overweight children. Kopenhagen, Athen, 2014. Internet
http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/243400/New-WHO-analysis-shows-alarming-rates-of-overweight-children.pdf?ua=1

<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/data-and-statistics>. (Stand 02.04.2014).

YAMASHITA S, HIRANO K, KUWASAKO T, JANABI M, TOYAMA Y, ISHIGAMI M, SAKAI N. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007;299(1-2):19-22.

ZHAN T, POPPELREUTHER M, EHEHALT R, FULLEKRUG J. Overexpressed FATP1, ACSVL4/FATP4 and ACSL1 increase the cellular fatty acid uptake of 3T3-L1 adipocytes but are localized on intracellular membranes. *PLOS One* 2012;7(9):e45087.

ZHANG W Y, LEE J J, KIM Y, KIM I S, HAN J H, LEE S G, AHN M J, JUNG S H, MYUNG C S. Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012;60(31):7652-7658.

ZHENG Y, SARR M G. Effect of the artificial sweetener, acesulfame potassium, a sweet taste receptor agonist, on glucose uptake in small intestinal cell lines. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2013;17(1):153-158

ZIMMERMANN A, WEBER AA. Hyperlipoproteinämien In: *Ernährungsmedizin* (Biesalski HK; Bischoff SC; Puchstein C. Hsg.) Georg Thieme, Stuttgart, 2010.

ZOU C, WANG Y, SHEN Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2005;64(3):207-215.

10 ANHANG

Tab. 5 Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle angegeben, n=3-4, tR=1-3. Kont. (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol)

	Kont. (NaHED)	Kont. (Ster, ED)	Kont.	Phloretin					Hesperetin					Sterubin				
[μ M]				0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100
	102		104	95,3	92,9	90,6	102	119										
	101		104	99,0	98,2	96,6	105	103										
	97,7		91,9	106	92,4	98,7	99,0	111	96,4	102	106	101	62,4	90,3		85,1		89,8
	102	110	94,3	93,0	89,0	86,5	94,9	107	88,4		95,0	93,3	66,9	96,3	98,3	81,4	91,6	78,7
	105	98,3	94,0	87,2	83,4	84,0	97,2	92,5	118		107	105	70,5	97,2	88,2	92,1	87,9	84,8
	93,4	91,5	112	102	92,7	86,5	85,4	90,6										
	97,4	106	108	91,7	88,7	91,5	88,7	94,4										
	101	96,9	96,4	93,5	89,8	85,1	95,9	89,1										
	100	96,7	96,1	89,2	89,3	91,0	88,7	96,6										
	102		97,4	101	102	97,9	109		114		108	99,8	105					
	94,6		102	101	103	97,0	97,7		96,8	105	104	91,6	102					
	103		101	92,0	99,1	99,9	108	105	103	104	98,5	87,4	98,8					
	95,3	96,1	92,5			100	103	99,3						101	102	103		83,2
	91,3	107	114					111						98,6	105	101	91,6	76,5
	113	97,3	93,3				86,8	111						82,8	94,8	94,0	85,2	93,3
	104	104	103						94,6	105	116	102	86,3	87,8	95,7	108	91,7	94,1
	102	108	98,5						96,6	100	110	91,6	87,0	85,0	91,9	110	96,2	85,2
	94,5	104	98,3						98,6	103	103	91,8	78,8	99,3	91,9	93,7	91,5	93,4
MW	100	101	100	95,9	93,4	92,7	97,3	102	101	103	105	95,9	84,3	93,1	96,0	96,5	90,8	86,6
SD	5,14	5,86	6,53	5,79	6,01	5,94	7,81	9,30	9,51	1,81	6,20	6,05	15,8	6,75	5,59	9,82	3,45	6,51

Fortsetzung Tabelle 5: Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Enterozyten
Ergebnisse in Prozent der Kontrolle angegeben, n=3-4, tR=1-3

	Eriodictyol					Homoeriodictyol					Homoeriodictyol-Natriumsalz				
[μ M]	0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100
						102	109			112	104	81,2	88,4	74,0	100
	104	96,3	88,5	91,2	95,5	94,5	101	105	113	101	88,1	89,2	90,6	75,7	88,2
	94,6	104	95,6	105	84			105	109	106	107	97,9	88,3	74,4	92,2
		101	92,8	84,7	79,6										
	100	95,3	105	113	119	110			106	111	92,8	83,3	86,1	78,3	108
	92,4	101	95,4	109	107	109		108		123	82,3	86,9	87,6	88,3	105
	96,4	104	90,4	93,8	105	113	107		114	105	90,9	81,8	90,8	96,0	102
						92,4			109	128	90,1	86,7	86,9	100	95,8
						101	110	105	112	119	92,2	96,9		89,1	93,3
						116	107		106	112	83,0	83,8	85,6	86,8	97,2
	93,2	102	97,7	95,9	97,0	115	101	111	104	116					
	97,9	89,3	105	102	87,0	112	109	110	107	129					
	103	90,5	100	81,8	107	103	103	105	108	118					
MW	97,6	98,1	96,7	97,4	97,7	106	106	107	109	115	92,3	87,5	88,0	84,8	98,0
SD	4,22	5,56	5,80	10,7	12,6	7,97	3,70	2,79	3,09	8,78	8,52	6,16	1,91	9,68	6,33

Tab. 6 Glukoseaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Enterozyten
 Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle angegeben, n=3-4, tR=1-3. Kont. (Kontrolle), NaHED
 (Homoeriodictyol-Natriumsalz), Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol)

	Kont. (NaHED)	Kont. (Ster, ED)	Kont.	Phloretin					Hesperetin		
μM				0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1
	120	95,2	120								
	85,9	116	83,8								
	94,2	89,1	96,5		208	190	192	162	96,5		154,4
	123	105	100	82,8	199		199	138	95,4		
	98,2	110	103	78,6			205	209	86,0		156,5
	78,8	85,0	96,7								
	101	92,4	125								
	102	83,1	84,7	124	117	163	210	200			
	97,7	125	90,4		142	163	161	156			
	94,0	95,8	71,4	118	171	182	129	132			
	122	102	85,1								
	83,8	103	144								
	81,7	107	157	86,1	86,8	81,8	109	109	76,1	87,6	94,7
	101	96,3	72,5	86,1	119	79,7	105	108		89,7	90,4
	117	96,3	70,8	134	164	116	119	121	71,8	84,0	159
	104		81,0								
	96,3		128								
	100		91,2								
	84,9		104								
	142		104								
	73,3		92,0								
	88,3		66,7								
	105		108								
	107		125								
	114		107						78,3	107	86,6
	71,9		117						68,3	75,0	103
	114		76,4							110	91,7
	106		126								
	106		89,9								
	88,2		83,9							100	93,2
	117								72,9	96,3	106
	109								78,0	78,0	109
	73,4			63,3	89,1	63,3	62,4	66,6			
	141			50,8	80,8	72,5	73,3	85,0			
	76,6			47,4	78,3	79,1	76,6	80,8			
	82,0			29,0							
MW	100	100	100	81,9	132	119	137	131	80,4	92,0	113
SD	17,8	11,3	22,3	33,4	47,6	50,3	54,6	45,0	10,1	12,3	28,7

Fortsetzung Tabelle 6: Glukoseaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle angegeben, n=3-4, tR=1-3. Hesp (Hesperetin), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), ED (Eriodictyol), HED (Homoeriodictyol)

	Hesp		Sterubin					ED					HED					NaHED				
μM	10	100	0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100	0,01	0,1	1	10	100
	129	103	156	135	164	168	136	97,3	132	188	149	116						78,2	273	171	147	158
	112	121	155	92,2	145	188	152	113	94,2	187	159	165						75,6	259	225	229	131
	116	125	177		177	198	145	117	108	142	174	143						82,6	252	173	145	138
	104		82,0	109	139	104	111	90,9	124	110	145	123	122	110	86,0	110	134					
	90,8		108	110	115	122	114	79,1	135	118	153	119	80,0	116		122	164					
	111	89,1	101	115	115	99,0	121	73,9	143	129	132	137	122	128	116	122	188	155	311	220	278	
		100	61,4		98,4	126	70,1	83,1	141	75,5		132	150	133		117	142	174	155		302	
		91,7	79,3	111	86,9	144	71,2	84,2	79,9	97,8		96,2	66,7	133	100		133	159	129		293	
			80,4	103	80,4	85,9	88,6	120	111	74,4		96,2	100	125	100	133	100	100	120	147	227	201
	111							122	76,3	145	162	167	120	89,9	114	137	93,3	82,4	125	152	151	150
									105	142	181	179	151	89,9	96,6	134	137	84,9	108	135	150	160
	98,3	134	134	122		132	141	136	117	181		135	93,3	86,5		100	83,1	142	124	155	204	146
		114	136	119		114	161						79,9		94,0		156	122	226	153	142	163
			151	135		188	162						96,0	110	110	106	126	105	104	129	153	193
													87,9	108	91,9	104	158					
MW	109	110	118	115	124	139	123	101	114	133	157	134	106	112	101	118	135	113	182	166	202	160
SD	11,5	16,3	37,8	13,3	33,9	38,0	32,6	20,8	22,5	39,7	15,9	26,4	27,2	17,3	10,3	13,4	30,8	35,6	75,9	32,6	62,6	23,6

Tab. 7 Genexpression von *CD36* nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse als x-fache Änderung angegeben, n=3-4, tR=1-3. Kont (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

	15 min				30 min				60 min				90 min			
	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED
	0,95	0,94	0,38	0,25	0,93	1,00	2,04	1,09	1,00	1,05	0,86	2,57	0,90	1,00		0,57
	1,05	1,04	0,45	0,24	1,06	0,94	1,90	1,03	1,11	0,99	0,90	2,69	1,03	0,95	1,22	0,63
	1,00	1,02	0,58	0,32	1,01	1,05	1,67	1,09	0,88	0,96	1,07	2,56	1,07	1,04		0,67
	0,87	1,04	1,69	0,98	0,88	1,00	0,69	2,50	0,85	0,97	0,46	0,71	0,93	1,07	1,37	2,11
	1,02	0,93	1,62	1,04	1,10	1,01	0,68	2,28	1,10	1,07	0,47	0,82	1,00	0,88	1,24	2,09
	1,11	1,03	1,73	1,32	1,03	0,99	0,74	2,40	1,05	0,96	0,49	0,75	1,07	1,06	1,33	2,02
	1,01	1,09	1,95	0,71	0,98	1,12	1,65	1,22	1,04	0,92	0,63	0,71	0,90	1,16		4,24
	1,07	1,06	1,64	0,71	1,04	0,90	1,71	1,28	0,96		0,75	0,82	1,16	0,90		4,68
	0,92	0,86	2,04	0,78	0,98	0,97	1,87	1,23	1,00	1,08	0,72	0,84	0,94	0,94		4,89
	0,94	1,04	0,57	0,78	0,99	0,98	0,23	0,78		0,98	0,85			0,98	1,36	0,94
	0,99	0,82	0,82	0,88	1,01	0,94	0,20	0,89			0,90		0,98	1,12	1,27	1,07
	1,07	1,14	0,63	0,88	0,99	1,08	0,22	1,05		1,02	0,86		1,02	0,90	1,40	1,18
MW	1,00	1,00	1,18	0,74	1,00	1,00	1,13	1,40	1,00	1,00	0,75	1,39	1,00	1,00	1,31	2,09
SD	0,07	0,09	0,65	0,33	0,06	0,06	0,73	0,62	0,09	0,05	0,20	0,92	0,08	0,09	0,07	1,62
SEM	0,02	0,03	0,19	0,09	0,02	0,02	0,21	0,18	0,03	0,02	0,06	0,31	0,02	0,03	0,03	0,47

Tab. 8 Genexpression von *IFABP* nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse als x-fache Änderung angegeben, n=3-4, tR=1-3. Kont (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

	15 min				30 min				60 min				90 min			
	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED
	1,00	1,01	0,67	0,91		1,03	0,68	0,61	0,99	1,01		1,12	0,96	1,00	1,01	1,61
	1,01	0,99	0,61	0,88	1,00	0,97	0,71	0,63	0,98	0,99		1,13	1,02	1,00	1,04	1,65
	0,99	1,00	0,67	0,95	1,00	0,99	0,72	0,60	1,03	1,01		1,08	1,02	1,00	1,12	1,72
	0,97	1,02	1,14	0,95	0,95	0,98	0,91	1,23		0,99	0,69	1,25	0,96	1,02	1,35	1,21
	1,02	0,98	1,13	0,92	1,08	0,98	0,90	1,25	1,02	0,98	0,70	1,24	1,04	0,98	1,35	1,26
	1,01	1,00	1,16	1,06	0,97	1,04	0,92	1,26	0,98	1,03	0,73	1,25	1,00	1,00	1,45	1,25
	0,97	1,02	1,47	1,98	0,99	1,08	1,06	1,30	0,98	1,05	0,68	1,10	0,95	1,03	0,82	0,63
	1,08	0,95	1,50	1,98	1,03	0,98	1,09	1,26	1,04	0,96	0,66	1,17	1,03	0,95	0,78	0,65
	0,95	1,03	1,56	1,99	0,98	0,94	1,10	1,26	0,98	0,99	0,71	1,11	1,01	1,02		0,62
	0,99	1,04	1,16	1,09	0,96	1,01	1,02	1,01	0,87	1,00	0,68	0,76	0,98	1,02	1,24	1,19
	0,98	0,97	1,23	1,09	1,02	0,99	1,07	1,06	0,98	1,01	0,68	0,74	1,02	0,99	1,23	1,27
	1,02	0,98	1,29	1,14	1,03	1,00	1,07	1,06	1,15	0,99	0,69	0,76	0,99	1,00	1,25	1,20
MW	1,00	1,00	1,13	1,25	1,00	1,00	0,94	1,04	1,00	1,00	0,69	1,06	1,00	1,00	1,15	1,19
SD	0,04	0,03	0,33	0,45	0,04	0,04	0,16	0,28	0,07	0,02	0,02	0,19	0,03	0,02	0,22	0,38
SEM	0,01	0,01	0,09	0,13	0,01	0,01	0,05	0,08	0,02	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01	0,07	0,11

Tab. 9 Genexpression von *FATP2* nach Inkubation mit 10 μ M HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse als x-fache Änderung angegeben, n=4, tR=2-3. Kont (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

	15 min				30 min				60 min				90 min			
	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED
	0,94	1,09	0,71	0,82	0,99	0,89	0,63	0,60	0,93	0,99	1,41	0,91	0,98	0,98	1,03	1,38
	1,03	0,92	0,82	0,92	0,99	1,08	0,61	0,59	1,13	0,99	1,37	0,98	1,04	0,95	0,90	1,29
	1,04	1,00	0,79	0,86	1,01	1,03	0,57	0,62	0,94	1,01	1,30	0,89	0,98	1,07	1,03	1,41
	0,92	1,04	1,18		1,05	1,01	1,87	1,36	0,94	1,15	0,82	0,95	0,99	0,95	1,53	1,17
	1,10	0,95	1,02	0,95	1,00	0,94	1,87	1,41	1,11	0,87	0,72	0,96	1,02	1,02	1,50	1,03
	0,98	1,01	1,19	0,86	0,96	1,04	1,86	1,28	0,95	0,98	0,82	0,95	0,99	1,03	1,35	1,13
	1,07	1,02	0,89	0,99	0,97	0,99	1,00	1,07	0,99	1,04	0,78	1,00	0,92	0,98	0,99	0,84
	0,95	1,02	1,06	1,05	1,05	0,97	1,08	1,10	1,03	0,95	0,93	1,13	1,13	0,93	1,24	1,05
	0,98	0,95	1,18	1,08	0,97	1,04	1,13	1,07	0,98	1,01	1,00	0,99	0,95	1,09	0,87	0,90
	1,06	0,99	0,78	1,02	1,02	0,95	1,07	0,97	1,04	1,01	1,07	0,50	0,97	1,11	1,04	1,06
	0,92	0,98	0,78	1,16	1,13	0,93	1,09	0,98		0,96	1,03	0,49	1,00	0,77	1,01	1,05
	1,02	1,03	0,89	1,09	0,85	1,12	1,10	1,05	0,96	1,03	1,18	0,49	1,03	1,12	1,21	0,95
MW	1,00	1,00	0,94	0,98	1,00	1,00	1,16	1,01	1,00	1,00	1,04	0,85	1,00	1,00	1,14	1,10
SD	0,06	0,05	0,18	0,11	0,07	0,07	0,47	0,28	0,07	0,07	0,24	0,23	0,05	0,10	0,22	0,18
SEM	0,02	0,01	0,05	0,03	0,02	0,02	0,14	0,08	0,02	0,02	0,07	0,07	0,01	0,03	0,06	0,05

Tab. 10 Genexpression von *FATP4* nach Inkubation mit 10 μ M HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse als x-fache Änderung angegeben, n=4, tR=2-3. Kont (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

	15 min				30 min				60 min				90 min			
	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED
	0,97	1,02	0,62	0,87	0,96	0,99	0,73	0,54	1,00	0,95	1,03	1,04	0,96	0,99	1,10	1,26
	0,98	0,94	0,63	0,91	1,02	1,01	0,78	0,52	0,98	1,01	1,13	1,14	1,03	0,99	1,14	1,27
	1,05	1,04	0,69	0,96	1,02		0,85	0,54	1,02	1,04	1,21	1,17	1,01	1,02	1,20	1,32
	1,00	1,03	1,17	0,74	0,97	0,98	1,24	1,11	0,98	1,04	0,50	1,31	0,97	0,94	1,47	1,11
	0,99	0,94	1,26	0,77	0,96	0,98	1,29	1,17	1,03	0,97	0,48	1,26	0,97	1,07	1,42	1,15
	1,01	1,02	1,38	0,82	1,07	1,04	1,43	1,19	1,00	0,99	0,51	1,34	1,05	0,99	1,46	1,13
	0,96	0,91	1,20	1,07	0,95	1,00	1,20	2,28	0,96	0,94	0,92	0,90		1,01	1,02	0,67
		0,98	1,18	1,08	0,99	0,96	1,25	2,46	1,02	0,97	0,91	0,98	0,99	1,00	0,91	0,67
	1,04	1,11	1,29		1,06	1,05	1,31	2,59	1,02	1,09	0,97	0,98	1,01	0,99	0,98	0,68
	0,94	1,02	1,28	0,98	0,95	0,97	0,98	1,09	0,90	1,01	0,90	0,60	0,95	0,94	1,27	0,99
	1,03	1,00	1,31	0,96	1,01	0,99	0,99	1,04	0,88	0,99	0,91	0,71	1,02	0,99	1,23	1,00
	1,03	0,99	1,38	0,98	1,04	1,04	1,03	1,10	1,22	1,00	0,97	0,76	1,03	1,07	1,23	1,01
MW	1,00	1,00	1,11	0,92	1,00	1,00	1,09	1,30	1,00	1,00	0,87	1,02	1,00	1,00	1,20	1,02
SD	0,03	0,05	0,29	0,11	0,04	0,03	0,23	0,74	0,08	0,04	0,24	0,24	0,03	0,04	0,18	0,24
SEM	0,01	0,02	0,08	0,03	0,01	0,01	0,07	0,21	0,02	0,01	0,07	0,07	0,01	0,01	0,05	0,07

Tab. 11 Genexpression von *PPARα* nach Inkubation mit 10 µM HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse als x-fache Änderung angegeben, n=3-4, tR=2-3. Kont (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

	15 min				30 min				60 min				90 min			
	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED
	0,97	1,02		0,79	0,99	1,01	0,71	0,53	1,01	1,04	1,24	1,36	0,94	1,01	0,82	1,17
	1,05	0,99		0,76	1,06	1,00	0,71	0,58	1,04	0,93	1,23	1,45	1,07	0,95	0,85	1,29
	0,98	0,99	0,73	0,76	0,96	0,99	0,79	0,52	0,95	1,04	1,32	1,51	0,99	1,04	0,94	1,40
	0,95	0,99	1,03	0,77	1,04	0,96	1,07	1,05	0,99	1,04	1,14	1,15	0,94	1,00		1,29
	1,04	0,96	1,09	0,83	1,02	0,95	1,14	1,12	1,03	0,98	1,17	1,15	1,04	1,04		1,36
	1,01	1,04	1,15	0,88	0,94	1,09	1,22	1,13	0,98	0,98	1,26	1,26	1,02	0,96		1,38
	1,00	0,98	0,81	0,88	0,97	1,05		1,03	0,98	0,97	0,65	0,93	0,99	0,99	0,98	0,68
	1,03	0,97	0,89	0,89	1,06	0,97	0,76	1,04	1,07	0,98	0,66	0,97	1,01	0,92	1,06	0,78
	0,97	1,05	0,91	0,97	0,98	0,97	0,84	1,03	0,95	1,05	0,75	0,99		1,09	1,09	0,79
	1,00	1,02	0,93	1,01	0,99	0,97	1,04	0,80	0,91	1,00	0,85	0,71	0,91	0,98	0,88	1,06
	1,03	0,91	1,02	1,09	0,99	0,95	1,02	0,85	1,10	0,96	0,90	0,77	1,08	0,98	0,95	1,11
	0,97	1,06	1,01	1,10	1,02	1,08	1,14	0,89	0,99	1,03	1,02	0,77	1,00	1,04	0,96	1,13
MW	1,00	1,00	0,96	0,90	1,00	1,00	0,95	0,88	1,00	1,00	1,02	1,08	1,00	1,00	0,95	1,12
SD	0,03	0,04	0,13	0,12	0,04	0,05	0,19	0,23	0,05	0,04	0,24	0,27	0,05	0,05	0,09	0,25
SEM	0,01	0,01	0,04	0,04	0,01	0,01	0,06	0,07	0,02	0,01	0,07	0,08	0,02	0,01	0,03	0,07

Tab. 12 Genexpression von *PPAR γ* nach Inkubation mit 10 μ M HED oder NaHED in Caco-2 Enterozyten

Ergebnisse als x-fache Änderung angegeben, n=3-4, tR=2-3. Kont (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), HED (Homoeriodictyol)

	15 min				30 min				60 min				90 min			
	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED	Kont (NaHED)	Kont (HED)	HED	NaHED
	0,99	1,02	0,66	0,99	0,94	1,04	0,80		0,97	1,03		1,14	0,91	1,01	0,98	1,46
	0,98	0,97	0,69	1,00	1,03	0,97	0,80		1,04	0,99		1,19	1,07	0,99	0,99	1,50
	1,02	1,01	0,69	1,02	1,03	0,99	0,80		0,99	0,99		1,17	1,02	0,99	1,07	1,53
	0,99	1,03	1,07	0,84	0,97	1,13	1,24	1,11	0,94	1,01	0,86	1,28	0,93	1,02	1,30	1,04
	1,03	0,97	1,14	0,85	1,02	0,77	1,23	1,13	1,06	0,99	0,87	1,27	1,02	0,98	1,30	1,22
	0,98	1,00	1,18	0,91	1,01	1,10	1,24	1,16	1,00	1,00	0,91	1,29	1,05	1,00		1,21
	0,95	1,01	1,24	1,14	0,96	1,01	1,10	1,01	0,97	1,08	0,90	0,96	0,98	1,01	0,86	0,98
	1,01	0,96	1,23	1,15	0,99	0,94	1,06	1,06	1,02	1,01	0,91	0,93	0,99	0,97	0,84	0,98
	1,05	1,02	1,29	1,19	1,05	1,06	1,09	1,00	1,01	0,91	0,93	0,94	1,04	1,01	0,85	1,02
	0,93	1,02	0,91	1,01	0,97	0,98	0,97	1,07	1,13	1,00	0,86	0,79	0,94	1,01	0,98	1,05
	1,06	0,99	0,90	1,06	1,01	0,99	0,98	1,12	0,82	0,99	0,93	0,81	1,05	0,96	0,97	1,04
	1,01	1,00	0,93	1,08	1,02	1,03	1,02	1,18	1,05	1,01	0,95	0,88	1,01	1,02	1,02	1,07
MW	1,00	1,00	0,99	1,02	1,00	1,00	1,03	1,09	1,00	1,00	0,90	1,06	1,00	1,00	1,01	1,18
SD	0,04	0,02	0,23	0,11	0,03	0,09	0,17	0,06	0,08	0,04	0,03	0,19	0,05	0,02	0,16	0,21
SEM	0,01	0,01	0,07	0,03	0,01	0,03	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,05	0,02	0,01	0,05	0,06

Tab. 13 Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in 3T3-L1 Adipozyten

Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle angegeben, n=5-4, tR=1-3. Kont. (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz), Ster (Sterubin), ED (Eriodictyol)

	Kont. (NaHED)	Kont. (Ster, ED)	Kont.	Phloretin				Hesperetin				Sterubin				Eriodictyol			
μM				0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10
	99,4	101	99,1	90,7	89,7	97,5	107	89,0	94,1	93,9	101	102	94,6	98,5	101	97,2	101	103	92,2
	96,7	98,4	91,9	94,5	93,2	99,2	100	90,6	111	101	104	98,7	91,4	97,1	94,9	96,0	107	105	95,6
	104	101	109	94,7	94,1	97,6	97,5	93,8	109	98,9	102	95,8	116	101	92,8	95,6	104	104	97,2
	99,0	97,2	101	94,8	105	96,8	102	91,5	92,1	100	98,4	98,4	104	98,7	110	94,2	100	107	104
	107	98,5	94,9	112	101	100	105	87,4	95,4	97,1	92,2	108	104	97,0	108	90,1	105	99,6	105
	94,4	104	104	113	103	97,4	107	97,2	102	97,4	103	107	102	113	99,3	93,9	95,3	102	95,7
	101	104	109	95,4	87,4	99,6	101	115	101	104	102	97,9	103	112	92,5	89,2	94,6	96,4	101
	94,9	102	95,8	95,4	98,9	97,9	97,6	112	109			93,2	96,5	102	114	102	95,6	94,7	101
	104	95,1	95,0	98,5	102		96,9	102				105	107	108	112	103	98,6	103	99,1
	101	97,3	98,9	108	99,9		107					104	111	95,0	99,8		100	100	95,7
	99,9	100	100	96,2	106		111						109	103	110		103		97,9
	99,5	102	101	102			109							114					
	105		98,9																
	94,5		97,1																
	100		104																
	104		102																
	100		102																
	95,7		95,4																
	96,2		104																
	106		97,0																
	98,3		99,2																
MW	100	100	100	100	98,2	98,3	103	97,5	102	99,0	100	102	104	105	101	94,5	101	102	98,5
SD	3,80	2,76	4,47	7,42	6,21	1,18	4,98	9,87	7,38	3,27	4,66	4,61	6,88	7,63	6,40	3,10	4,24	3,07	3,85

Fortsetzung Tabelle 13: Fettsäureaufnahme nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in 3T3-L1 Adipozyten
 Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle angegeben, n=4-5, tR=1-3. NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

	Homoeriodictyol				NaHED			
μM	0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10
	103	104	105	101	98,7	92,2	95,0	90,3
	110	107	100	97,4	98,1	103	97,5	89,6
	105	104	101	97,0	105	100	93,1	102
	106	105	109	95,8	98,9	93,0	96,1	92,6
	111	103	103	90,8	102	102	98,8	87,3
	105	98,4	105	91,9	102	108	99,4	100
	117	123	106	108	105	102	99,5	107
	107	118		104	104	104		108
	109	116		109		104		107
	108							
	98,6							
	93,2							
	93,1							
	97,5							
	97,3							
	95,2							
	106							
	109							
	113							
MW	104	109	104	100	102	101	97,1	98,2
SD	6,80	8,06	3,15	6,66	2,81	5,13	2,43	8,25

Tab. 14 Metabolische Aktivität nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in 3T3-L1 Adipozyten

Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle angegeben, n=3-6, tR=2-3. Kont. (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

	Kont.	Phloretin			Hesperetin			Sterubin			Eriodictyol			Homoeriodictyol			NaHED		
μM		0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10
	104	106	105	94,8	102	111	104	105	95,4	98,4	97,9	91,0	89,6	97,4	95,3	106	99,5	94,0	95,4
	95,4	109	107	88,5	99,8	109	96,5	103	95,1	102	97,5	102	107	108	108	111	103	98,0	90,5
	101	113	103	90,7	95,3	104	103	118	93,2	107	103	102	106	105	109	106	86,2	90,3	99,7
	95,2	111	105	93,0	114	115	102	88,3	95,2	106	92,2	89,2	80,7	109	98,5	94,2	85,7	101	107
	109	117	103	98,7	118	113	103	91,8	90,4	98,4	90,2	95,0	83,7	119	97,7	88,8	92,6	105	98,9
	95,7	107	104	89,2	114	106	110	102		95,2	94,1	106	95,8	117	104	82,4	116	108	101
	101	104	106	93,5	108	99,7	108	112		93,2	103	99,7	94,7	99,3	101	92,1	106	90,9	103
	104	108	103	86,0	96,6	98,6	104	113		91,8	106	97,2	95,4	98,9	100	115	109	99,8	107
	95,4	114	106	87,1	103	99,9				110		94,3	95,6		100	101	98,4	97,4	
	104			92,8						113							101		
	103			97,0						114							115		
	93,8			90,4															
	95,3																		
	103																		
	102			100															
	98,4			88,2															
	98,9			95,1															
	103			101															
	93,9			99,8															
	99,9			102															
	106																		
	98,0																		
	102																		
MW	100	110	105	93,7	106	106	104	104	93,9	103	98,0	97,3	94,3	107	102	100	101	98,2	100
SD	4,17	4,37	1,44	5,05	8,22	6,19	4,18	10,4	2,13	7,87	5,68	5,41	8,79	8,21	4,65	10,9	10,2	5,92	5,61

Tab. 15 Metabolische Aktivität nach Inkubation mit ausgewählten Flavanonen in Caco-2 Zellen

Ergebnisse in Prozent der Kontrolle, n=3-6, tR=2-3

Kont. (Kontrolle), NaHED (Homoeriodictyol-Natriumsalz)

	Kont	Phloretin			Hesperetin			Sterubin			Eriodictyol			Homoeriodictyol			NaHED		
μM		1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100
	109	122		102	105	96,2	96,8	91,2	96,7	84,1	105	87,8	86,5	115	111	131			
	98,3	96,4	102		112	94,7	98,0	90,8	95,9	69,2	86,6	92,3	76,5	113	108	129			
	93,1	98,4	111		105	101	91,1	93,8	86,8	80,7	100	92,9	69,2	121	109	97,4			
	95,5	126	97,4	104	112	107	122	101	118	126	103		116						
	99,8	114		101	112	118	113	106	112	105	82,8		113						
	105	102	104	106	129	123	106	120	112	136	109	105	122						
	104							114	108	104	114		99,4	104	100		98,9	103	89,6
	100							96,0	90,4	104	106		113	97,5	102		93,2	94,9	89,9
	96,2							83,3	92,1	118	106		96,7	86,0	98,9		108	114	84,4
	106										95,2				106,3	111	117	119	103
	88,0										90,2				85,6	102	109	80,8	99,5
	106										81,2				86,0	85,3			100
	99,6	100	102		90,9	123	104				123	102		137	120	132			
	109	86,6	96,3	101	99,8	119	99,1				116	76,4		146	102	99,3			
	91,1	112	104	98,2	82,7		119				102	89,0		115	114	128			
	84,9																113	93,5	114
	102																98,0	93,4	117
	113																103	112	94,8
MW	100	106	103	102	105	110	105	100	101	103	101	92,3	99,1	115	103	113	105	101	99,0
SD	7,57	13,0	4,81	2,74	13,3	12,0	10,5	11,9	11,3	22,0	12,2	9,57	18,5	18,5	10,2	17,5	8,06	12,9	10,9

LEBENS LAUF

Ausbildung

2011 – 2015	Masterstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien <i>Schwerpunkt:</i> Lebensmittelqualität u. – Sicherheit <i>Masterarbeit:</i> „Einfluss ausgewählter Flavanone auf die Fettsäure- und Glukoseaufnahme von Enterozyten <i>in vitro</i> “
2006 – 2011	Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien <i>Abschlussarbeit:</i> „Antioxidative Eigenschaften von Kaffee in Betracht auf verschiedene Einflussfaktoren“
2005	Reifeprüfung, BG/BRG Klusemannstraße, Graz

Praktische Erfahrung

Apr. 2014	MA38 Lebensmitteluntersuchungsanstalt , Wien Praktikum
Jul. 2012 – Sep. 2012	KiloCoach TM e.U., Wien Praktikum
Jan. 2012 – Apr. 2012	Institut für Ernährungswissenschaften, Wien Mitarbeit bei der Forschungsplattform Active Ageing
Aug. 2011 – Sep. 2011	Eurest Rest. Betr. GesmbH, Wien Praktikum
Dez. 2010 – Jan. 2011	Institut für Ernährungswissenschaften, Wien Praktikum